

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. Georg Ertl

# **$T_2 / T_2^*$ - Messung an VSOP- gelabelten Makrophagen und Sensitivität der Preußisch-Blau- Färbung**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Johannes Bremicker  
aus Oppenweiler

Würzburg, August 2011

---

Referent: Prof. Dr. Dr. Dipl. Phys. Wolfgang Bauer

Koreferent: Prof. Dr. med. Andreas Buck

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 04.09.2012

Der Promovend ist Arzt

---

meinen Eltern, Grosseltern und Geschwistern

Was ist das Schwerste von Allem ? Was uns das Leichteste dünkt: Mit den Augen zu sehen, was vor den Augen dir liegt. *J.W.v.Goethe, Xenien*

---

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Magnetresonanztomographie (MRT) .....	4
1.1.1 theoretisch-physikalische Grundlagen.....	4
1.1.1.1 der Kernspin.....	4
1.1.1.2 das MR-Signal.....	5
1.1.1.3 die Relaxation .....	5
1.1.2 Aufbau eines MR-Tomographen .....	9
1.1.3 Grundlagen der Bildgebung .....	10
1.1.4 Basis-Puls-Sequenzen .....	11
1.2 MR-Kontrastmittel.....	15
1.2.1 Klassifikation nach Magnetisierbarkeit .....	15
1.2.2 Komplexe .....	17
1.2.3 Pharmakologie .....	17
1.3 Makrophagen und Zellkultur .....	20
1.3.1 Makrophagen .....	20
1.3.2 die Zellkultur.....	21
1.3.3 Zell-Labeling.....	22
1.4 Arteriosklerose.....	23
1.5 Fragestellung .....	26
1.5.1 Zell-Labeling.....	26
1.5.2 Phantombau .....	26
1.5.3 Zelldichten und Eisenbeladungen .....	27
1.5.4 MR-Relaxometrie zur Quantifizierung von $T_2$ und $T_2^*$ .....	27
1.5.5 Eisennachweis über Histologie ( Färbungen ) .....	27

---

<b>2.</b>	<b>Material &amp; Methoden.....</b>	<b>27</b>
2.1	Zellkultur.....	28
2.1.1	die Mausmakrophagen .....	28
2.1.2	das Medium .....	29
2.1.3	Kulturbedingungen.....	30
2.1.4	der Trypanblau-Test .....	30
2.1.5	das Labeling .....	30
2.1.6	der Waschvorgang.....	32
2.1.7	quantitative Aufarbeitung der Makrophagen .....	33
2.2	Makrophagen-Präparation ( Phantombau ) .....	34
2.3	Histologie .....	36
2.3.1	der Paraffinschnitt.....	36
2.3.2	der Ausstrich.....	37
2.3.3	TEM – Transmission-Elektronen-Mikroskopie .....	39
2.4	intrazelluläre Eisenbestimmung ( ICP-MS ).....	41
2.5	die MRT- Messung .....	42
2.5.1	Entwicklung des Phantomhalters.....	43
2.5.2	die MSME-Sequenz.....	45
2.5.3	Single-Pulses (Spektroskopie) .....	45
2.5.4	die CSI-Sequenz.....	46
2.6	Datenauswertung und Statistik.....	46
2.6.1	Zellkultur und zelluläre Eisenaufnahme .....	46
2.6.2	Phantombau .....	47
2.6.3	MR-Relaxometrie zur Quantifizierung von $T_2$ und $T_2^*$ .....	47
2.6.4	Eisennachweis über Histologie ( Färbungen ) .....	49
2.6.5	Statistik .....	50

---

<b>3.</b>	<b>Ergebnis .....</b>	<b>51</b>
3.1.	Zellkultur.....	51
3.2.	Phantombau.....	53
3.3.	Eisenbeladung der Makrophagen (ICPMS) .....	61
3.4.	MR-Relaxometrie zur Quantifizierung von $T_2$ und $T_2^*$ .....	65
3.4.1	$T_2$ -Messungen .....	65
3.4.2	$T_2^*$ -Messungen .....	72
3.4.3	Bestimmung der Zelldichte .....	78
3.5.	Eisennachweis über Histologie ( Färbungen ) .....	81
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>87</b>
4.1	Zellkultur und Labeling .....	87
4.2	Phantombau.....	89
4.3	Eisenbeladung der Zellen.....	90
4.4	MR-Relaxometrie zur Quantifizierung von $T_2$ und $T_2^*$ .....	91
4.4.1	Korrelation zwischen $T_2$ und Eisenbeladung.....	92
4.4.2	Korrelation zwischen $T_2^*$ und Eisenbeladung .....	93
4.5	Eisennachweis über Histologie (Färbungen).....	94
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>97</b>
<b>6.</b>	<b>Literatur- und Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>98</b>
6.1	Materialübersicht .....	98
6.2	Beispielprotokoll .....	100
6.3	Liste der Abkürzungen .....	101
6.4	Literaturverzeichnis .....	103
6.5	Abbildungsverzeichnis.....	109

# 1. Einleitung

Die Magnetresonanztomographie (MRT) ist eine Bildgebungsmethode, die in der heutigen Medizin einen festen Stellenwert eingenommen hat und welche in der zukünftigen Medizin noch an Bedeutung gewinnen wird, da sie im Vergleich zu anderen Bildgebungsmethoden überdurchschnittlich viele Vorteile besitzt. So ist sie nicht-invasiv und bringt keine Belastung durch ionisierende Strahlen mit sich. Trotzdem kann sie bis in die tiefsten Körperschichten vordringen und uns eine Vorstellung davon geben, welche strukturellen Verhältnisse dort herrschen und wie der funktionelle oder entzündliche Zustand von Geweben ist.

Nicht nur makroskopisch, auch auf mikroskopisch zellulärer Ebene kann die MRT eingesetzt werden. So können Cell-Tracking-Studien mit der MRT durchgeführt werden, da sie ohne Bedenken beliebig oft hintereinander durchführbar sind und die MRT eine hohe Auflösung und sehr gute Kontrasteigenschaften besitzt. Um die Kontrasteigenschaften noch zu verbessern, sind Kontrastmittel im Einsatz. Simon et al.<sup>88</sup> haben gezeigt, dass es einen großen Einfluss auf die Relaxivitäten  $r_1$  und  $r_2$  hat, ob sich Kontrastmittel intrazellulär in aggregierter Form befinden oder ob sie etwa extrazellulär diffus lokalisiert sind<sup>7</sup>. Sie untersuchten dieses Phänomen an Monozyten und Eisenkontrastmittel bei niedrigen Feldstärken. Der Bereich über 3 Tesla wurde diesbezüglich bis dato jedoch noch nicht erforscht. Da in der klinischen Forschung höhere Feldstärken immer mehr Anwendung finden, ist es sinnvoll, dies bei höheren Feldstärken zu untersuchen. Kurz gefasst ergeben sich für unsere Arbeit folgende Fragestellungen:

- a) Etablierung eines Labelprotokolls für die reproduzierbare definierte Eisenbeladung von murinen Peritonealmakrophagen.
- b) Auswirkung der intrazellulären Kontrastmittelaufnahme auf die Relaxivität des Eisenkontrastmittels für verschiedene zelluläre Eisenbeladungen und Zelldichten.
- c) Vergleich verschiedener histochemischer Methoden als Referenz für die MR-Messung mit Eisenkontrastmittel.

---

Im Detail umfassen die Fragestellungen b) und c) folgende Punkte:

b) Unsere Experimente an Makrophagen mit dem Eisenkontrastmittel VSOP sollen bei einer höheren Feldstärke von 7 Tesla auf die Frage nach Relaxivitätsunterschieden eine Antwort geben und auf dieser Grundlage nachprüfen, ob die Zelldichte und die Kontrastmittelbeladung einzelner Zellen anhand eines MR-Tomographen feststellbar und in eine Beziehung zueinander zu setzen sind.

Da für das oben genannte Phänomen der intra- / extrazellulären Relaxivitätsunterschiede<sup>88</sup> keine ausreichende Theorie existiert, sind konkrete empirische Messungen nötig.

Neu im Vergleich zu den uns vorangegangenen Messungen unter anderem von Simon et al.<sup>88</sup> ist auch die Variation der Eisenbeladung der Zellen. Dadurch wird ein realistischeres Abbild der in-vivo-Bedingungen geschaffen, da Makrophagen im Blutkreislauf schon wegen dem örtlichen Abstand zur Injektionsstelle und ihrem unterschiedlichen Aktivierungslevel<sup>28</sup> unterschiedlich viel Eisen aufnehmen.

c) Da in der MRT die Anwesenheit von Eisenkontrastmittel lediglich indirekt über die Änderung der Relaxationseigenschaften detektiert wird, ist ein direkter Eisennachweis nötig. Als Referenzmethode für den Nachweis von Eisenkontrastmittel in der MRT gilt die Preußisch-Blau-Färbung. Schroeter et al.<sup>85</sup> schrieb der Preußisch-Blau-Färbung einen Mangel an Sensitivität zu.

Ein weiteres Ziel unserer Versuche ist deshalb die Ermittlung von Eisen-Nachweisgrenzen, sowohl histologisch als auch in der MRT, um die jeweiligen Sensitivitäten vergleichen zu können.

---

## **Die Gliederung**

Die vorliegende Arbeit gliedert sich wie folgt: Zunächst wird in Kapitel 1 auf die Grundlagen der Magnetresonanzbildgebung, die Makrophagen und die Zellkultur allgemein eingegangen sowie auf die Arteriosklerose, da die Darstellung von Makrophagen in Plaques ein wichtiges Fernziel unserer Forschung darstellt. Die Fragestellung dieser Arbeit schließt dieses Kapitel ab. Der Material- und Methodenteil in Kapitel 2 beschreibt die Zellkultur und das Labeling sowie die verschiedenen Eisennachweismethoden. Die Methoden erstrecken sich von der histologischen Färbung über die Transmissions-elektronenmikroskopie bis hin zur Massenspektroskopie und Magnetresonanz. Kapitel 3 widmet sich dann den von uns gewonnenen Ergebnissen, welche wir dann in Kapitel 4 diskutieren werden.

Kapitel 5 stellt bietet schließlich einen Ausblick auf die weitere Entwicklung. Den Abschluss der Arbeit bilden die Materialübersicht, ein Beispielprotokoll, die Liste der Abkürzungen, das Literatur- und Abbildungsverzeichnis.

---

## 1.1 Magnetresonanztomographie (MRT)

Der Kernspin-Resonanz-Effekt wurde 1946 von Felix Bloch an der Stanford-University<sup>9</sup> und Edward Mills Purcell an der Harvard-University<sup>71</sup> unabhängig voneinander entdeckt, wofür beide 1952 zu gleichen Hälften den Physik-Nobelpreis<sup>9</sup> erhielten. In Europa begann Harry Pfeifer erstmals 1951 in Leipzig mit NMR-Experimenten<sup>68</sup>. Die NMR wurde seit den 50er Jahren des 20. Jahrhundert Gegenstand immer intensiverer Forschung und gewann durch die zunehmend bessere technische Umsetzung und leichtere klinische Handhabung zusehends an Bedeutung in der Medizin und in der medizinischen, biologischen, chemischen und physikalischen Forschung.

Nicht zuletzt ist dies Paul Lauterbur und Peter Mansfield zu verdanken, welche in den frühen 1970ern durch die Einführung von Gradienten die NMR-Bildgebung möglich machten, wofür ihnen 2003 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin verliehen wurde<sup>50</sup>. Einschränkungen findet die MRT bei implantierten Schrittmachern oder Metallprothesen (Ausnahme: Titanprothesen) oder sie kann wie von Hundley et al.<sup>40</sup> beschrieben zu Stent-Heating führen.

### 1.1.1 theoretisch-physikalische Grundlagen<sup>108</sup>

#### 1.1.1.1 der Kernspin

Eine Grundeigenschaft eines Elementarteilchens ist der Spin, welcher mit einem magnetischen Moment verknüpft ist. Dieses magnetische Moment präzediert um die Achse eines externen Magnetfelds  $B_0$  mit der Larmorfrequenz  $\omega_L = \gamma B_0$ , wobei  $\gamma$  das gyromagnetische Verhältnis ist ( $\gamma_{\text{Protonen}} = 2,675 * 10^8 \text{ s}^{-1}\text{T}^{-1}$ ). Da wir in unseren MR-Messungen nur an Protonen gemessen haben, beziehen sich alle folgenden Aussagen ausschließlich auf Kerne mit dem Kernspin  $I = \frac{1}{2}$ . Diese Kerne können in einem äußeren Magnetfeld zwei Energieniveaus einnehmen, ein niedrigeres Energieniveau, bei dem der Spin in Richtung des äußeren Magnetfelds ausgerichtet ist und ein höheres Niveau, dessen Spins entgegengesetzt zum äußeren Magnetfeld ausgerichtet sind. Der energetisch niedrigere Zustand ist etwas mehr besetzt als der energetisch höhere, was bei heute gebräuchlichen Magnetfeldstärken etwa 1 zusätzlicher

---

energetisch niedriger auf 1 Million energetisch höhere Kernspins bedeutet. Dieses Ungleichgewicht führt zu einer schwachen, aber messbaren Magnetisierung der Probe, der Längs- oder Longitudinal-Magnetisierung. Für eine einheitliche Darstellung einigte man sich darauf, die Richtung des Hauptmagnetfelds  $B_0$  als z-Achse zu wählen, in der sich die Longitudinal-Magnetisierung ausbildet. Dieser Konvention soll auch in den folgenden Schaubildern entsprechen werden.

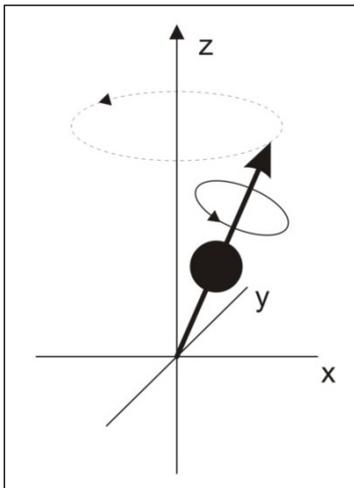


Abb.1 Kernspin (durchgezogener Kreis) und Präzession des Protons (gepunkteter Kreis)

### 1.1.1.2 das MR-Signal

Für die Erzeugung eines MR-Signals muss die Resonanzbedingung erfüllt sein. Diese besagt, dass ein HF-Puls mit der Larmorfrequenz eingestrahlt werden muss, um den Magnetisierungsvektor aus der Richtung des äußeren Magnetfelds auszulenken. Durch die dabei entstehende Präzession der Magnetisierung wird in der Empfangsspule eine Wechselspannung induziert, das MR-Signal.

### 1.1.1.3 die Relaxation

Der Anteil des Magnetisierungsvektors in z-Richtung bezeichnet man als z-Magnetisierung oder Längsmagnetisierung. Der Anteil quer zum Hauptmagnetfeld ist die xy- oder Transversal-Magnetisierung.

Relaxation ist die Rückkehr der z-Magnetisierung bzw. xy-Magnetisierung in ihren Gleichgewichtszustand. Es gibt zwei verschiedene Arten von Relaxation,

die  $T_1$ -Relaxation und die  $T_2$ -Relaxation, welche zwar unabhängig voneinander, aber simultan ablaufen. Die Relaxationsprozesse werden durch exponentielle Kurven beschrieben und enthalten die  $T_1$ -Relaxationszeit bzw. die  $T_2$ -Relaxationszeit. Das Einbeziehen der Relaxation geschieht durch eine empirische Erweiterung der Blochgleichung, der Bewegungsgleichung der Spins im Magnetfeld,

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \gamma \vec{M} \times \vec{H}_a - \vec{e}_x \left( \frac{M_x}{T_2} \right) - \vec{e}_y \left( \frac{M_y}{T_2} \right) - \vec{e}_z \left( \frac{M_z - M_0}{T_1} \right)$$

mit dem Magnetisierungsvektor  $\vec{M}$ , dem gyromagnetischen Verhältnis  $\gamma$ , dem Hauptmagnetfeld  $\vec{H}_a$ , den Einheitsvektoren  $\vec{e}_x, \vec{e}_y, \vec{e}_z$  in x-, y- und z-Richtung, dem statischen Magnetfeld  $M_0$  und den Relaxationszeiten  $T_1, T_2$ .

### **$T_1$ -Relaxation**

Die  $T_1$ -Relaxation kann, vereinfacht ausgedrückt, mit folgender Formel beschrieben werden:

$$M_z(t) = M_z(0)e^{-t/T_1} + M_0(1 - e^{-t/T_1})$$

Bei der  $T_1$ - bzw. Longitudinal-Relaxation kehrt der Magnetisierungsvektor in die Hauptmagnetfeldrichtung z zurück. Dies geschieht abhängig vom statischen Magnetfeld  $M_0$ . Zugrunde liegt diesem Relaxationsprozess die Energieabgabe der Spins an die Umgebung, deshalb wird er auch Spin-Gitter-Relaxation genannt.

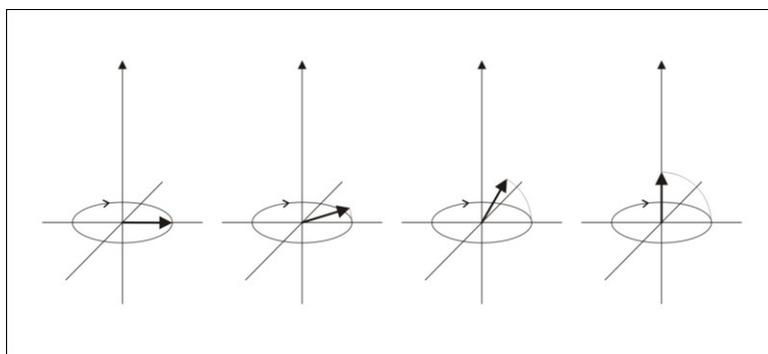


Abb.2  $T_1$ -Relaxation des Magnetisierungsvektors ( Longitudinal-Relaxation )

## T<sub>2</sub>-Relaxation

Sie ist bedingt nicht durch eine Rückkehr des Magnetisierungsvektors in die Hauptmagnetfeldrichtung z, sondern durch ein Verlorengehen der Phasenkohärenz während der Präzession um die z-Achse. Diesem Verlust der Transversalmagnetisierung liegen zwei Mechanismen zugrunde. Der erste Mechanismus ist die Dephasierung der Transversalmagnetisierung in mikroskopischen Magnetfeldvariationen. Diese sind schnell und zufällig, weshalb sie nicht refokussierbar sind. Sie stellen den dominierenden Mechanismus bei Applikation von Eisenoxid-Kontrastmittel dar. Der zweite Mechanismus ist die direkte Wechselwirkung der Spins untereinander, man spricht von Spin-Spin-Relaxation. Der Zeitverlauf der Transversalmagnetisierung gilt nur in einem vollkommen homogenen Magnetfeld und wird mit folgender Formel beschrieben:

$$M_{xy}(t) = M_{xy}(0)e^{-t/T_2}$$

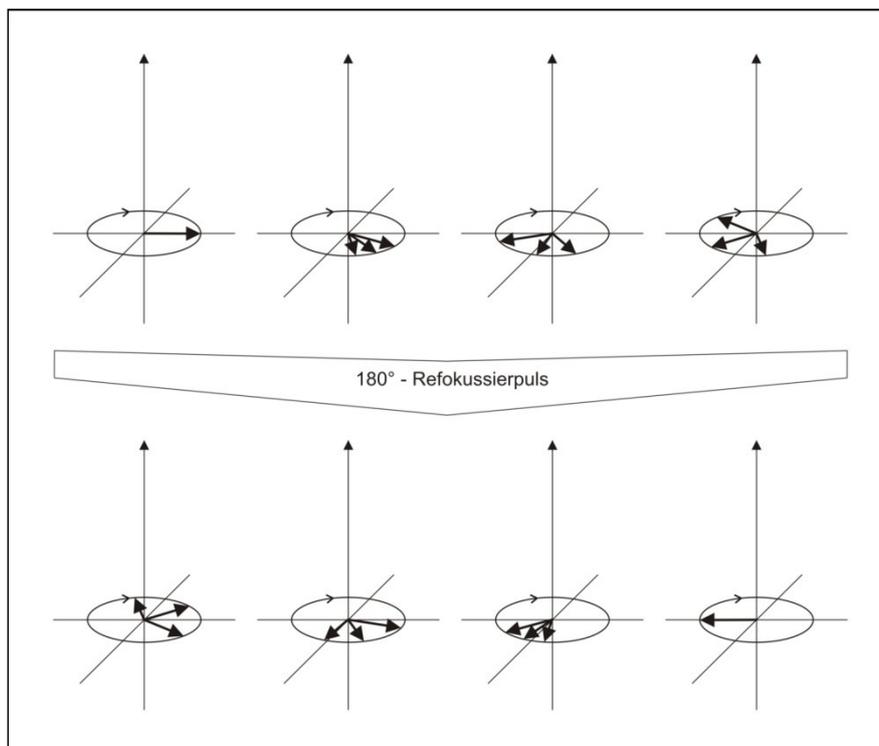


Abb.3 T<sub>2</sub>-Relaxation mit Dephasierung der Magnetisierungsvektoren und Rephasierung durch einen 180°-Refokussierpuls

---

## T<sub>2</sub><sup>\*</sup>-Relaxation

Treten zu den mikroskopischen Magnetfeldinhomogenitäten makroskopische im Bereich der Probe hinzu, so addiert sich zur T<sub>2</sub>-Relaxation noch eine T<sub>2</sub>'-Relaxation, was zur Dephasierung der Spins mit der Relaxationszeit T<sub>2</sub><sup>\*</sup> führt. Folgende Gleichung beschreibt diesen Zusammenhang:

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \frac{1}{T_2'}$$

Die makroskopischen Magnetfeldinhomogenitäten treten beispielsweise an Gewebegrenzflächen auf. Sie ändern sich signifikant nur über große räumliche Distanz und nicht über Strecken, die ein einzelner Spin über Diffusion innerhalb weniger T<sub>2</sub>-Zeiten zurücklegen kann. Nach Dephasierung durch den T<sub>2</sub>'-Effekt lassen sich, bei Vernachlässigung der Diffusion, durch Spin-Echo-Sequenzen die Magnetisierungsvektoren der Spins wieder rephasieren und somit der T<sub>2</sub>'-Effekt unterdrücken. Man sagt: die makroskopischen Feldvariationen sind refokussierbar.

Der T<sub>2</sub><sup>\*</sup>-Zerfall, bestehend aus refokussierbaren und nicht-refokussierbaren Feldvariationen, wird auch FID (Free Induction Decay) genannt.

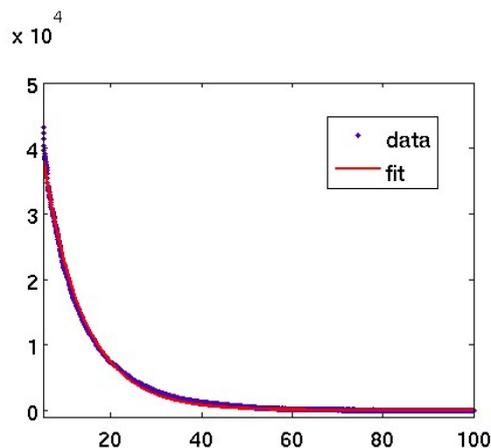


Abb.4 Free Induction Decay ( FID ) mit der Signalintensität SI (y-Achse) als einer Funktion der Zeit in [msec] (x-Achse)

### 1.1.2 Aufbau eines MR-Tomographen

Hauptbestandteil eines MR-Tomographen ist der Magnet. Es werden resistive, permanente oder supraleitende Magnete eingesetzt. Letztere bedürfen zur Supraleitung einer Kühlung, bevorzugt mit flüssigem Helium. Ausserdem enthält der MR-Tomograph Gradientenspulen, welche der Schichtwahl und Ortskodierung dienen.

Zentral im Magneten sitzt die RF-Spule, welche dem Senden des HF-Pulses und dem Empfang des resultierenden Signals dient. Beide Funktionen können auch durch getrennte Spulen erfolgen. Es gibt verschiedenste Arten von Spulen: Oberflächenspulen sind RF-Spulen mit Anbringung direkt über einem Gelenk oder wie bei Untersuchung von Prostata / Rektum als intrakavitäre Spulen. Volumenspulen können reine Empfangsspulen oder Sende-Empfangsspulen sein und sind für ihre Signalhomogenität bekannt.

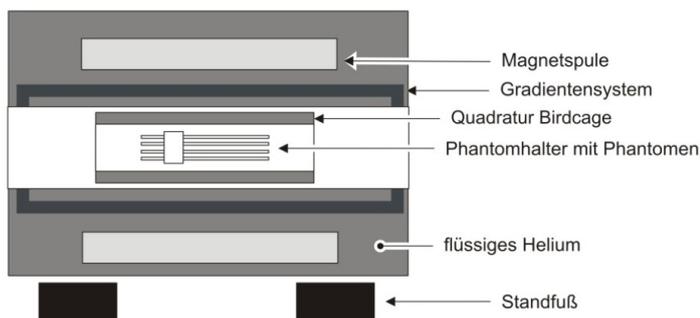


Abb.5 Magnet-Resonanz-Tomograph (MRT) schematisch im Längsschnitt

Alle HF-Komponenten zusammen bilden das HF-System. Dazu gehört neben dem HF-Sender und -Empfänger der Steuer- und Rekonstruktionscomputer. Zusätzlich sorgt ein automatischer Sende-Empfangs-Switch für die einwandfreie Funktion des MR-Tomographen.

Im Folgenden ist oft von „Phantomen“ die Rede. Als Phantom wird die Probe bezeichnet, welche zentral in die Birdcage Spule eingebracht wird. Das Phantom besteht aus einem 5mm-NMR-Glasröhrchen und der darin enthaltenen Zell-Agar-Suspension.



Abb.6 Phantom: NMR-Tube mit Zell-Agar-Suspension

---

### **1.1.3 Grundlagen der Bildgebung**

Ein Bild kann entstehen durch Reflexion (Sonographie) oder durch Strahlenabsorptionsunterschiede in verschiedenen Projektionen (CT)<sup>114</sup>. Die MRT erzeugt Bilder anhand von Frequenzunterschieden. Wie bereits oben erwähnt, präzedieren die Protonen im äußeren Magnetfeld mit der Larmorfrequenz, welche direkt proportional zur lokal gegebenen magnetischen Flussdichte ist. Durch gezielte Veränderung der jeweiligen Larmorfrequenz in verschiedenen Koordinatenpunkten lässt sich eine Ortskodierung herstellen. Die MRT benutzt hierzu Phasenkodiergradienten, welche einem Punkt eine Phase aufprägen und Frequenzkodiergradienten, welche gleichmäßig die Frequenzen verschieben. Der Frequenzkodiergradient ist während der Signalakquisition eingeschaltet, er wird auch Read-Out-Gradient genannt.

#### **FOV**

Das Field-of-View (FOV) wird in „Länge x Länge“ angegeben und steht für die Ausdehnung des betrachteten Feldes. Es können Umklappphänomene in Phasenrichtung vorkommen, sog. Phase-Wrapping oder Foldover, wenn das Objekt größer ist als das FOV. Moderne MR-Geräte verfügen über eine Anti-Aliasing-Korrektur, die bei bekannter Objektgeometrie diesen Effekt kompensieren kann<sup>82</sup>. Um solche Artefakte zu vermeiden, achteten wir darauf, dass unsere Objektgröße unser FOV von 6,0cm x 6,0cm nicht überschreitet.

#### **Suszeptibilität**

Jede Substanz besitzt eine eigene Suszeptibilität. Das ist die Eigenschaft eines Stoffes, durch seine Magnetisierung das lokale Magnetfeld zu beeinflussen<sup>67</sup>. Speziell Eisenoxidpartikel haben eine starke magnetische Suszeptibilität, welche zur beobachteten Verkürzung der Relaxationszeiten führt und die dadurch zur (erwünschten) Kontrastverstärkung führen. Die in den letzten Jahren vorangetriebene Steigerung der magnetischen Flussdichte in den Hochfeld-Bereich führt zu höherer Auflösung, aber auch einer Zunahme der Hintergrund-Suszeptibilitäts-Artefakte. Dadurch geht bei superparamagnetischem Kontrastmittel Bildkontrast verloren. Um den Kontrast zu

---

verbessern, werden heute bei niedrigen Flussdichten Kontrastmittel eingesetzt. Wir arbeiten an einem 7-Tesla-Gerät (Biospec, Bruker BioSpin GmbH, Ettlingen, Deutschland), welches aktuell ein Bindeglied zwischen rein forschungsmäßig betriebenen 17- bis 19-Tesla-Hochfeld-MRTs mit hoher Auflösung und klinisch eingesetzten 1,5- bis 3,0-Tesla-Geräten mit hohem Kontrast darstellt und damit sehr wahrscheinlich zu den zukünftigen Magneten im klinischen Betrieb gehören wird.

#### **1.1.4 Basis-Puls-Sequenzen**

Puls-Sequenzen dienen dazu, eine bestimmte Eigenschaft eines Gewebes oder einer Probe herauszuheben oder um eine Ortskodierung durchzuführen. Hierbei spielen Gradienten und HF-Pulse eine zentrale Bedeutung. Der Schichtwahlgradient wird vor dem Anregungspuls ein- und nach dem Anregungspuls ausgeschaltet und somit die gewünschte Schicht selektiv angeregt. Der Phasenkodiergradient folgt unmittelbar auf den Anregungspuls und wird während der Akquisitionsserie kontinuierlich verändert. Schließlich erfolgt die Messung bei simultan angeschaltetem Frequenzkodiergradient. Diese Schritte werden mehrmals hintereinander durchgeführt, und führen zur Akquisitionszeit

$T_{acq} = \frac{TR * n_{kodier} * NSA}{ETL}$  mit Repetitionszeit  $TR$ , Anzahl der Kodierschritte in Phasenrichtung  $n_{kodier}$ , Number of Signal Averages  $NSA$  und Echo Train Length  $ETL$ .

#### **Repetitionszeit TR**

Die Repetitionszeit  $TR$  beschreibt die Zeit zwischen 2 Anregungspulsen in derselben Schicht. Um eine zeitaufwendige vollständige Sättigung bei kurzem  $TR$  zu vermeiden, wählt man kleinere Flip-Winkel um  $10-20^\circ$  oder den optimalen Ernst-Winkel, welcher aus  $TR$  und  $TE$  berechnet wird.

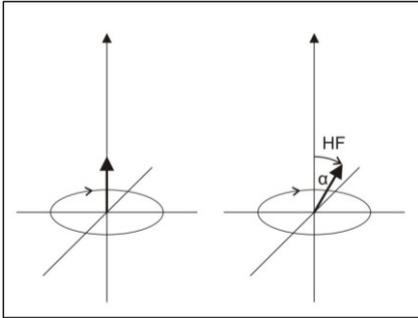


Abb.7 Flip-Winkel  $\alpha$  bei Einstrahlung eines HF-Pulses

### Echozeit TE

Um Dephasierung aufgrund gradientenbedingter Magnetfeldinhomogenitäten entgegenzuwirken, wird ein Spinecho erzeugt. Die Zeit zwischen Mitte des Anregungspulses und maximalem Echo-Peak heißt Echozeit TE. Bei Spinechos ist TE, unter Vernachlässigung von Diffusion, die doppelte Zeit zwischen Anregungs- und Refokussierpuls. Bei Gradientenechos ist TE, unter Vernachlässigung von Diffusion, die Zeit, nach der sich die Fläche unter dem Dephasiergradienten und die Fläche unter dem Rephasiergradienten gegenseitig aufheben.

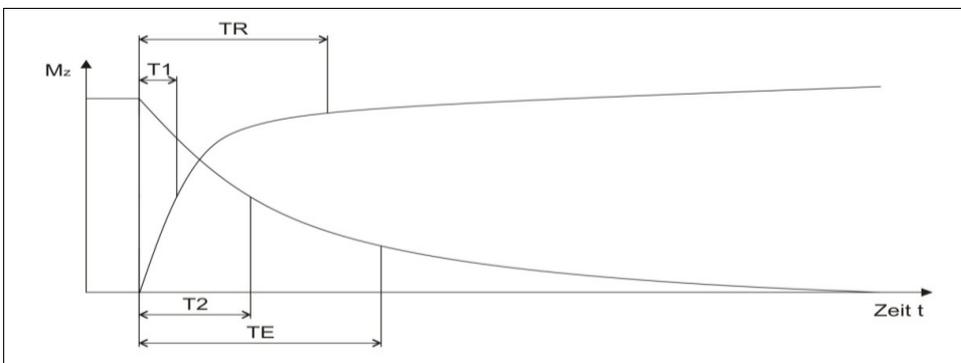


Abb.8 T1- und T2-Zerfall mit T1- und T2-Relaxationszeit und den entsprechenden MRT-Parametern TR für T1 und TE für T2 schematisch

Im Folgenden sollen nun die in unseren Experimenten verwendeten Puls-Sequenzen erläutert werden.

### Multi-Spin-Echo-Sequenzen (MSME)

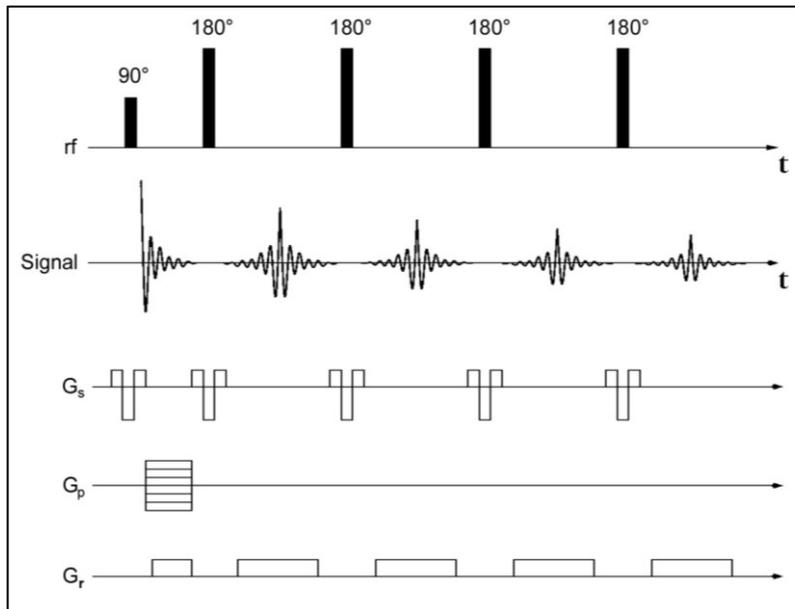


Abb.9

CPMG-Sequenz

90°-rf-Anregungspuls

180°-Refokussierpulse,

Signalpeaks nach  $\frac{1}{2}$  TE

Gradientensysteme

G<sub>s</sub>, G<sub>p</sub>, G<sub>r</sub>

Zur  $T_2$ -Messung dient eine Multi-Spin-Echo-Sequenz. Sie besteht aus einem schichtselektivem 90°-RF-Anregungspuls und nachfolgenden 180° Echo-Pulsen, durch die die Phaseninkohärenz und die laufende Dephasierung mit dem damit verbundenen Zerfall der Transversalmagnetisierung umgekehrt werden. Hierbei erfolgt bei  $\frac{1}{2}$  TE der 180°-RF-Puls und bei 1 TE ist der maximale Echo-Peak erreicht, wenn die Spins wieder in Phase sind. So wird der Einfluss der statischen Magnetfeldinhomogenitäten, d.h. der  $T_2'$ -Zerfall, eliminiert und  $T_2$  ist messbar.

Der Ablauf der Sequenz ist folgender: der Schichtwahlgradient  $G_s$  bleibt eingeschaltet, während der 90°-RF-Anregungspuls eingestrahlt wird. Danach werden beide abgeschaltet und der Phasenkodiergradient  $G_p$  folgt. Um das Echo zu erzeugen, wird der 180°-Echo-Puls kurz eingeschaltet.

Bei Annäherung an 1 TE wird der Frequenzkodiergradient  $G_r$  (Read-out-Gradient) eingestrahlt und das Echo empfangen. Nach erfolgtem Empfang wird der Read-out-Gradient wieder abgeschaltet.

---

## Single-Pulse

Bei der Single-Pulse-Sequenz wird ein einzelner  $90^\circ$ -Puls eingestrahlt und der Free Induction Decay (FID) gemessen. Dieser wird über Fourier-Transformation in ein Frequenzspektrum umgewandelt. Der Vorteil der Single-Pulse-Sequenz liegt darin, dass durch den Verzicht auf Gradienten gradienten-bedingte Artefakte fehlen. Der Nachteil ist allerdings die fehlende Ortskodierung und so bezieht sich der FID auf die  $^1\text{H}$ -Resonanz der gesamten Probe im Messbereich.

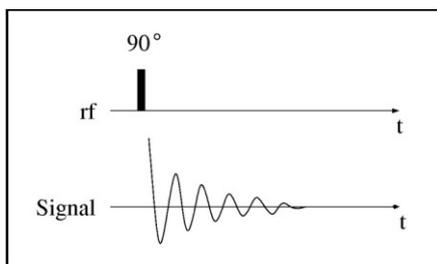


Abb.10 Single-Pulse-Sequenz, Zerfall nach einem  $90^\circ$ -Anregungspuls mit oszillierendem Signalabfall

## Gradienten-Echo-GRE-Sequenz

Für die  $T_2^*$ -Bestimmung verwendeten wir anfangs eine Gradienten-Echo-Sequenz (GRE). Leider erwies sich diese Sequenz zu anfällig für Artefakte, sodass wir stattdessen die oben beschriebene Single-Pulse-Sequenz anwandten, welche keine Artefakte durch Gradienten besitzt.

---

## 1.2 MR-Kontrastmittel

Um den Bildkontrast im Sinne einer Signalintensitätsdifferenz zu verbessern, werden wie in der Computertomographie oder der Sonographie Kontrastmittel eingesetzt. Die Besonderheit von Kontrastmitteln liegt in ihren physikalischen Eigenschaften. CT-Kontrastmittel besteht durch seine Röntgendichte<sup>114</sup>, Ultraschall-Kontrastmittel durch seine Schalldichte und NMR-Kontrastmittel durch seine magnetische Suszeptibilität. NMR-Kontrastmittel verbessern die diagnostische Aussagekraft, da sie die Sensitivität und Spezifität erheblich erhöhen<sup>13</sup>. Sie verstärken die Relaxation und führen so zu kürzeren Relaxationszeiten. Um einzelne NMR-Kontrastmittel unterscheiden zu können hinsichtlich ihrer Wirkung auf die  $T_1$ - oder  $T_2$ -Relaxation, sind sie durch ihre Relaxivität charakterisiert. Diese hängt von der Feldstärke, der Larmorfrequenz, der Temperatur und der Konzentration des Kontrastmittels ab<sup>108</sup>. Sie ist definiert als der jeweilige Kehrwert der  $T_1$ - bzw.  $T_2$ -Zeit geteilt durch die

Kontrastmittelkonzentration  $C$ .

$$r_1 = \frac{1}{T_1 * C} \quad r_2 = \frac{1}{T_2 * C}$$

Zu beachten sind bei der Relaxivitätsbestimmung allerdings auch äußere Faktoren, die auf die Kontrastmittel einwirken wie beispielsweise die Albuminbindung bei Gd-BOPTA, welche zu einer erhöhten Relaxivität im Blut führt<sup>108, S.97</sup>. Wenn man die Dosis-Wirkungs-Beziehungen von NMR-Kontrastmitteln betrachtet, so verhalten sich diese Kontrastmittel bei klinisch zugelassenen Dosisbereichen genauso linear wie Röntgenkontrastmittel. Da im MRT das Gewebe jedoch selbst sehr stark zum Kontrast beiträgt, welcher zum Beispiel beim CT fast ausschließlich durch das Röntgenkontrastmittel erzeugt wird, ist eine Vorher-Nachher-Messung notwendig, um zwischen Gewebe- und Kontrastmittel-Effekten unterscheiden zu können.

### 1.2.1 Klassifikation nach Magnetisierbarkeit

NMR-Kontrastmittel werden unterschiedlich eingeteilt. Die zunächst vorgestellte Einteilung richtet sich nach der Magnetisierbarkeit bzw. Suszeptibilität. Man

---

unterscheidet paramagnetische, superparamagnetische, ferromagnetische und diamagnetische Substanzen<sup>67</sup>.

Paramagnetische Substanzen enthalten Atome, welche in äußeren Elektronenschalen ungepaarte Elektronenorbitale besitzen. Dadurch entsteht ein magnetisches Moment, welches sie in einem externen Magnetfeld ausrichtet. Beispiele für solche Atome sind Gadolinium, Mangan oder Eisen<sup>73</sup>.

Superparamagnetische Kontrastmittel besitzen ein Kristallgitter, welches den Elektronen eine erhöhte Beweglichkeit erlaubt. Superparamagnetische Kontrastmittel stören das lokale Magnetfeld stark und bewirken eine Signalabschwächung in ihrer Umgebung, indem sie zu vermehrter Dephasierung führen<sup>3</sup>. Dies ergibt ihre starke magnetische Suszeptibilität.

Paramagnetische und superparamagnetische Substanzen unterscheiden sich in ihrem Verhalten innerhalb der MR-relevanten Feldstärken. Während die Magnetisierung von paramagnetischen Substanzen linear mit steigenden Flussdichten wächst, erreicht diejenige von superparamagnetischen ab Flussdichten über 1 Tesla schon einen Sättigungszustand, die Magnetisierung verläuft also nichtlinear. Unterhalb von 1 Tesla besitzen superparamagnetische Kontrastmittel zudem eine bis um den Faktor 1000 höhere Suszeptibilität als paramagnetische. Die Magnetisierung von paramagnetischen und superparamagnetischen Kontrastmitteln verschwindet, sobald auf sie kein äußeres Magnetfeld mehr einwirkt.

Verschwindet die Magnetisierung nicht, so handelt es sich um ferromagnetische Feststoffe mit Kristallgitter, welche ein permanentes magnetisches Moment haben wie beispielsweise Permanentmagnete aus Eisen. Diese Eigenschaft nennt man Remanenz.

Eine deskriptiv visuelle Einteilung von Kontrastmitteln unterscheidet zwischen positiven und negativen Kontrastmitteln. Positive Kontrastmittel führen zu einer Signalerhöhung im Bild und haben oft etwa gleich große  $r_1$ - und  $r_2$ -Relaxivitäten, während negative im Bild zu einer Signalabnahme führen und meist ein vielfach größeres  $r_2$  als  $r_1$  besitzen. Positive Kontrastmittel sind die in  $T_1$ -gewichteten Sequenzen eingesetzten Substanzen und negative Kontrastmittel finden in  $T_2$ -gewichteten Sequenzen ihre Verwendung.

---

Das verwendete VSOP zählt zu den superparamagnetischen Substanzen. Es zählt zu den negativen Kontrastmitteln, führt also zu einer Signalabnahme im Bild in T<sub>2</sub>-gewichteten Bildern und wird darum in T<sub>2</sub>-gewichteten Sequenzen eingesetzt<sup>45</sup>.

### 1.2.2 Komplexe

Einige Kontrastmittel sind Komplexe, welche aus einem Zentralatom mit einzeln besetzten Elektronenorbitalen und entsprechenden Liganden bestehen. Sie werden meist als T<sub>1</sub>-Kontrastmittel verwandt. Eines der heute am meisten verwendeten und daher wichtigstes Zentralatom ist Gadolinium mit seinen 7 einzeln besetzten Elektronenorbitalen<sup>73</sup>. Da Gadolinium ein Ca<sup>2+</sup>-Antagonist ist und bei Bindung Ca<sup>2+</sup>-Kanäle blockieren würde, ist sein Einsatz nur in Komplexen erlaubt. Ansonsten würde es schon in kleinen Konzentrationen toxisch wirken. Die Komplexliganden können je nach Einsatzort und Einsatzweise variiert werden. So verlangt die MR-Angiographie nach anderen Liganden als ein Cine-MRT des Herzens. Um einer durch die Gleichgewichtsreaktion zwangsläufigen Freisetzung von Zentralatomen aus den Komplexen entgegenzuwirken, verabreicht man freie Komplexe im Überschuss, die die toxischen Substanzen abpuffern und komplexieren sollen<sup>108</sup>.

Beispiele für Liganden sind: DPA, DOTA, DTPA-BMA, HP-DO3A, BT-DO3A, BOPTA

### 1.2.3 Pharmakologie

Eine in der Medizin gängige Einteilung richtet sich nach der Pharmakologie und Gewebespezifität der Kontrastmittel. Extrazelluläre niedermolekulare wasserlösliche Kontrastmittel werden von intravaskulären höhermolekularen Blood-Pool-Kontrastmitteln unterschieden.

Zu der extrazellulären niedermolekularen wasserlöslichen Gruppe gehören Gadolinium-III-Komplexe wie Magnevist, Dotarem, Prohance, Gadovist, Multihance. Sie führen zu einer T<sub>1</sub>-Verkürzung und damit zu einer SI-Zunahme (SI = Signalintensität). Gemeinsam ist ihnen allen, daß sie die intakte Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden können sowie eine gute Nierengängigkeit besitzen

---

durch passive glomeruläre Filtration<sup>113</sup>. Dies führt zu einer Plasma-Eliminations-Zeit von 90 Minuten bei einer Verteilungs-Halbwertszeit von 2-5 Minuten<sup>59</sup>. Die Gefahr liegt in ihrer Plazenta-Gängigkeit und der Diffusion bzw. Sekretion in die Muttermilch. Aus diesem Grund und zur Risikominimierung werden allgemein NMR-Kontrastmittel im ersten Trimenon nicht verabreicht und während der Stillzeit sollte eine Stillpause von mindestens 24 Stunden nach Kontrastmittel-Applikation eingehalten werden<sup>42</sup>. Anaphylaxie ist selten, allerdings haben Asthmatiker hierfür ein erhöhtes Risiko. Eingesetzt werden diese Kontrastmittel in der dynamischen Bildgebung wie der 3-Phasen-MR-Angiographie, bei der arterielle, parenchymatöse und interstitielle Phase rasch hintereinander aufgenommen werden.

Die andere Gruppe sind die intravaskulären höhermolekularen Blood-Pool-Kontrastmittel. Sie haben eine lange Plasma-Verweilzeit und besitzen höhere molare Relaxivitäten als ihre niedermolekularen Pendanten. Wie jene durchdringen sie die intakte Blut-Hirn-Schranke nicht und sind deshalb ein guter Indikator für Schrankenstörungen, sei es tumorbedingt, traumatogen oder infektiös<sup>17, 106, 112</sup>. Da sie in der Zirkulation einen Steady-State erreichen - das heißt ihre Blutkonzentration bleibt für eine gewisse Zeit relativ konstant - können sie zu quantitativen Perfusionsmessungen herangezogen werden. Zu den Blood-Pool-Kontrastmitteln zählen Gadolinium-Chelate, Gadolinium-Makromoleküle (Dextrane, Polylysine) und Eisenoxid-Partikel wie SPIOs (Superparamagnetic Iron Oxide Particles) oder USPIOs (Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Particles). Dabei sind SPIOs als Partikel über 50nm und USPIOs als Partikel unter 50nm Durchmesser definiert<sup>58</sup>.

Das verwendete VSOP (Very Small Superparamagnetic Iron Oxide Particles) ist ein solches Blood-Pool-Kontrastmittel, ein USPIO. Es gehört darüberhinaus noch zu den RES-spezifischen Kontrastmitteln wegen seiner Affinität zu Makrophagen und damit zu den Targeted-Substanzen für Arteriosklerose-Plaques und Entzündungsherd-Markierung.

---

Über die genannten Einteilungen hinaus können Kontrastmittel nach dem jeweiligen Organsystem klassifiziert werden. Es gibt Hepatozyten-spezifische Kontrastmittel wie Primovist, welche an den hepatozytären Anionenrezeptoren ansetzen und biliär eliminiert werden, RES-spezifische Kontrastmittel, welche bevorzugt von Kupffer-Sternzellen phagozytiert werden wie beispielsweise die superparamagnetischen Substanzen Ferumoxide (Endorem) oder Ferucarbotran (Resovist). Das verwendete VSOP zählt zu den RES-spezifischen Substanzen, da es bevorzugt von Makrophagen oder Monozyten aufgenommen wird.

Lymphozyten-spezifische Kontrastmittel sind USPIOs oder MIONs (Monocrystalline Iron Oxide Nanocolloid)<sup>61</sup>. Targeted-Kontrastmittel binden an ausgewählte Ziel-Epitope wie Arteriosklerose-Plaques oder MS-Plaques (darunter fallen auch die USPIOs zum Entzündungs-Tracking). In der Gastroenterologie bedient man sich kompartmentfüllender Kontrastmittel wie Buscopan oder Bariumsulfat. Zu erwähnen sind noch tumorspezifische Kontrastmittel.

Bevor auf den Abbau der verwendeten Eisenoxidpartikel näher eingegangen wird, soll kurz der Eisenhaushalt des Körpers erläutert werden. Der normale Eisenspeicher des Körpers enthält 3,5g Eisen<sup>59</sup>. Ein Drittel davon ist gebunden als Speichereisen in Ferritin und Hämosiderin, in Myoglobin und eisenhaltigen Enzymen. Zwei Drittel davon ist in Hämoglobin gebunden<sup>54, S.192</sup>. Der tägliche Bedarf beträgt beim Mann 10mg, bei der Frau 15mg bei einem täglichen Verlust von 1mg beim Mann und 2mg bei der Frau durch Darmepithelmauserung und Menses<sup>54</sup>. Das Eisen befindet sich in Nahrungsmitteln in Form von gut resorbierbarem Hämeisen, duodenal resorbierbarem Fe<sup>2+</sup> und nicht-resorbierbarem Fe<sup>3+</sup>. Eisenüberfluss führt zur Minderepression von IRE-BP, welches die Transferrin-mRNA stabilisiert. Bei Eisenmangel induziert IRE-BP die Transferrin-Expression<sup>43</sup>.

Citrat-umhüllte Eisenoxidpartikel werden in Makrophagen lysosomal abgebaut. Das Citrat findet Eingang in den Citratzyklus, das Eisen gelangt in den Eisenspeicher und wird in Hämoglobin eingebaut. Sogar eine Therapie einer

---

Eisenmangelanämie ist dadurch möglich<sup>109</sup>. Nach einer Kontrastmittelapplikation bleibt der Transferrin-Spiegel unverändert, während der Ferritin-Spiegel nach 2-8 Tagen nach Kontrastmittelapplikation ansteigt<sup>2, 101</sup>. Nach 20 Tagen können im MRT noch intrazellulär Hypointensitäten erkennbar sein<sup>106</sup>.

Um einen Eindruck über die Dimension einer Kontrastmittelinjektion zu bekommen: 120mg Eisen injiziert in einen 70kg-Patienten macht 3,5% des Körpereisens aus<sup>59</sup>.

## 1.3 Makrophagen und Zellkultur

### 1.3.1 Makrophagen

Unsere Experimente beschäftigen sich mit Makrophagen. Makrophagen gehören der Gruppe der Leukozyten, der kernhaltigen Blutzellen, an und sind Phagozyten und damit wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunität, der „innate immunity“. Sie sind wie Lymphozyten mononukleäre Zellen und ihre direkten Vorläufer sind die Blut-Monozyten. Monozyten machen im Differentialblutbild normalerweise 4-10% der 4000-10000 Leukozyten/ $\mu$ l Blut aus, also 400-1000/ $\mu$ l<sup>14, S.255</sup>. Sie verwandeln sich in verschiedenen Geweben in die unterschiedlichsten Arten von gewebeansässigen Makrophagen: Epitheloidzellen, Mikroglia, Kupffer-Sternzellen, Alveolarmakrophagen, Osteoklasten, Chondroklasten, Langerhans-Zellen, Histiozyten, Hofbauerzellen. Ihre Aufgabe reicht von der Beteiligung in Entzündungsprozessen über Knochenmetabolismus und Angiogenese bis hin zur Wundheilung. Aktiviert werden Makrophagen durch Lipopolysaccharide (LPS), Peptidoglycane, bakterielle Lipoproteine, Zymosan, Flaggelin über  $F_{cy}$ , Complement- oder Scavenger-Rezeptoren oder durch Zytokine wie  $INF_{\gamma}$ , IL-1, IL-6 oder IL-12. Bei Aktivierung richten sich die Makrophagen entlang dem Chemokingradient aus. Die Ursache hierfür ist die Polarisierung des Aktinzytoskeletts und das Entstehen eines intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Gradients, welcher Einfluss auf die Mikrotubuli-Polymerisation hat<sup>55</sup>. Der Makrophage beginnt sich der Chemokin- bzw. Zytokinquelle entgegen zu bewegen. Makrophagen phagozytieren den betreffenden Krankheitserreger, den Zellabfall oder die überalterte Zelle und

---

fungieren anschließend über ihr MHC-II-Molekül als „Antigen-präsentierende Zelle“ (APC) gegenüber den CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten.

Die Größe eines Makrophagen beträgt etwa 15-20 µm. Er besitzt unter anderem folgende Oberflächenproteine: CD14, CD16, MAC1, MAC2, MAC3, CD64, CD68, CD115 oder CD204 <sup>1</sup>.

Die Monozytopoese läuft folgendermaßen ab: die pluripotente Stammzelle differenziert sich zur CFU-GEMM (CFU = colony forming unit), deren Nachfolger Granulozyten (G), Erythrozyten (E), Monozyten (M) und Megakaryozyten (M) sind. Diese CFU-GEMM vertritt die myeloische Reihe - im Gegensatz zur lymphatischen Reihe. Auf dem Weg zum Makrophagen differenziert sich die CFU-GEMM zur CFU-GM, der koloniebildenden Einheit für Granulozyten (G) und Makrophagen (M). Aus dieser entstammt die CFU-M, die direkte Vorläuferzelle des Monoblasten, Promonozyten und schließlich Monozyten. Der Monozyt verlässt das Knochenmark und zirkuliert etwa 3 Tage im peripheren Blut, bis er schließlich ins Gewebe einwandert und zu einem ortsständigen Makrophagen wird<sup>31</sup>.

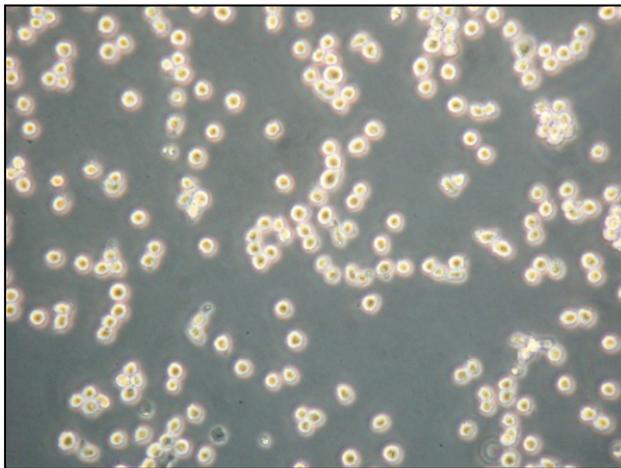


Abb.11 Peritoneale Mausmakrophagen PMJ2-R (American Type Culture Collection [CRL-2458], Manassas, VA, USA) beim Blick durch das Phasenkontrastmikroskop (20x)

### 1.3.2 Die Zellkultur

Die hier angewandte Zellkultur unterscheidet sich von Primärkulturen dadurch, dass immortalisierte Zellen und nicht primär aus dem Organismus extrahierte unveränderte Zellen eingesetzt werden, deren Lebensspanne durch die natürliche Seneszenz stark begrenzt wäre. Die Ursprünge der Zellkultur liegen

---

im späten 19. Jahrhundert: im Jahr 1885 gelang es Wilhelm Roux erstmals zu zeigen, dass embryonale Hühnerzellen in einer Salzlösung überleben können<sup>78</sup> und 1913 belegte Alexis Carrel, dass Zellen durch die nötige Versorgung mit Nährstoffen mehrere Tage überleben und sogar wachsen können<sup>20</sup>. Die ersten immortalisierten Zellkulturen wurden 1952 mit einer humanen Zervix-Carcinom-Zelllinie namens HeLa, nach dem Namen ihrer Spenderin Helene Lange, begonnen<sup>84</sup>. Diese Zelllinie befindet sich bis dato immer noch in Kultur. 30 Jahre nach dieser ersten humanen Kultur war man bei der Erforschung von Stammzellen angelangt, 1981 fand erstmals die Isolierung und Kultivierung von murinen Blastozysten statt. Vorteil von Stammzellen ist ihre pluripotente Eigenschaft und die Fähigkeit, an ihren Einsatzort zu wandern, das heißt das Homing. Diese Migration kann man mittels MR-Tracking nachverfolgen, indem man die Zellen markiert und damit aus dem Hintergrund heraushebt. Hierdurch können die Zellen auch über einen längeren Zeitraum lokalisiert werden<sup>106</sup> und ihr Migrationsmuster kann dargestellt werden.

### **1.3.3 Zell-Labeling**

Es gibt verschiedene Ansätze für das Markieren von Zellen (= Labeling oder Labeln): Entweder liegen Zellen schon „in vitro“ vor oder sie können aus dem Körper „ex vivo“ extrahiert werden und „in vitro“ mit Kontrastmittel gelabelt werden, um anschließend in den Kreislauf „in vivo“ zurück-injiziert bzw. -infundiert zu werden. Der Vorteil hierbei ist die gezielte Markierung ausgewählter Zellen<sup>66</sup>. Eine andere Möglichkeit ist die Injektion von Kontrastmittel in die Zirkulation und dessen Internalisierung in bzw. Adhäsion an die Zellen „in vivo“.

Unter die Mechanismen, wie man Kontrastmittel in die Zellen bringt, fallen die Phagozytose<sup>23</sup> und die Magnetoelektroporation<sup>89</sup>. Unsere Arbeitsgruppe zeigte<sup>44</sup>, dass es für den USPIO-Uptake in atherosklerotische Plaques zwei Mechanismen geben kann: die passive Diffusion nach intimal und subintimal und die Aufnahme durch ortsständige Makrophagen oder der USPIO-Uptake über Neo-Gefäße oder Thrombosen. Für Makrophagen zeigten Corot et al.<sup>24</sup>, dass die Aufnahme von Kontrastmittel davon abhängt, ob die Oberfläche

---

geladen oder nicht geladen ist und dass es verschiedene Wege der Aufnahme wie Endozytose, Transzytose oder über undichte Neo-Gefäße gibt. Schulze et al.<sup>86</sup> wies auf einen lysosomalen Weg der Eisenoxidnanopartikel-Aufnahme hin und Fleige et al.<sup>28, 29</sup> fand USPIOs perinukleär vakuolär vor. Für die erleichterte Kontrastmittel-Aufnahme sind laut Bulte<sup>18</sup> und Kraitchman<sup>47</sup> Transfection-Agents wie Dendrimere, Poly-L-Lysin, Lipofectamin und FuGENE geeignet. Laut Frank et al.<sup>30</sup> finden auch Transferrin-Rezeptor-Liganden und HIV-Tat-Protein Verwendung. Dies wird durch Lewin et al.<sup>51</sup> bestätigt. Target-Kontrastmittel können Targets wie Annexin in der Apoptose-Detektion oder VCAM1 sein<sup>83, 92, 93</sup>. Thorek et al.<sup>104</sup> erweiterten das Target-Spektrum um Streptavidin, Avidin-Biotin, Transferrin-Rezeptor, MMP2, Her-2/2neu, Synaptotagmin und E-Selectin. In der Atherosklerose sind E-Selectin und VCAM-1 von eminenter Bedeutung, da sie im Entzündungsprozess eine große Rolle spielen. Der Entzündungsprozess selbst kann schließlich auch über die Myeloperoxidase-Aktivität, die über Radikalbildung zur Plaqueinstabilität beitragen soll, dargestellt werden<sup>93</sup>.

Die Elektroporation zeigt, wie von Kraitchman et al.<sup>47</sup> und Engberink et al.<sup>66</sup> beschrieben, bei Supravist gute Ergebnisse und beeinflusst die Viabilität der Zellen nicht.

## 1.4 Arteriosklerose

Arteriosklerose ist eine chronisch-entzündliche fibrodysplastische Krankheit mit Intima- und Mediaveränderungen in mittleren und großen Arterien aufgrund endothelialer Dysfunktion<sup>7, 76</sup>. Das Statistische Bundesamt bezifferte die Zahl der an Arteriosklerose erkrankten Menschen in Deutschland 2008 mit 202/100000 Einwohnern. Der Großteil der Erkrankten befand sich dabei jenseits des 45. Lebensjahrs (www.destatis.de, Statistisches Bundesamt Deutschland, Stand 12/2010). Irreversible Risikofaktoren sind Alter über 40 Jahren, männliches Geschlecht, Hyperlipoproteinämie, Homocysteinämie, Hypertonie. Potentiell reversible Risikofaktoren sind Rauchen, Diabetes mellitus, Adipositas, Chlamydia-pneumoniae-Infektion, psychischer und

---

emotionaler Stress<sup>38</sup>. Die Verlagerung der Alterspyramide führt zur Häufung der Risikofaktoren in der Bevölkerung. Allein die Diagnose Adipositas betrifft 45% der deutschen Frauen (mit regionalem Schwerpunkt in Sachsen-Anhalt / Thüringen) und 60% der deutschen Männer und nimmt mit dem Alter zu (GEDA 2009, Statistisches Bundesamt Deutschland). Die Komplikationen der Arteriosklerose wie cerebrovaskulärer Insult, ACS, pAVK und Aneurysmata sind in den westlichen Industrienationen die Todesursache Nummer 1<sup>93</sup>.

Durch endotheliale Dysfunktion wandern Makrophagen und glatte Muskelzellen subendothelial ein<sup>53, 74</sup> und führen aufgrund Mediaproliferation<sup>16</sup> zu exzentrischer Hypertrophie, das heißt Remodeling der Arterien. Zusätzlich lagern sich Low Density Lipoproteine (LDL) ab, werden oxidiert und glycosiliert und sorgen für die Rekrutierung zirkulierender Blutmonozyten, welche extravasieren und durch Phagozytose der LDL zu Schaumzellen werden<sup>53, 103</sup>. Es lagert sich Cholesterin als nadel- bis blattförmige Cholesterinkristalle ab<sup>55, 103</sup> und Kalksalze häufen sich an<sup>16, 34</sup>. Schaumzellen sezernieren Cytokine wie IL1 $\beta$  und TNF $\alpha$ , Wachstumsfaktoren wie M-CSF und Matrixmetalloproteinasen wie MMP-1/2/3/9. Granulozyten fehlen meist<sup>16</sup>. Besonders betroffen von arteriosklerotischen Ablagerungen sind Gefäßabgänge und Krümmungsbögen, deren Gefäßwand turbulenten Strömungen mit hoher Scherbeanspruchung ausgesetzt sind<sup>103</sup>. Im fortgeschrittenen Stadium bilden sich stabile Plaques mit zentral nekrotisierendem Lipidkern und fibröser Kappe<sup>103</sup>. Das Wachstum des Plaques und die resultierende Ausdünnung der fibrösen Kappe kann zu vulnerablen Plaques führen mit der Gefahr der Plaqueruptur, bei der thrombogene Plaquekomponenten mit dem Blut in Berührung kommen und zu einer arteriellen Thrombose oder arterio-arteriellen Embolie führen können<sup>6, 11</sup>.

Klinisch präsentiert sich das Bild einer Claudicatio intermittens bei Fontaine-Ratschow I-IV, einer Angina addominalis bis hin zu Mesenterialinfarkt, Leriche-Syndrom oder Symptomen an den anderen pAVK – Prädilektionsstellen<sup>36</sup>. Der heutige Goldstandard zur Diagnostik atherosklerotischer Läsionen ist die kontrastmittelgestützte Angiographie<sup>58</sup> und die Doppler-Sonographie<sup>16</sup>.

---

Laborchemisch sind als Screening-Parameter Fibrinogen und CRP anerkannt<sup>76</sup>. Nicht-invasiv konnten im MRT an hyperlipidämischen Kaninchen Plaques dargestellt werden. Dabei korrelierte der Kontrast mit der Makrophagenzahl und durch die eingesetzten SPIOs ergab sich eine signifikante T<sub>2</sub>- und T<sub>2</sub>\*-Verkürzung. Als Referenz diente die Histologie<sup>46</sup>. Einschränkungen erfährt die MRT allerdings durch Bewegungsartefakte, Hämorrhagien und Signalauslöschungen an Phasenübergängen, welche das Bild verfälschen können<sup>91</sup>. Erstmals gelang es 2006 Hofman et al. , die einzelnen Plaquekomponenten mittels MRT quantitativ und automatisiert darzustellen<sup>39</sup>. Herborn et al.<sup>35</sup> spricht hier von einem Shift von der luminalen zur muralen Bildgebung.

Es gibt die Einteilung der Arteriosklerose nach Pathogenese und die nach Lokalisation. Pathogenetisch unterscheidet man degenerative, entzündliche, mechanische und funktionelle Genesen. Nach Lokalisation lassen sich drei Typen unterscheiden: die Makroangiopathie an mittleren bis großen Arterien wie die pAVK, welche >90% arteriosklerotisch bedingt ist, die Mikroangiopathie der terminalen Strombahn aufgrund Diabetes, Entzündung und Dysfunktion und die Angioneuropathie bei fehlender Gefäßinnervation wie beim primären Raynaud-Syndrom<sup>74</sup>.

Therapeutisch wird eine Thrombozytenaggregationshemmung mit Acetylsalicylsäure oder Clopidogrel, eine Antikoagulation mit Cumarinen, eine antihypertensive Therapie mit ACE-Hemmern, Betablockern, Calciumantagonisten und Diuretika, eine Lipidsenkung mit Statinen oder Fibraten, eine Diabetestherapie mit oralen oder subkutanen Antidiabetika angestrebt. Ebenso hilfreich ist ein Hinwirken auf den Verzicht eines etwaigen Nikotinkonsums und eine „Lifestyle“-Änderung mit mediterraner Kost, Bewegung und ausgeglichener Lebensführung<sup>36</sup>.

2008 wurde erstmals die EDTA-Chelat-Therapie untersucht, bei der der Blutfluss verbessert und toxische Metaboliten im Blut komplexiert werden sollten. Einen eindeutigen Benefit konnten diese Studien jedoch nicht zeigen<sup>26</sup>.

---

In der kürzlich durchgeführten ATHEROMA-Studie konnte Tang et al.<sup>98</sup> zeigen, dass nach 12wöchiger Hochdosis-Atorvastatin-Therapie im MRT und im FDG-PET ein deutlicher Rückgang der Plaque-Entzündung sichtbar war sowie das HDL deutlich anstieg.

## **1.5 Fragestellung**

Ein wesentliches, aktuelles Ziel im Bereich der molekularen Bildgebung ist die Quantifizierung der intrazellulären Eisenbeladung und der lokalen Zelldichte über die Bestimmung der  $r_2$ - und  $r_2^*$ -Relaxivitäten. Die Methoden und Ergebnisse dieser Arbeit sollen die Basis für in-vivo Experimente zur Detektion und Quantifizierung von Makrophagen in entzündlichen Prozessen (z.B. Atherosklerose) liefern. Dazu werden folgende Fragestellungen bearbeitet.

### **1.5.1 Zell-Labeling**

Um reproduzierbare Protokolle für die weiteren Versuche zu erhalten, stellen sich im Vorfeld folgende Fragen: (a) Welches Eisenkontrastmittel eignet sich zum Labeling der von uns verwendeten murinen Peritonealmakrophagen ? (b) Wie hoch ist die Zellviabilität vor und nach dem Labeln ? (c) Ändert sich das Aufnahmeverhalten von Zellen für Eisennanopartikel mit Änderung der Zellpassage ?

### **1.5.2 Phantombau**

Für MRT-Messungen benötigt man sehr homogene Phantome, da zum einen über ein bestimmtes Volumen und nicht über die einzelne Zelle gemessen wird, zum anderen Suszeptibilitätssprünge in der Probe die Relaxivitätsmessung verfälschen würden. Unser Ziel ist es daher, ein Phantom herzustellen, das all dem Rechnung trägt durch ein geeignetes Einbett-Medium und die ideale Einbett-Methode.

---

### **1.5.3 Variation von Zelldichte und Eisenbeladung im Phantom**

Im Vergleich zu freiem Kontrastmittel ändert sich die gemessene Relaxivität von Eisenkontrastmittel mit zellulärer Internalisation<sup>45, 88</sup>. Ziel dieser Arbeit ist es, zu untersuchen, wie sich die Relaxationsraten bei Variation von zellulärer Eisenbeladung und Zelldichte ändern. Dazu ist es notwendig, Phantome mit unterschiedlichen Eisenbeladungen und Zelldichten über die Variation der Labelprotokolle genau definiert herzustellen.

### **1.5.4 MR-Relaxometrie zur Quantifizierung von $T_2$ und $T_2^*$**

Nach Etablierung definierter Phantome werden die Relaxationszeiten  $T_2$  und  $T_2^*$  mittels MR-Relaxometrie bestimmt und zur Eisenbeladung und Zelldichte in Relation gesetzt, um Zusammenhänge zwischen den 4 Parametern sichtbar zu machen. Ziel ist es schließlich, aus einer Messung von  $T_2$ ,  $T_2^*$  und der Eisenbeladung auf die Zelldichte schließen zu können.

### **1.5.5 Eisennachweis über Histologie (Färbungen)**

In der molekularen Bildgebung von heute werden überwiegend histologische Methoden als Referenz zur MR-Messung verwendet. Im Rahmen unserer Zielsetzung, Makrophagen durch MRT detektieren und quantifizieren zu wollen, stellt sich die Frage der Sensitivität des MRT im Vergleich zu konventionellen Eisennachweismethoden wie TEM, Histologie und ICPMS.

## **2. Material & Methoden**

Zur besseren Lesbarkeit dieses Abschnitts findet man alles verwendete Material und die genauen Materialinformationen in Kapitel 6.1 „Materialübersicht“ (Seite 101) aufgeführt.

---

## 2.1 Zellkultur

### 2.1.1 Mausmakrophagen

Als Zellmodell dienen uns peritoneale Mausmakrophagen PMJ2-R (American Type Culture Collection [CRL-2458], Manassas, VA, USA). Diese wurden mit dem J2-Retro-Virus transfiziert, dessen Genom die Onkogene v-raf und v-myc enthält<sup>1</sup>. Die Mausmakrophagen befinden sich, eingebettet in DMSO (Dimethylsulfoxid), seit 28.06.2000 eingefroren in flüssigen Stickstoff (77°K). DMSO verhindert trotz seiner toxischen Eigenschaften die Bildung von Eiskristallen, welche Zellstrukturen zerstören. Die Zellen befinden sich in der 40. Passage und erreichen nach 5-10 weiteren Passagen eine für die Messungen erforderliche stabile Zellfunktion, das heißt, sie resorbieren das Kontrastmittel gleichmäßig und ihre Viabilität ist stabil hoch. Die Zellen wurden bei der American Type Culture Collection typisiert und zeigen alle relevanten Zellfunktionen normaler nicht-transfizierter Makrophagen, was sie als Zellmodell geeignet macht. Unter diese Zellfunktionen fallen die Oberflächen-Antigen-Expression von Mac1+, Mac2+, Fc-Rezeptor+, F4/80+, Ly-5+ und die Makrophagen-typische Antwort auf Lipopolysaccharide: IL-6-Sekretion und Phagozytose-tätigkeit. Mit reversem murinem Interferon gamma (rmurINF $\gamma$ ) sind sie auch zur Expression von MHC-II auf ihrer Oberfläche anregbar<sup>1</sup>.

Murine Peritonealmakrophagen PMJ2-R ; ATCC [CRL-2458]
J2 Retro Virus (v-raf, v-myc)
Zeitpunkt des Einfrierens: 28.06.2000
Passage beim Einfrieren: 40
Oberflächenmarker: Mac1 +, Mac2 +, Fc-Rezeptor +, F4/80 +, Ly-5 +, IL-6-Sekretion bei Stimulation durch LPS +, MHC-II-Expression bei r-mur-INF $\alpha$ +

Tab.1 Makrophagenspezifikation

### das Auftauen der Makrophagen

Um die Makrophagen aufzutauen, wird zunächst eine Kulturflasche mit Medium im Kulturschrank bei 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre vorbebrütet, um die optimalen Lebensbedingungen für die Makrophagen zu schaffen. Die Makrophagen selbst

---

sind als DMSO-Zell-Suspension innerhalb eines 1,5-ml-Epi (Eppendorf-Tube) in flüssigem Stickstoff eingefroren (77°K). Um die Toxizität des DMSO in aufgetautem Zustand zu verringern, muss der Auftauvorgang schnell vonstatten gehen und das DMSO zügig aus den Zellen entfernt bzw. so verdünnt werden, dass keine toxische Konzentration mehr vorherrscht. Nach dem Auftauprozess im 37°C-Wasserbad werden die Zellen gewaschen, indem man die Suspension in Medium verdünnt, zentrifugiert und anschließend den Überstand abnimmt. Das zurückbleibende Zell-Pellet wird resuspendiert und die Zell-Suspension in die vorbebrütete Kulturflasche pipettiert.

### **2.1.2 das Medium**

Das Medium wird aus nachfolgend genannten Chemikalien, Aqua bidest, FCS (fetal calf serum), L-Glutamin und zur pH-Regulation mit HCl bzw. NaHCO<sub>3</sub> hergestellt. Alle folgenden Angaben beziehen sich auf die Herstellung von 1 Liter Medium. Da FCS im gefrorenen Zustand gelagert wird und L-Glutamin unter Kühlschrankbedingungen, müssen beide zunächst im 37°C-Wasserbad aufgewärmt werden. Man wiegt 13,4 g DMEM-HG (Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose), 1,5 g NaHCO<sub>3</sub> und 1,19 g HEPES (Hydroxy-Ethyl-Piperazinyl-Ethan-Sulfonsäure zur pH-Pufferung) ab, resuspendiert alles gemeinsam in einem Becherglas mit 950 ml Aqua bidest und stellt dieses mit einem Rührfisch auf einen Magnetrührer, um eine gleichmäßige Durchmischung zu erhalten. DMEM führt zu höheren Proliferationsraten von Mausmakrophagen als RPMI 1640, wie Thet et al. zeigten<sup>102</sup>. Für die anschließende Einstellung von pH 7,20 kalibriert man zunächst das pH-Meter mit einer pH 7- und anschließend einer pH 10-Lösung, gibt anschließend die pH-Sonde in die Mediumvorlage und fügt bis zum gewünschten pH entsprechend ein paar Tropfen Salzsäure oder Natronlauge hinzu. Ist der pH 7,20 erreicht, entfernt man den Rührfisch und füllt das Medium mit Aqua bidest bis auf 1000 ml auf. Um diese Mediumvorlage keimfrei zu machen, filtriert man sie durch einen 0,45µm-Filter direkt in eine gebrannte dampfsterilisierte Flasche.

---

Abschließend folgt die Zugabe von 50 ml inaktivem FCS und 10 ml L-Glutamin. Wie von Blasi et al.<sup>8</sup> bei murinen J2-infizierten Knochenmarkszellen beschrieben, werden keine zusätzlichen Wachstumsfaktoren für die Kultur benötigt. Gelagert wird das Medium bei 4°C im Kühlschrank. Für die Kultur und die Versuche wird es im 37°C-Wasserbad aufgewärmt.

### **2.1.3 Kulturbedingungen**

Die Zellen werden unter 37°C, 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und einer 60%igen Luftfeuchtigkeit kultiviert. Dabei verwendet man Zellkulturflaschen der Größen 25 cm<sup>2</sup>, 75cm<sup>2</sup> und 175cm<sup>2</sup>.

### **2.1.4 der Trypanblau-Test**

Um die Zellviabilität und die Schädigung durch das Kontrastmittel oder die Pipettiervorgänge zu überprüfen, wird nach jedem Labeling der Trypanblau-Test durchgeführt. Hierbei werden die zu zählenden Zell-Suspensionen mit Trypanblau in dem Verhältnis 1:20 versetzt. Trypanblau färbt Zellen blau, wenn die Integrität der Zellmembran nicht mehr gegeben ist.

Beim Auszählen mit der Neugebauer-Zählkammer kann durch die Blaufärbung des Zytoplasmas auf die Schädigung der Zelle geschlossen und die geschädigten Zellen mit den nichtblaugefärbten gesunden Zellen in Relation gesetzt werden. Der Quotient aus geschädigten und intakten+geschädigten Zellen ergibt die Viabilität.

### **2.1.5 das Labeling**

Labeling oder Labeln ist die Anwendung von Kontrastmittel an Zellen im Allgemeinen und in unserem Fall an den Makrophagen. Es geschieht bei bestimmten Kontrastmittelkonzentrationen, verschiedenen Zelldichten und über einen definierten Zeitraum, in unserem Protokoll 4 Stunden. Danach wird das verbliebene extrazelluläre Kontrastmittel durch Waschen wieder aus der Makrophagen-Suspension entfernt. Zu den Labelbedingungen zählen eine gleichbleibende Temperatur von 37°C in einer 5%igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und

---

60%ige Luftfeuchtigkeit – dies entspricht normalen Kulturbedingungen für die Makrophagen.

Aufgrund bestehender Vorversuche zeigt sich bei Konzentrationen um die 100 µg/ml Medium eine gute Zellvitalität und die mittlere Eisenaufnahme liegt reproduzierbar bei 1,33 pg/Zelle<sup>45</sup>. Davon ausgehend entschieden wir uns bei unseren Protokollen für eine gleichmässige Verteilung der Labelstärken. Folgende 12 Labelstärken ober- und unterhalb dieses Wertes sind Teil unseres Protokolls: 6, 12, 25, 37, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250 µgFe/ml.

Nach Abzentrifugieren der Zellen bei 1200 rpm für 5 Minuten werden die Zellen aus allen Kulturflaschen „gepoolt“, d.h. zusammengeführt, um sie zählen zu können. Dies erfolgt unter einem Polarisationsmikroskop mithilfe einer Neugebauer-Zählkammer. Dazu nimmt man eine definierte Menge der Zellsuspension, verdünnt sie mit einer definierten Menge an Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) und Trypanblau, gibt das ganze auf das Zählgitter und bestimmt lichtmikroskopisch die Zellzahl. Folgende Formel dient der Berechnung der Zellzahl mithilfe der Neugebauer-Zählkammer:

$$\mathbf{Zellzahl}_{\text{gesamt}} = \frac{\mathbf{Zellzahl}_{\text{gezählt}}}{4} * 10^4 * \mathbf{Faktor}_{\text{Verdünnung}} * \mathbf{Volumen}_{\text{Probe}} * \frac{1}{\text{ml}} \quad (1)$$

Volumen<sub>Probe</sub> wird in ml angegeben. Aus der errechneten Zellzahl erhält man per Dreisatz das Volumen, welches 1\*10<sup>8</sup> Zellen enthält. Dieses wird in eine neue Kulturflasche pipettiert und dort mit Medium auf 30ml aufgefüllt.

Durch Festlegung auf 1\*10<sup>8</sup> Zellen in 30ml Medium gewährleistet man gleiche Versuchsbedingungen bezüglich Zelldichte bzw. Konzentration während aller Labelprotokolle.

Neben 1\*10<sup>8</sup> Zellen für das Eisenlabeling wurde pro Versuch auch eine jeweils unterschiedliche Zahl an Zellen ungelabelt belassen. Diese waren für Röhrchen 19 und 20 im Versuchsprotokoll bestimmt. Näheres zu diesen ungelabelten Zellen findet sich in Kapitel 3.2 „Phantombau“.

---

## VSOP

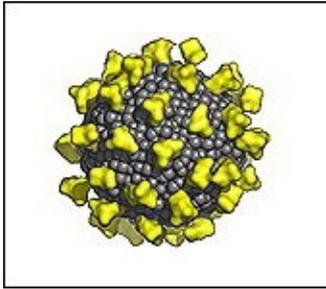


Abb.12 VSOP C-200. Strukturbild mit Citrat-Mantel (gelb) und Eisenoxid-Kern (grau). Mit freundlicher Genehmigung von FerroPharm, Teltow, Germany

Zu  $1 \cdot 10^8$  Makrophagen in 30ml Medium wird das Kontrastmittel VSOP-C200-in-vitro (FerroPharm GmbH, Teltow, Germany) hinzupipettiert. Es gehört zu den ultrakleinen superparamagnetischen Eisenoxid-Partikeln (USPIO) und besitzt ein Citrat-Coating<sup>45</sup>. Ummantelungen dienen der Stabilisierung der Kontrastmittel und verhindern die Aggregation im Erdmagnetfeld und in künstlichen Magnetfeldern. Sie stellen eine elektromagnetische und sterische Barriere dar<sup>69</sup>. Der Vorteil des negativ geladenen Citrats liegt im Gegensatz zu neutralen Dextran-Ummantelungen in der besseren Steuerbarkeit der physikalischen und biologischen Parameter bei der Herstellung<sup>4</sup>. Ausserdem fällt das erhöhte Anaphylaxierisiko von Dextranen weg<sup>73</sup>. Der Kern von VSOP-C200 hat einen Durchmesser von 4-6 nm und besteht aus  $\text{Fe}^{2+}$ - und  $\text{Fe}^{3+}$ -Molekülen, welche in kristalliner Spinell-Struktur angeordnet sind. Der Gesamtdurchmesser der ummantelten Partikel liegt bei 8nm, der hydrodynamische Durchmesser bei 12nm<sup>100</sup>. Grund für die geringe Teilchengröße sind die Erhöhung der Temperaturen und des Drucks bei der Herstellung<sup>69</sup>. Die geringe Größe führt systemisch zu längerer Zirkulation, das heißt intravaskulärer Verweilzeit, und daher gleichmäßigeren Aufnahme in die Makrophagen. Geliefert wird VSOP C200 in einer wässrigen Suspension mit einem Fe-Gehalt von 0,5 [mol Fe/l], dies entspricht bei einer molaren Masse von 56 [gFe/molFe] dann 28 [mg Fe/ml]. Es ist filtriert, hitzesterilisiert und mit 6% Mannitol versetzt, um den osmotischen Druck aufrechtzuerhalten.

### 2.1.6 der Waschvorgang

Um Reste nicht aufgenommenen Kontrastmittels und überschüssiges Medium zu entfernen, wurden die Zellen zweimalig mit PBS gewaschen. Dazu wird nach

dem Labeling die Zell-Medium-Suspension zentrifugiert und der Überstand vorsichtig mittels Pasteurpipette abgenommen, um das Pellet in PBS zu resuspendieren und das ganze wieder abzuzentrifugieren. Diese Schritte werden dreimalig durchgeführt. Zuletzt wird das Zellpellet mit PBS resuspendiert.

### 2.1.7 quantitative Aufarbeitung der Makrophagen

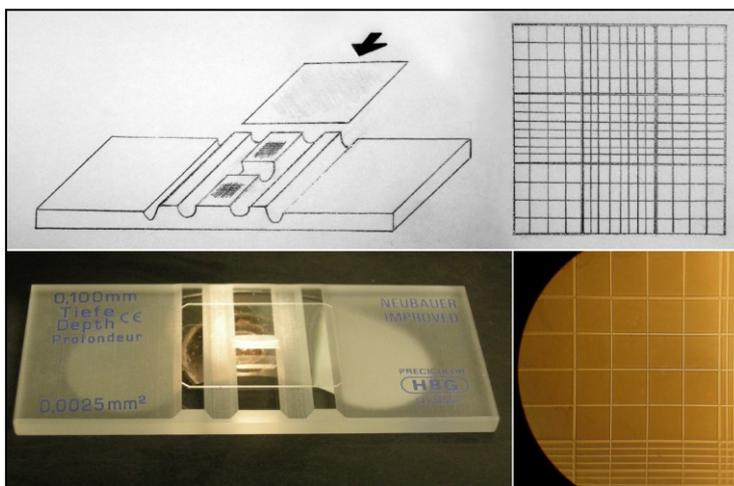


Abb.13 Neubauer-Zählkammer mit 3 Stegen und Deckglas (Pfeil). Oben rechts: Schematische Darstellung des Zählgitters mit 4 peripheren Feldern zu 4 x 4 Einzelfeldern. Unten rechts: Photographische Detailaufnahme eines peripheren Feldes

Die quantitative Bestimmung der Zellzahl geschieht mittels Neubauer-Zählkammer. Diese ist in 4 gleichgroße Quadrate zu je 16 kleinen Unterquadraten unterteilt. Die innerhalb und auf zweien der vier Außenlinien liegenden Zellen zählt man zusammen. Für die Trypanblau-Färbung verwendet man 5 $\mu$ l Zellsuspension und vermischt sie mit 45 $\mu$ l PBS. Danach fügt man noch 50 $\mu$ l Trypanblau hinzu. Insgesamt hat man dann die Zellsuspension 1:20 verdünnt. Nach der Färbung kann man so die gesunden hellen und die defekten blaugefärbten Zellen getrennt auszählen. Um auf die Zellzahl zu kommen, wendet man Formel (1) an.

Nach dem Auszählen werden die Volumina, welche der gewünschten Zellzahl entsprechen, berechnet und die Zellen in einzelne 15ml-Nunc®-Röhrchen pipettiert. Dabei zeigt sich das Problem, dass Makrophagen nach Zentrifugation leicht aggregieren und Zellklumpen bilden. Vermeiden lässt sich dies mit vorsichtigem Vortexen und einer Minimierung der Bearbeitungszeit und

---

Transferzeit ins MRT. Nach einigen Vorversuchen wurde ein standardisiertes Labeling-Protokoll festgelegt. Dieses ist im Anhang zu finden (Kapitel 6.2).

## **2.2 Makrophagen-Präparation (Phantombau)**

Bei der Entwicklung des Phantoms liegt der Schwerpunkt auf einer homogenen Verteilung der Zellen innerhalb des Einbettmediums. Dies ist besonders wichtig, da jede Inhomogenität Einfluss auf  $T_2^*$  hat und damit die Ergebnisse verfälscht werden könnten. Zur Einbettung der Makrophagen wurden Ficoll, Hydrogel und Agar untersucht.

### **die Zubereitung von Ficoll-Phantomen**

Ficoll ist ideal für eine Makrophagen-Suspension, da es elektrisch neutral ist und eine erhöhte Dichte von 1-1,2 g/ml besitzt. Dies lässt Zellen darin schweben ohne Absinken, welches bei der MR-Messung nicht erwünscht ist. Diese Eigenschaft wird auch bei der Gelelektrophorese ausgenutzt, hier dient Ficoll als DNA-Ladepuffer auf Agarosegelen, damit die DNA nicht aus den Taschen herausdiffundiert. Es wird synthetisiert aus hochverzweigten Polysacchariden (Saccharose + Epichlorhydrin), hat ein Molekulargewicht von 400 kDa und zeichnet sich dadurch aus, dass es Membranen nicht permiiert und damit nicht zu Zellhydrops und möglichem Platzen der Zelle führt.

Um die Ficoll-Zell-Suspension herzustellen, wird nach dem Waschen der Zellen mit PBS der Überstand abgenommen, sodass das Zell-Pellet übrig bleibt. Anschließend wird Ficoll daraufgegeben, um das Austrocknen und damit den Zelltod der Makrophagen zu verhindern. Die MR-Messung beginnt gleich im Anschluss innerhalb 10 Minuten. In der MRT werden die NMR-Röhrchen sowohl in vertikaler als auch in horizontaler Lage durchgemessen.

### **die Zubereitung von Hydrogel-Phantomen**

Hydrogel wird hergestellt aus Kollagen-Typ-I und einer Zell-Neutralisations-Lösung. Um es gut verarbeiten zu können, benötigt man niedrige Temperaturen. Deshalb wird auf Eis gearbeitet. Zunächst wird nach dem

---

Waschen mit PBS der gesamte Überstand über dem Zell-Pellet abgenommen, anschließend das Pellet in Gelneutralisationslösung resuspendiert, dann die doppelte Menge Kollagen-Typ-I dazupipettiert (1 Teil Neutralisationslösung auf 2 Teile Kollagengel)<sup>37</sup>. Es werden möglichst luftblasenfrei Kollagen, Neutralisationslösung und Zellen vermischt und in das 5mm-NMR-Röhrchen pipettiert, da Luftblasen in der MRT zu Artefakten führen. Um doch entstandene mikroskopische Luftblasen herausdiffundieren zu lassen, ruhen die Phantome noch einen Tag. Der Versuch mit der Entlüftung mithilfe einer Vakuumpumpe hat gezeigt, dass das Hydrogel dadurch stark aufquillt.

### **die Zubereitung der Agar-Phantome**

Der aus dem Malaiischen stammende und unter E 406 oder Japanischer Gelatine in der Lebensmittelindustrie bekannte Agar, ein lineares Galactose-Polymer aus Rotalgen, hat sowohl makroskopisch als auch lichtmikroskopisch ein transparentes Aussehen. Der verwendete Agar Typ Ib hat einen Gelierpunkt von  $36 \pm 1,5$  °C bei 1,5%iger Konzentration und einen Schmelzpunkt von  $86 \pm 2,0$  °C. Gelier- und Schmelzpunkt liegen auseinander, da das Temperaturverhalten des Agars eine Hysterese-Kurve beschreibt. Ein Marker für die Reinheit ist der Sulfatgehalt, der im Agar Typ Ib unter 0,12% liegt<sup>87</sup>.

Die Agar-Phantome bestehen aus Agar-Typ-Ib in NaCl 0,9% und den gewaschenen Zellen. Zunächst werden 300µg Agar Typ Ib in 10ml NaCl 0,9% aufgelöst. Zu 50ml 90°C-heißem kochendem Wasser hinzugegeben, ergibt sich 0,5%iger Agar. Unter gleichmäßigem Rühren wird der Agar für ca. 5 Minuten zum Kochen gebracht, um anschließend kontrolliert langsam auf 52°C abzukühlen. Die Zellen, welche in PBS gelöst von der Zellkultur zum MRT transportiert wurden, werden mit 1200 rpm für 5 Minuten zu einem Zell-Pellet zentrifugiert, der PBS-Überstand bis auf die letzten 100µl abgenommen. Zu dem Zell-Pellet fügt man 400µl 52°C-warmen Agar hinzu, mischt das ganze luftblasenarm mit der Pipette und pipettiert das ganze in ein 5mm-NMR-Röhrchen aus Glas mit 4mm Innendurchmesser.

Die erhaltenen Phantome werden anschließend in den Phantomhalter (Kapitel 2.5.1) eingebaut.

---

## 2.3 Histologie

Die Lichtmikroskopie hat in unserem Setting mehrere Aufgaben:

- 1) Sie soll die Integrität der Zellen nach dem Label-Vorgang sowie die gleichmäßige Verteilung im Hydrogel bzw. Agar nachweisen
- 2) Sie dient der Quantifizierung der gelabelten und nichtgelabelten Zellen.

Für Punkt 1) wird die HE-Färbung angewendet. Sie ist nicht speziell eisenspezifisch, sondern dient dazu, Zellen in den Paraffin- und Gefrierschnitten besser sichtbar zu machen. Punkt 2) wird mit 3 verschiedenen Färbemethoden untersucht: der Preußisch-Blau-Färbung, welche sensitiv intrazelluläres Eisen darstellt, deren DAB-Verstärkung und der Ag-Au-Färbung. Hierbei dient die Preußisch-Blau-Färbung stets als Fundament, auf das die DAB-Verstärkung (englisch „DAB-Enhancement“) und die Ag-Au-Färbung aufgepfropft werden.

Für die histologische und zytologische Untersuchung werden Paraffinschnitte, Gefrierschnitte, Epon-Schnitte und Ausstriche angefertigt.

### 2.3.1 der Paraffinschnitt

Um die gleichmäßige Verteilung der Zellen im Agar nachzuweisen, werden die Zellen in Paraffin eingebettet mikroskopiert. Dazu wird beim fertigen Phantom das Agar-Zell-Gel aus dem NMR-Röhrchen entnommen, zur Fixierung in 4%iges Paraformaldehyd (PFA) eingelegt, anschließend in flüssigem Paraffin eingebettet geschnitten und HE und Preußisch Blau gefärbt. Als Konzentrationen dienen hierbei  $2 \cdot 10^5$ ,  $4 \cdot 10^5$ ,  $6 \cdot 10^5$ ,  $8 \cdot 10^5$  Zellen auf 500  $\mu$ l Agar.

Die Preußisch-Blau-Färbung wird im Abschnitt 2.3.2 „der Ausstrich“ erläutert.

### HE-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin (HE) – Färbung beginnt mit Entwässerung des Agar-Zell-Gels in aufsteigender Ethanolreihe mit anschließender Xylol-Überschichtung. Daraufhin inkubiert man zunächst mit Xylol-Amylacetat und dann

---

mit Amylacetat, um schließlich das Gel mit Paraffin zu durchtränken und in Blockform zu gießen. Nach dem Aushärten wird der Paraffinblock mittels Schlitten-Mikrotom (Leitz, Wetzlar, Germany) in 1µm-Schnitte geschnitten. Zur Entfernung des Paraffins werden diese für 1-2 Stunden in einen 60°C heißen Wärmeschrank gelegt, sodass das Paraffin vom Objektträger rinnt. Die Schnitte werden im Anschluss für 9 Minuten mit einer Hämatoxylinlösung, bestehend aus 6g Hämatoxylin / 1g Natriumiodat / 250g Kaliumsulfat / 250g Chloralhydrat / 5g Citronensäure ad 500ml Aqua dest inkubiert. Es folgt ein kurzes Spülen mit Aqua dest.

Das Hämatoxylin bewirkt eine Blau-Färbung basophiler Zellstrukturen wie des Chromatins und der Mitochondrien. Zum Differenzieren, d.h. Entfärben der nicht-interessierenden Strukturen, wird im Anschluss ein 1:1-Gemisch aus 0,25%iger Salzsäurelösung und 50%igem Ethanol für nicht mehr als 3 Sekunden über den Paraffinschnitt gegeben und für 10 Minuten in Leitungswasser gebläut. Das Bläuen ist eine Komplexierung der Leitungswasserionen mit dem Hämatoxylin. Nach 2minütiger Inkubation in 1%iger Eosin-Lösung zur Rot-Färbung des Zytoplasmas und anderer acidophiler Zellbestandteile wird mit Aqua dest gespült und mit einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 90%, 95%) jeweils kurz (3sec) entwässert. Die Überführung in Isopropanol für zweimal 5 Minuten und Xylol für zweimal 5 Minuten bereitet die abschließende Einbettung in Entellan vor.

Neben den Paraffinschnitten werden auch Gefrierschnitte angefertigt. Hierbei wird das Zell-Agar-Gel eingefroren und anschließend mittels Gefrier-Mikrotom geschnitten. Dies dient dazu, eine bei der Paraffineinbettung durch die Hitze des Paraffins mögliche Manipulation des Agar-Zell-Gelzylinder-Außenrands sichtbar zu machen.

### **2.3.2 der Ausstrich**

Durch einen Ausstrich lassen sich Zellen lichtmikroskopisch untersuchen. Dazu wird eine Zellsuspension mithilfe einer Objektträgerkante langsam über einen anderen Objektträger gezogen. Der Vorteil ist dabei die abnehmende Dichte an

---

Zellen, sodass der Betrachter sich zur qualitativen Beurteilung von Zell- und Kernform und Reifestadium einen Abschnitt mit vielen einzeln stehenden Zellen aussuchen kann. Da uns neben der qualitativen Aussage „eisenbeladen/nicht eisenbeladen“ auch die quantitative Aussage „wie viele sind eisenbeladen“ interessiert, wählten wir, als eine andere Form des Ausstrichs, zusätzlich die Zytospin-Methode<sup>66</sup>, mit der eine definierte Zellzahl auf ein kreisrundes Areal auf dem Objektträger von 5mm Durchmesser bei 400rpm für 5min aufzentrifugiert wird, bei uns  $5 \cdot 10^4$  Zellen in 50µl PBS. Die aufzentrifugierten Zellen werden luftgetrocknet und anschließend Preußisch Blau gefärbt.

### **Preußisch-Blau- (PB)-Färbung**

Die Preußisch-Blau-(PB)-Färbung ist auch unter „Berliner-Blau-Färbung“ oder „Prussian Blue Staining“ bekannt. Sie ist Standardmethode für die Darstellung intrazellulären Eisens und somit auch von VSOPs. Bei der PB-Färbung erfolgt zunächst die Inkubation mit einer 1:1-Mischung aus 2%iger wässriger Kalium-Ferrocyanid-Lösung und 2%iger Salzsäure. Nach 30 Minuten wird mit Aqua dest gewaschen und für 5 Minuten Kernechtrot daraufgegeben. Daraufhin folgt die Entwässerung mit 70%, 90%, 95% Ethanol kurz hintereinander und Eindecken mit Isopropanol für zweimal 5 Minuten. Nach weiteren zweimal 5 Minuten in Xylol folgt die Eindeckung mit Entellan.

Schroeter et al.<sup>85</sup> zeigten, dass der gängige Nachweis von Eisen-Oxid-Partikeln durch die PB-Färbung in experimenteller cerebraler Ischämie bei Ratten an Sensitivität entbehrt und schlug daher vor, die PB-Färbung mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) zu verstärken.

### **Diaminobenzidin-(DAB)-Enhancement**

Diaminobenzidin färbt Eisenbestandteile dunkelbraun bis schwarz und gibt einen deutlichen Kontrast zu fast farblosen eisenlosen Zellen. Hierzu dient der DAB Substrate Kit for Peroxidase, wobei in unserer Arbeit der Arbeitsschritt mit der Peroxidase ausgelassen wird.

---

### **Silber-Gold-(Ag-Au)-Färbung**

Zur weiteren Verstärkung des Farbsignals wird eine Silber-Gold-Färbung (Ag-Au-Färbung) angewandt. Hierzu wird der Methenamin-Versilberungskit nach Gomori verwandt, welcher Periodsäure-Lösung, Silbernitrat-Lösung, Methenamin-Borat-Tabletten zum Ausfällen von metallischem Silber in einem Fe/DAB-Komplex, sowie Goldchlorid-Lösung und Natriumthiosulfat-Lösung (zum Bleichen) enthält.

### **Zellfixierung**

Die anschließende Eindeckung erfolgt zunächst mit Rotihistol, einem Terpen aus unbehandelten Orangenschalen, das vor Brüchigkeit schützt, und Entellan, einer in Xylol gelösten Kunstharz-Polymerlösung.

### **2.3.3 TEM – Transmissions-Elektronen-Mikroskopie**

Die durchgeführte Lichtmikroskopie weist zwar intrazelluläres Eisen nach, jedoch kann sie über die intrazelluläre Lokalisation und den Internalisierungs-Modus der Eisenpartikel keine Aussagen treffen. Dazu dient die Transmissions-Elektronen-Mikroskopie.

Das erste Transmissions-Elektronen-Mikroskop wurde 1931 von Ruska et al. entwickelt<sup>79</sup> und 1935 folgte das erste Raster-Elektronen-Mikroskop zur Oberflächenabtastung. 20 Jahre später, 1957, beschrieb Robertson mithilfe der Elektronenmikroskopie als Erster den dreischichtigen Aufbau der Zellmembran<sup>75</sup>. Seitdem ist die Elektronenmikroskopie fester Bestandteil zellbiologischer Forschung. Ein Meilenstein der Elektronen-Mikroskopie war 1956 die Einführung des Epoxidharzes Araldite<sup>33</sup> und 1961 des Einbettmittels Epon, wie wir es verwenden. Im Jahr 1963 folgte die Einführung des ebenfalls von uns verwendeten Fixationsmediums Glutaraldehyd<sup>25</sup>.

In unseren Experimenten wird das Agar-Zell-Gel zunächst in 2,5%igem Glutaraldehyd fixiert, anschließend in Cacodylatpuffer (50mM, pH 7,2) gewaschen, mit 2% gepuffertem Osmiumtetroxid (OsO<sub>4</sub>) fixiert und in Aqua bidest gewaschen. Zur fünfminütigen Kontrastierung werden 0,5%iges Uranylacetat oder Reynolds Bleicitrat-Stammlösung verwendet, welche

besonders gut mit Eisen komplexieren. Nach nochmaligem Waschen mit Aqua bidest wird in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert und anschließend in Propylenoxid aufgelöst, da sich dies im Gegensatz zu Ethanol mit Epon vermischen kann. Die Einbettung in Epoxid-Harz (Epon 812) geschieht über 51 Stunden und besteht hauptsächlich aus einer 48stündigen Polymerisationsphase bei 60°C. Danach werden mit dem Diamantmesser 60nm dünne Schnitte angefertigt und auf einem Kupfernetz platziert. Kupfernetze sind hydrophob. Soll die Probe an dem Netz haften bleiben, z.B. wegen einer anschließenden Antikörperfärbung, bedient man sich eines hydrophilen Nickel-Netzes. Das beladene Netz wird in eine Patrone eingelegt, die über eine Schleuse in das Hochvakuum des Elektronenmikroskops ( $10^{-4}$  Torr) eingebracht wird. Das Elektronenmikroskop erzeugt mit einer Hochspannung von 80kV einen Elektronenstrahl, welcher einen kleinen Teil der Probe durchtritt, ein elektromagnetisches Linsensystem passiert und auf einem phosphoreszierenden Detektorschirm ein Bild erzeugt. Die Vergrößerung geht von 500fach bis 200 000fach und es sind Strukturen ab 0,2nm darstellbar. Zum Vergleich: Nukleotide haben ~0,5nm, VSOPs ~6nm, Chromosomen ~1000nm, Mitochondrien ~3000nm, Zellkerne ~5000nm

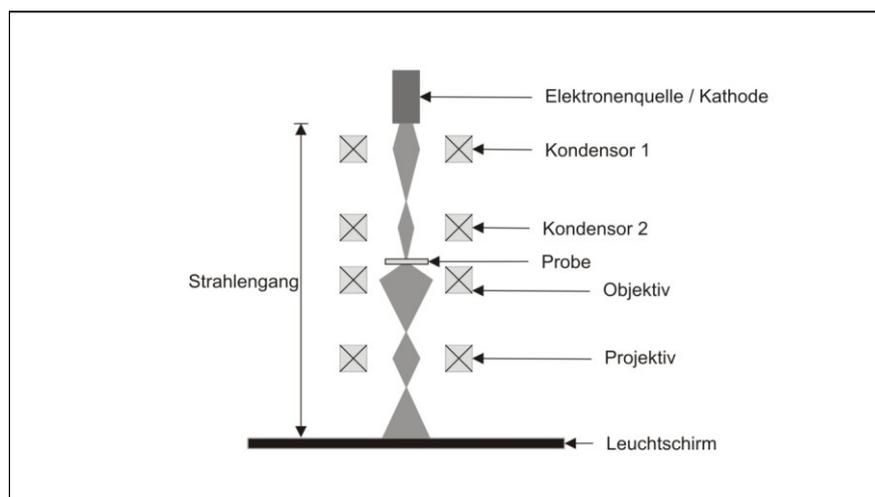


Abb.14 Transmissions-Elektronen-Mikroskop schematisch

Die transmissions-elektronen-mikroskopischen Bilder entstanden mit einer 35mm-Kleinbildkamera.

## 2.4 intrazelluläre Eisenbestimmung mittels ICP-MS

Ein Inductively Coupled Plasma-Massenspektrometer (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA) besteht aus einem Probenaufbereiter, einer Ionenquelle, einem Vakuumsystem mit Ionenoptik, einem Quadrupolanalysator und einem Detektor. Es funktioniert nach dem Prinzip der Ionenadsorption. Dabei wird die zu messende Substanz in einen Argon-Plasma-Strom vernebelt eingebracht. Die einzeln freigesetzten Ionen treffen anschließend auf einen Ionendetektor.

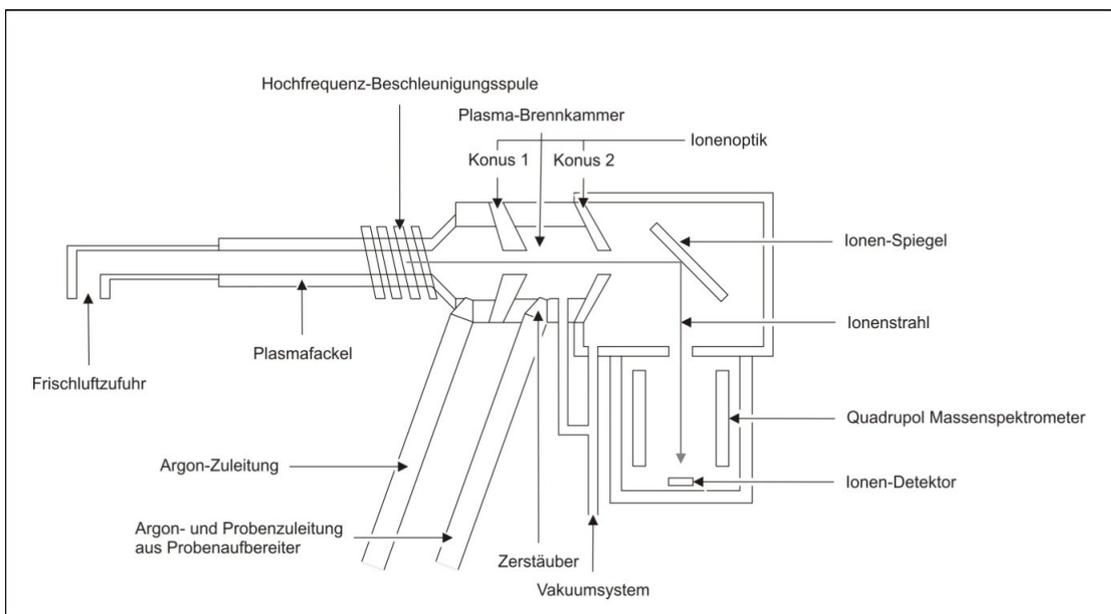


Abb.15 Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer ( ICP-MS ) schematisch nach Varian Inc., Palo Alto, CA, USA

Die Nachweisgrenze liegt bei 1 auf  $10^{12}$  Teilchen, was 1 ng/l in wässriger Lösung entspricht<sup>95</sup>. Zur Kalibrierung des Systems benutzen wir die Merck ICP-Mehrelementstandardlösung VI (Merck, Darmstadt, Germany) in einer Verdünnung von 1:50 mit einer Konzentration von 1000mgFe/l (= 100000 ppb). Von Bedeutung ist, dass der pH der Probenlösung einen entscheidenden Einfluss auf das Messergebnis hat und eine Linearität zwischen Absorption und Konzentration nur im unteren Konzentrationsbereich besteht. Deshalb muss so weit verdünnt werden, bis sehr geringe Konzentrationen in der Messlösung erreicht werden. In unserem Experiment sind das  $9 \cdot 10^4$  Zellen/1ml.

---

Die Vorbereitung der Probe geschieht mit 1% Salpetersäure ( $\text{HNO}_3$ ) 66% reinst über mindestens 48 Stunden zur Auflösung jeglicher zellulärer Struktur<sup>15</sup>. Um die Ionenzusammensetzung in der Probe nicht zu verändern, wird entmineralisiertes Wasser (Millipore Inc., Billerica, MA, USA) verwendet.

Die einzelnen Arbeitsschritte lauten: Zu  $10^6$  Zellen in 1ml PBS wird 1ml 66%ige rauchende Salpetersäure ( $\text{HNO}_3$ ) dazugegeben ( $10^6$ Zellen/2ml), das Gemisch für mindestens 48 Stunden unter dem Abzug stengelassen, 1ml davon abgenommen ( $0,5 \cdot 10^6$  Zellen/ml) und zu 4,5ml Millipore-Wasser hinzupipettiert ( $0,5 \cdot 10^6$ Zellen/5,5ml), das ganze durch einen Mikrofilter gespritzt. Die endgültige Zellkonzentration beträgt schließlich  $10^6$ Zellen/11ml. Die anfängliche Zellzahl wird also durch 11 dividiert.

## 2.5 die MRT-Messung

Wir verwenden für die MR-Messung einen Magneten mit statischem Magnetfeld von 7 Tesla und einer Resonanzfrequenz von 300 MHz (Bruker Biospec 7T, Bruker Biospin GmbH Ettlingen Germany) , der für die Bildgebung an Kleintieren und für die molekulare Bildgebung konzipiert ist und einen Bohrungsdurchmesser von 30cm besitzt.

Anders als resistive oder permanente Magnete ist dieser Magnet supraleitend mit Spulen aus einer Niobium-Titan-Legierung, welche durch Helium auf ca. 4°K heruntergekühlt werden, dadurch kaum Strom verbrauchen und eine exzellente Magnetfeldhomogenität aufweisen. Diese wird durch Korrekturspulen über das Shimming optimiert.

Außerdem verfügt das Biospec über ein „Active Shielding“, ein weiteres Spulensystem, welches das Hauptfeld nach außen abschirmt.

Zur Schichtwahl und Ortskodierung dient ein wassergekühltes Gradientensystem mit einer maximalen Gradientenstärke von 397 mT/m (Bruker S116).

Die verwendete Birdcage-Coil (Bruker 1H Quadrature Birdcage, Innendurchmesser 72mm, Gesamtlänge 275mm) ist eine Sende-Empfangsvolumenspule. Sie ist für Zellexperimente und Tierversuche konzipiert. Um sie

---

auf die Resonanzfrequenz der Probe abzustimmen, sind manuelles Tuning und Matching mithilfe resistiver Widerstände innerhalb der Birdcage-Coil notwendig. Betrieben wird das Biospec mit einer Paravision-4-Konsole von Bruker.

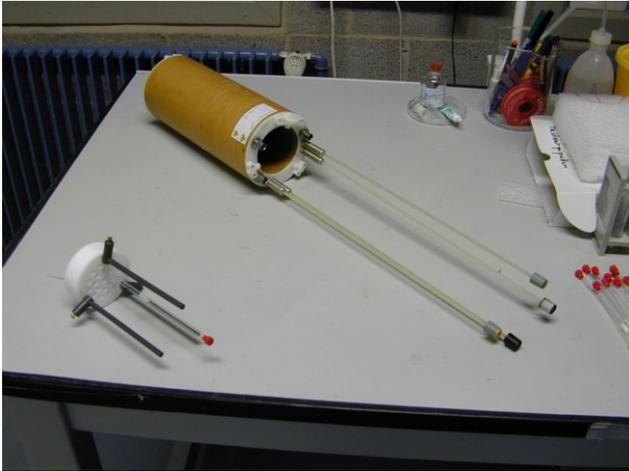


Abb.16 Bruker 1H  
Quadrature Birdcage

Abb.17 Bruker Biospec



### 2.5.1 Entwicklung des Phantomhalters

Es wurden verschiedene Phantomhalter hergestellt und schrittweise optimiert. Das verwendete Material ist Teflon, welches keine Protonen besitzt und daher keine Anregung im Magnetfeld erfährt. Es gibt eine Reihe Anforderungen: Der Phantomhalter soll zentral in der Birdcage-Coil sitzen und 21 NMR-Röhrchen aufnehmen können. Er muss eine gleichmäßige Lage der NMR-Tubes zueinander und zum Magnetfeld gewährleisten, um in jedem neuen Experiment eine identische Geometrie zu erhalten. Hierbei ist auf einen maximalen Abstand der Röhrchen zueinander zu achten, da die Röhrchen keinen perfekten Zylinder darstellen und somit zu Magnetfeldverzerrungen führen, die Einfluss auf das Feld des Nachbarröhrchens haben. Phantomhalter Nr.1 bestand aus zwei 4mm-breiten Teflonscheiben (Abb.18), welche jedoch durch Verschieblichkeit in Längsrichtung keinen reproduzierbaren Einbau gewährleisten konnten. Am Phantomhalter Nr.2 (Abb.19-21) sind zum reproduzierbaren Einbau 3 PVC-Justierstäbe angebracht. PVC enthält sehr wenige Protonen. Eine weitere Voraussetzung ist der vibrationsarme Sitz innerhalb des Birdcage-Coils. Dazu ist der Durchmesser etwas größer gewählt als der Innendurchmesser des Birdcage-Coils und nur das vorherige Tiefkühlen des Phantomhalters verringert

seine Ausdehnung, sodass er problemlos eingebaut werden kann und nach dem Auftauen durch Press-Fit fest verankert im Birdcage-Coil sitzt.

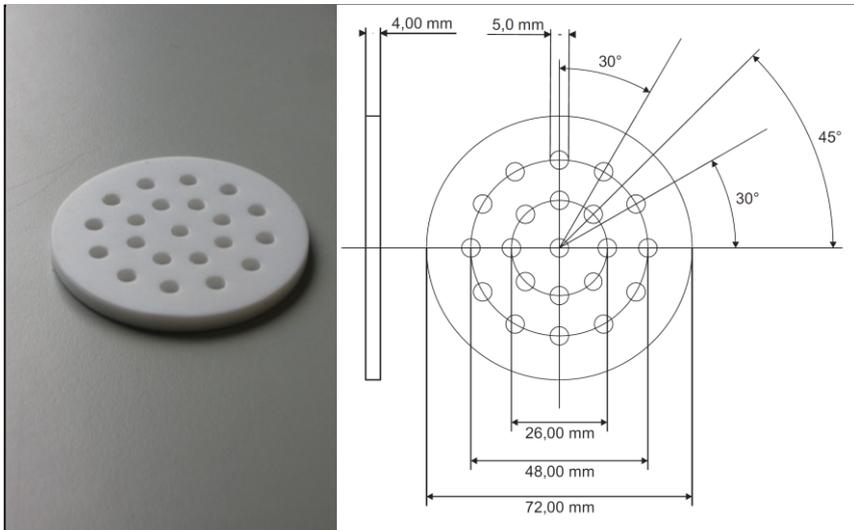


Abb. 18 Phantomhalter Nr.1 (2 solcher Scheiben), nicht reproduzierbar einbaubar

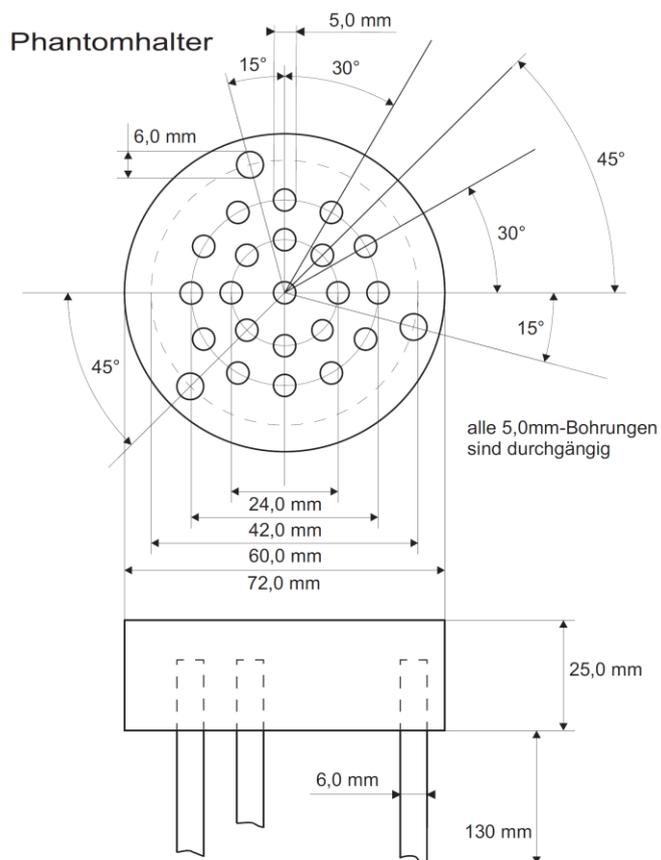


Abb.19 Phantomhalter Nr.2, mit Justierstäben (angedeutet im unteren Bereich, Länge 130mm)

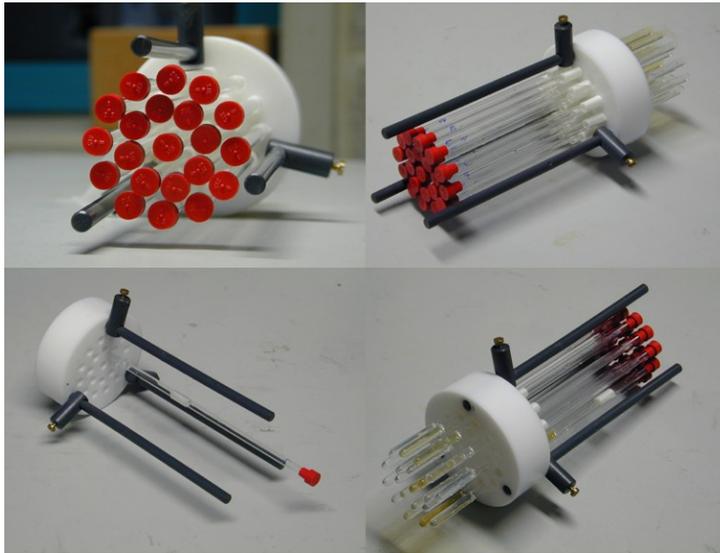


Abb.20 Phantomhalter mit Phantomen (beladen)

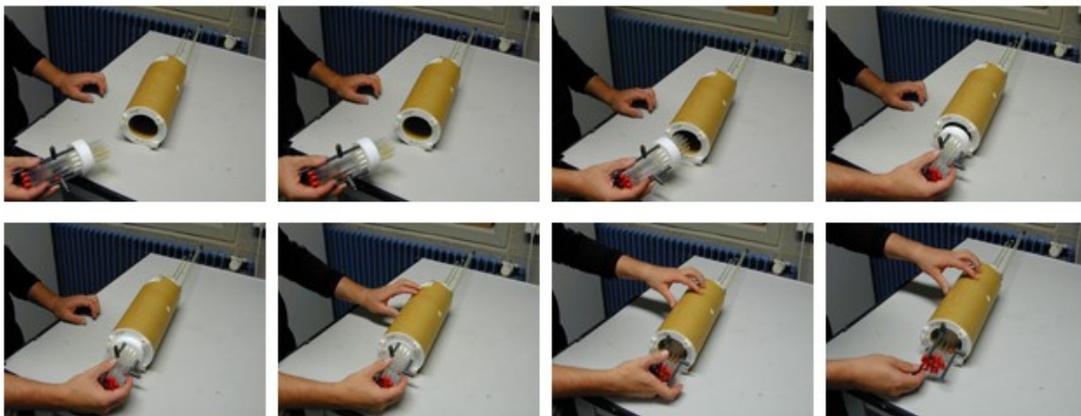


Abb.21 Einbau des Probenhalters in die Birdcage-Coil

### 2.5.2 die MSME-Sequenz

Zur Messung des  $T_2$ -Zerfalls verwenden wir die MSME-Sequenz. Sie ist eine Bruker-Implementation der CPMG-Sequenz (CPMG = Corr Purcell Meiboom Gill Sequenz) mit  $180^\circ$ -Refokussierpuls und folgenden Parametern:

TR 4.5sec, TE 5ms , FA  $90^\circ/180^\circ$  , FOV 60mm x 60mm, Echotrain-Length 200echoes , Spatial-Resolution 0,469mm x 0,469mm, Matrix 128 x 128 pixels , Slices 3/1 , Slice-Thickness 3mm, Readout-Bandwidth 79,265kHz, 1 Average, Interslice Gap 3mm

### 2.5.3 Single-Pulses (Spektroskopie)

Die  $T_2^*$ -Relaxation wird mithilfe der Single-Pulses bestimmt. Hierbei erfolgt ein  $90^\circ$ -Anregungspuls und keinerlei Schichtkodierung, Phasenkodierung oder

---

Frequenzkodierung, das heißt, es gibt keine Ortsauflösung. Im Anschluss an den Anregungspuls wird der FID aufgezeichnet. Zur Messung der Proben wird jedes NMR-Röhrchen einzeln in den Magneten eingebracht und über 5 Averages durchgemessen. Es befindet sich dabei in der zentralsten der 21 NMR-Tube-Bohrungen des Phantomhalters in jeweils identischer Längsposition. Die Sequenzparameter lauten: TR 4000ms, FA 90°, Acqu.Time 1,5sec, Bandwidth 20kHz, 5 Averages.

#### **2.5.4 die CSI-Sequenz**

Diese Methode wandten wir von April 2008 an zur  $T_2^*$ -Bestimmung an, verließen sie aber im Juli 2008 wegen ihrer extrem langen Akquisitionszeit, wodurch sich die Signaleigenschaften der Probe und der Zellen verändern könnten. Stattdessen wandten wir die Single-Pulse-Methode an (siehe oben).

## **2.6 Datenauswertung und Statistik**

### **2.6.1 Zellkultur und zelluläre Eisenaufnahme**

Für die Berechnung der Viabilität wird die Viabilität vor dem Labeln verglichen mit der Viabilität nach dem Labeln. Die Viabilität wird über Auszählung in der Neugebauer-Zählkammer bestimmt und wie folgt berechnet:

$$\text{Viabilität } V = \frac{I}{A + I}$$

mit  $V =$  Viabilität [%],  $A =$  Anzahl der Abgestorbenen Zellen,  $I =$  Anzahl der Intakten Zellen. Es wird die Viabilitätsdifferenz der Zellen vor und nach dem Labeln verglichen:

$$\text{Viabilitätsdifferenz } \Delta V = V_{\text{vorher}} - V_{\text{nachher}}$$

mit  $\Delta V =$  Viabilitätsdifferenz [%],  $V_{\text{vorher}} =$  Viabilität Vorher [%],  $V_{\text{nachher}} =$  Viabilität Nachher [%]. Dann werden die Passagen mit der Viabilität korreliert.

---

Für die ICPMS-Berechnung bekommt man das ICPMS-Ergebnis als ppb. Zur Eisenmenge gelangt man mit

$$\text{Eisenmenge } [\mu\text{g/ml}] = \frac{\text{ICPMS [ppb]} * \text{Verdünnungsfaktor}}{1000} \quad \text{und}$$

$$\text{Verdünnungsfaktor} = \frac{P + S}{P} * \frac{M + PS}{PS}$$

mit  $P$  = Volumen der Probe in PBS [ml],  $S$  = Volumen der zugegebenen Salpetersäure [ml],  $M$  = Volumen des zugegebenen Millipore-Wassers [ml],  $PS$  = Volumen des Proben-Salpetersäuregemisches [ml] und dem Faktor 1000 für die Umrechnung von ppb = ng/ml in  $\mu\text{g/ml}$ .

Die weitere Umrechnung in pg/Zelle erfolgt über die Formel

$$\text{Eisenbeladung } \left[ \frac{\text{pg}}{\text{Zelle}} \right] = \frac{\text{Eisenmenge } \left[ \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right] * P}{Z} * 1000000$$

mit  $P$  = Volumen der Probe in PBS [ml],  $Z$  = Zellzahl und dem Faktor 1000000 zur Umrechnung von  $\mu\text{g}$  in pg.

### 2.6.2 Phantombau

Eine qualitative Beurteilung der Zellverteilung im Phantom wird mithilfe Gradientenechosequenzen im Quer- und Längsschnitt vorgenommen und Kontrastunterschiede zwischen Einbettmedium und eisenbeladenen Zellen werden betrachtet. Es erfolgt eine Kontrolle der Form des Phantomquerschnitts sowie der Art der Zellverteilung im Paraffinschnitt. Zur Beurteilung des Relaxationsverhaltens von Phantomen mit unterschiedlichem Einbettmedium führen wir eine  $T_2$ - Bestimmung durch (Abbildung 32).

### 2.6.3 MR-Relaxometrie zur Quantifizierung von $T_2$ und $T_2^*$

Die  $T_2$ -Auswertung der Daten erfolgt mit Software-Tools von Thomas Kampf, Volker Sturm und Thomas Basse-Lüsebrink. Beide Tools, das Datatool-v12b-jb und das Fitanalysis-Tool-B, sind Matlab-Routinen (The MathWorks Inc., Natick,

MA, USA). Das Datatool-v12b-jb führt die Probenerkennung und ROI-Ziehung (Region of Interest) über den MR-Rohdaten und das Fitanalysistool-B über den ROIs anschließend eine Signal-Ausmittlung durch. Der im Datatool angewandte Nonlinear-Least-Square-Fit beruht auf der Matlab-Funktion `fminsearch` und benutzt die Formel  $S(t) = A * e^{-t/T2} + B$ .

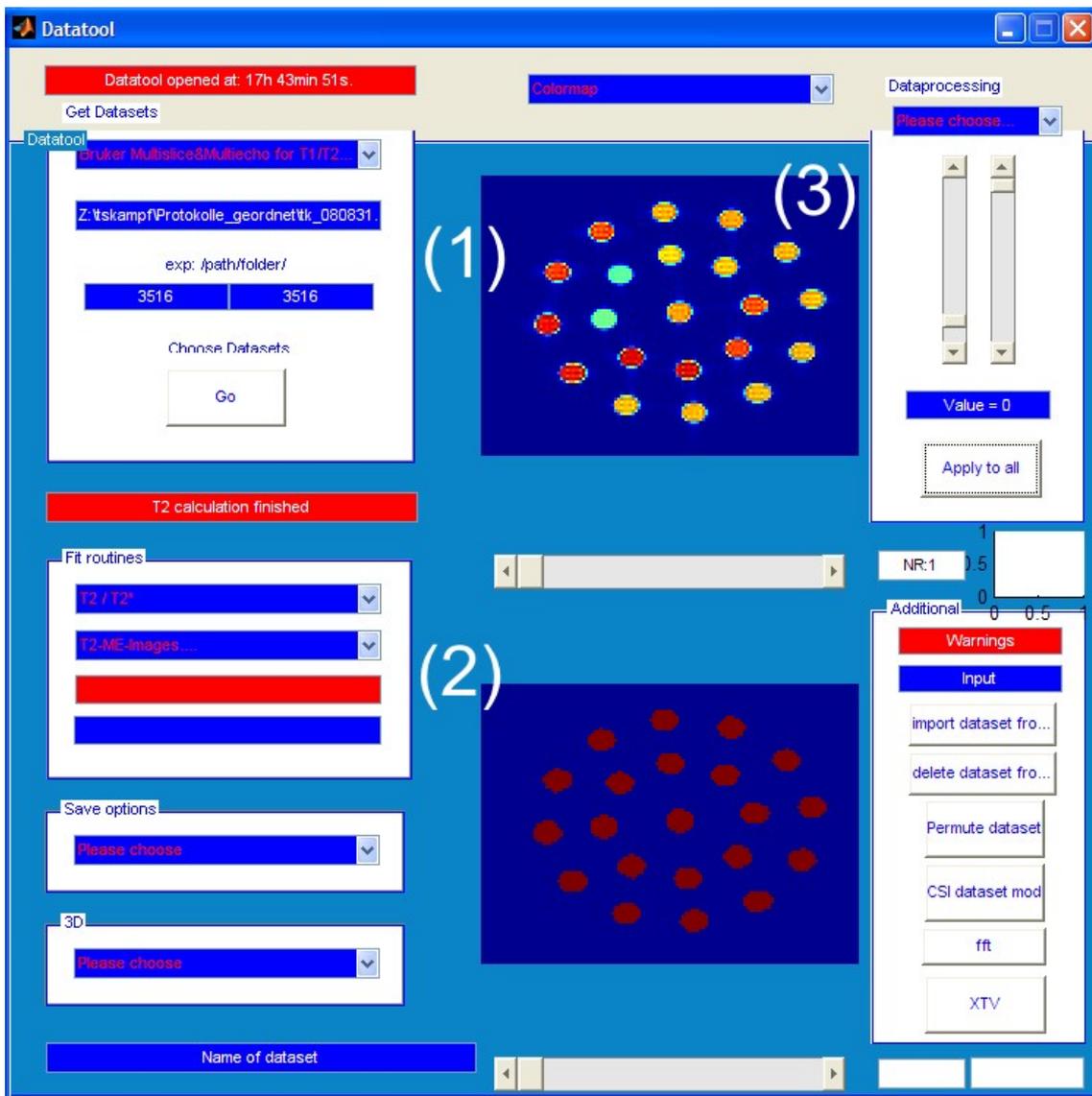


Abb.22 Datatool – Software unter Matlab™ zur Ziehung von ROIs (Regions of Interest) um die NMR-Röhrchen mit Auswahl der Fit-Routine (2, links mitte) und der manuellen Anpassung Pixelerkennungs-Schwelle (3, rechts oben)

---

Folgende Arbeitsschritte werden im Datatool nacheinander ausgeführt (siehe Abbildung 22): Einlesen des Rohdatensatzes (1), Auswahl der Fit-Routine (2), manuelle Anpassung der Pixelerkennungs-Schwelle (3), automatische Erstellung einer T<sub>2</sub>-Karte und T<sub>2</sub>-Tabelle.

Die T<sub>2</sub>\*-Auswertung erfolgt über einen nichtlinearen Least-Square-Fit an die Funktion  $S(t)=A*\exp(-t/T_2^*)$ . Daraus wird dann R<sup>2</sup>\* ermittelt.

#### **2.6.4 Eisennachweis über Histologie ( Färbungen )**

Wir nehmen eine qualitative Bewertung der Kontrastmittelaufnahme mittels Lichtmikroskopie und TEM vor.

Zum Nachweis intrazellulären Eisens mittels der 3 verschiedene Färbungen fertigen wir Ausstriche und Zytospins an. Pro Ausstrich und Färbung werden in jeweils 3 High-Power-Fields die Anzahl gefärbter und ungefärbter Zellen bei 40facher Vergrößerung verblindet ausgezählt. Die 3 High-Power-Fields befinden sich auf dem Objektträger jeweils am Ort hoher, mittlerer und niedriger Zelldichte. Die Anzahl der gelabelten Zellen der drei Dichte-Klassen wird aufsummiert

$$\sum \mathbf{g} = \mathbf{gelabeled1} + \mathbf{gelabeled2} + \mathbf{gelabeled3}$$

Ausserdem ergibt die Anzahl ungelabelter Zellen in einer Summe zusammengefasst

$$\sum \mathbf{u} = \mathbf{ungelabeled1} + \mathbf{ungelabeled2} + \mathbf{ungelabeled3}$$

Aus den Ergebnissen wird der prozentuale Anteil gelabelter Zellen gebildet

$$\% \mathbf{g} = \frac{\sum \mathbf{g}}{\sum \mathbf{g} + \sum \mathbf{u}}$$

---

mit %g = Prozent gelabelter Zellen. Bei den Zytospins zählen wir ebenfalls bei 40facher Vergrößerung jeweils 3 High-Power-Fields aus. Hier gibt es jedoch durch die gleichmässige Zellverteilung keine Dichteunterschiede der Zellen. Es werden je 2 Zytospins für 10 verschiedene Labelstärken pro Färbung angefertigt, also insgesamt 20.

Als „gelabeled“ definieren wir in der Preußisch-Blau-Färbung nur eindeutig blau-gefärbte Zellen, in der DAB-Verstärkung nur eindeutig braun-gefärbte Zellen und in der Ag-Au-Färbung nur eindeutig schwarz-gefärbte Zellen.

### **2.6.5 Statistik**

Die statistische Auswertung der Daten erfolgt mit dem Programm SPSS 19.0.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Alle kontinuierlichen Daten werden als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben außer falls anders angegeben. Die Normalverteilung von metrischen Daten wird über einen Kolmogorov-Smirnov-Test überprüft. Der Pearson-Test dient der Berechnung von linearen Korrelationen ( $r$ ) zwischen ausgewählten Variablen, falls diese normalverteilt sind. Für nicht normalverteilte Daten wird ein Spearman-Rank-Test verwendet. Zur Bestimmung der Unterschiede zwischen Gruppen verwenden wir einen Student-T-Test oder eine ANOVA mit Bonferroni-Korrektur, falls die Daten normalverteilt sind. Im anderen Fall verwenden wir den Kruskal-Wallis-Test. Der Variationskoeffizient berechnet sich aus der Division der Standardabweichung SD durch den Mittelwert. Ein Wert von  $p < 0,05$  betrachten wir als statistisch signifikant.

Zur Berechnung der molaren Relaxivitäten  $r_2$  und  $r_2^*$  [ $\text{mM}^{-1}/\text{s}^{-1}$ ] tragen wir die Änderung der Relaxationsraten  $R_2$  und  $R_2^*$  gegen die Eisenkonzentration auf und bestimmen die Steigung der Regressionsgeraden durch den Nullpunkt (0/0). Die Qualität der Regressionsgeraden wird durch den Korrelationskoeffizient  $r^2$  angegeben.

## 3. Ergebnis

### 3.1 Zellkultur

Vorversuche mit VSOP, Endorem, Rh-AMNP mit Standardprotokoll von  $100\mu\text{gFe/ml}$  für 4h und  $1 \cdot 10^8$  Zellen ergaben im Trypan-Blau-Test (Kapitel 2.1.4) eine gute Viabilität der Zellen beim Labeling mit VSOP und, im Vergleich zur Inkubation mit Endorem und Rh-AMNP, unter VSOP eine bessere Eisenaufnahme der Zellen<sup>45</sup>.

Die Zellen befinden sich bei den Versuchen zwischen Zellpassage 43 und 57. Um einen Einfluss der Zellpassage, das heißt des Alters der Makrophagen, auf die Viabilität der Zellen vor dem Labeln zu untersuchen, korrelieren wir Prozent defekter Zellen und Passage. Es ist kein Zusammenhang sichtbar (Pearson:  $r = -0,132$  ;  $p = 0,377$ ).

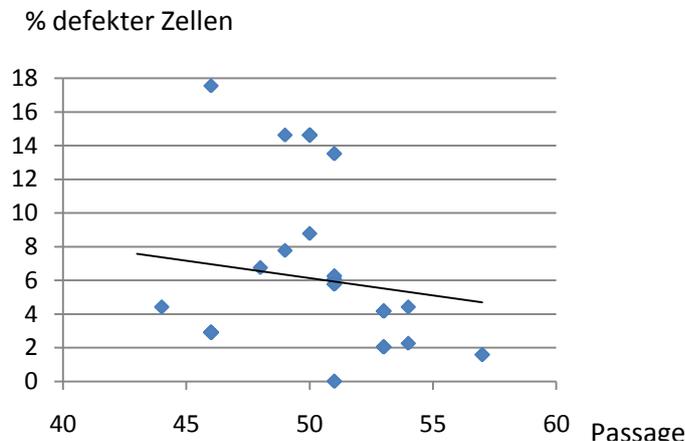


Abb. 23 Prozent defekter Zellen vor dem Labeln aufgetragen gegen die Zellpassage

Vor dem Labeln zeigen sich im Mittel  $4,2 \pm 3,4\%$  defekte Zellen, während es nach dem Labelvorgang  $9,0 \pm 3,7\%$  sind (Student-T-Test mit verbundenen Stichproben,  $p < 0,0001$ ) (Abbildung 24). Im Mittel beträgt die Viabilität der Zellen nach dem Labeling folglich über 90%.

Prozent defekte Zellen

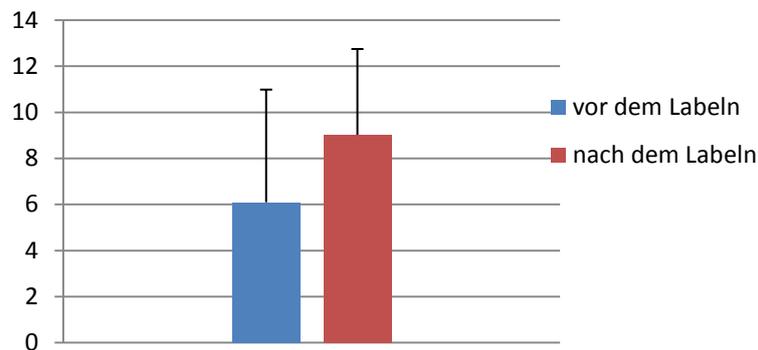


Abb. 24 Mittelwerte defekter Zellen vor und nach dem Labeling

Die Anzahl der Zellpasagen korreliert nicht mit der Differenz abgestorbener Zellen vor und nach dem Labelvorgang (Pearson:  $r=-0.061$  ;  $p=0,721$ ) (Abbildung 25).

Viabilitätsdifferenz

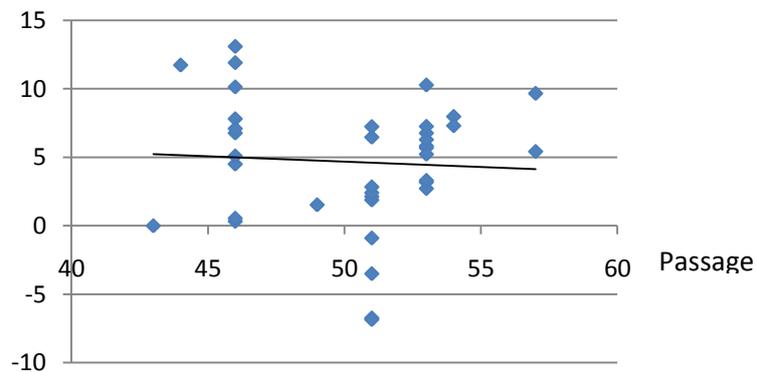
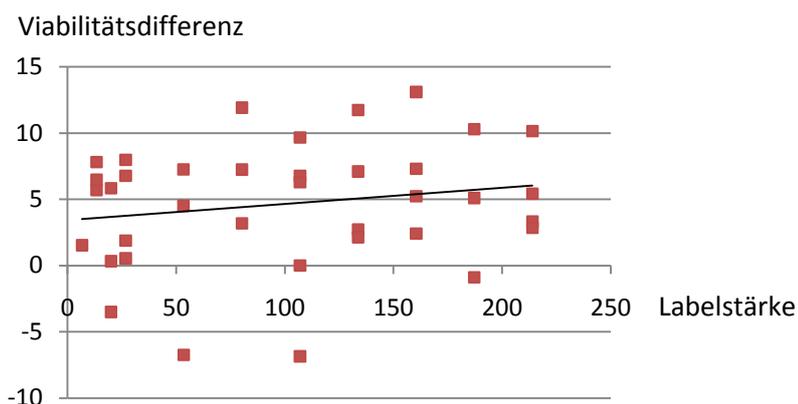


Abb.25 Viabilitätsdifferenzen aufgetragen gegen die Passagenummer

Auf die Frage, ob die Labelstärke die Viabilität vor und nach dem Labeling verändert, tragen wir die Differenz der Non-Viabilitäten vor und nach dem Labeln gegen die Labelstärke auf. Eine Korrelation ist nicht vorhanden (Pearson:  $r=0,163$  ;  $p=0,334$ ) (Abbildung 26).



Tab. 26 Differenz der Non-Viabilität zwischen vor/nach Labelvorgang aufgetragen gegen die Labelstärken

### Labeling

Insgesamt werden mit 12 unterschiedlichen Labelstärken 22 Versuche durchgeführt. Tabelle 2 veranschaulicht den chronologischen Ablauf.

Labeldatum	Labelstärke in $\mu\text{gFe/ml}$	Labeldatum	Labelstärke in $\mu\text{gFe/ml}$
04.08.2008	100	15.09.2008	37
11.08.2008	50	15.09.2008	50
14.08.2008	200	15.09.2008	56
25.08.2008	25	15.09.2008	100
29.08.2008	75	19.09.2008	6
29.08.2008	150	19.09.2008	100
29.08.2008	250	02.10.2008	6
01.09.2008	175	30.10.2008	100
01.09.2008	12	30.10.2008	200
01.09.2008	125	13.12.2008	125
11.09.2008	12	13.12.2008	150
11.09.2008	62	14.12.2008	25
15.09.2008	6	05.09.2009	50

Tab.2 Labeldatum und Labelstärke

## 3.2 Phantombau

### Ficoll

Bei der Messung mit Ficoll zeigt sich ein Absinken der Zellen in vertikaler Lage innerhalb von 10 Minuten. In horizontaler Lage bleiben die Zellen länger im Schwebезustand, zeigen jedoch ein deutliches Absinken nach 30 Minuten.

## Hydrogel

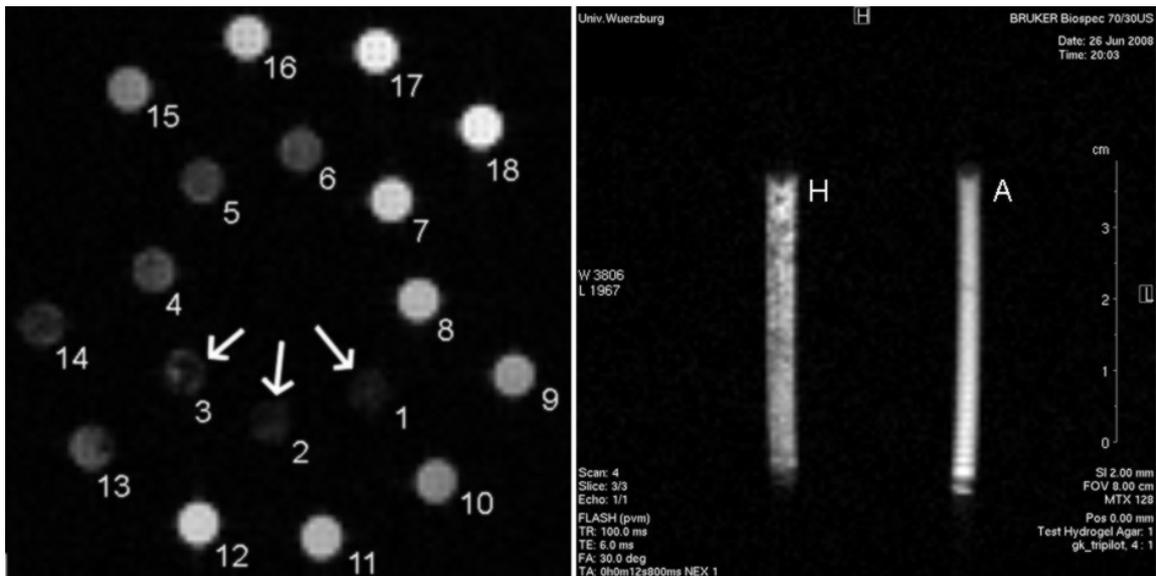


Abb. 27 Vergleich von Hydrogel- und Agar-Phantomen (MSME)

Tube	Rezeptur	Zelldichte in Cells/ml	Labelstatus
1	1:1 Hydrogel	$5 \cdot 10^6$	gelabelt
2	1:2 Hydrogel	$5 \cdot 10^6$	gelabelt
3	1:0.5 Hydrogel	$5 \cdot 10^6$	gelabelt
4	1:1 Hydrogel	$1 \cdot 10^6$	gelabelt
5	1:2 Hydrogel	$1 \cdot 10^6$	gelabelt
6	1:0.5 Hydrogel	$1 \cdot 10^6$	gelabelt
7	1:1 Hydrogel	$5 \cdot 10^6$	ungelabelt
8	1:2 Hydrogel	$5 \cdot 10^6$	ungelabelt
9	1:0.5 Hydrogel	$5 \cdot 10^6$	ungelabelt
10	1:1 Hydrogel	0	Leerprobe
11	1:2 Hydrogel	0	Leerprobe
12	1:0.5 Hydrogel	0	Leerprobe
13	Agar 1‰	$1 \cdot 10^6$	gelabelt
14	Agar 5‰	$1 \cdot 10^6$	gelabelt
16	Agar 1‰	$1 \cdot 10^6$	ungelabelt
17	Agar 5‰	$1 \cdot 10^6$	ungelabelt
18	Agar 1‰	0	Leerprobe
19	Agar 5‰	0	Leerprobe

Tab. 3 Inhalt der Tubes aus Abb.27

In Abbildung 27 sind Röhrrchen mit Agar und Hydrogel zu sehen. In Röhrrchen 1-6 (Hydrogel, gelabelt), siehe auch weiße Pfeile, sind inhomogen verteilte gelabelte Zellen sichtbar. Der Längsschnitt im rechten Bildbereich zeigt ein

inhomogenes Aussehen des Hydrogels (H) verglichen mit dem homogenen Agarphantom (A). Die ungelabelten Hydrogel-Kontrollen in Röhrrchen 7-9 haben ein homogenes Aussehen. Geringere Zelldichten ( $1 \cdot 10^6$  Cells/ml) und folglich geringere Kontrastmittelkonzentrationen in Röhrrchen 4-6 führen zu einer homogenen Struktur. Die Agarproben ab Röhrrchen 13 zeigen kein inhomogenes Bild.

### Agar

Wir untersuchen verschiedene Agarkonzentrationen, darunter eine 0,1%ige und eine 0,5%ige Zubereitung. Agar zeigt eine homogenere Verteilung der Zellen als Hydrogel (Abbildung 28 und Tabelle 3 )

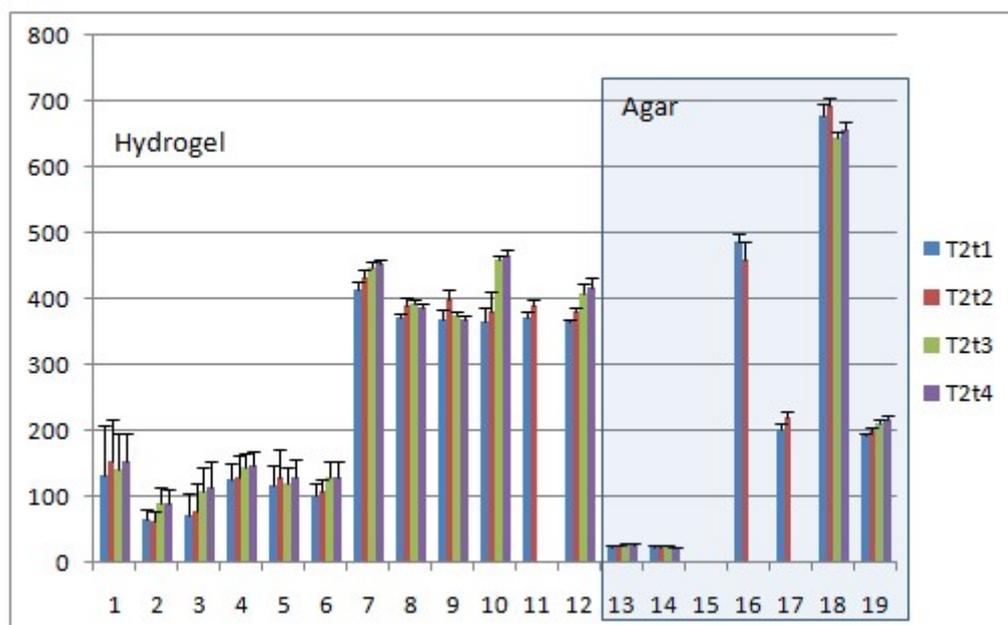


Abb. 28 T2-Relaxation bei unterschiedlichen Gelzusammensetzungen. Infos über die einzelnen Tubes in Tab.3

Abbildung 28 zeigt einen deutlichen Unterschied zwischen den beiden Agarkonzentrationen mit einem Unterschied von über 300ms ( Röhrrchen 16 mit 1‰ vs. Röhrrchen 17 mit 5‰ bzw. Röhrrchen18 mit 1‰ vs. Röhrrchen 19 mit 5‰ ). Kontrastmittel zeigt hier eine Verkürzung der T2-Relaxation von über 200 ms bei konstant gehaltenen Agarkonzentrationen ( Röhrrchen 13 vs. 16 mit 1‰ bzw. 14 vs. 17 mit 5‰). Aufgrund des sichtbaren nicht zu vernachlässigenden

---

Einfluss des Agars beinhaltet jeder Versuch eine Referenz-Leerprobe aus dem jeweils verwendeten Agar, auf die man die ungelabelten und gelabelten Proben hin korrigiert. Das 21., zentral eingebrachte NMR-Röhrchen jedes Versuchs enthält als Leerprobe denselben Agar, welcher zum Einbetten der Zellen verwendet wurde. Seine  $R_2$ - bzw.  $R_2^*$ -Relaxationszeit wird von der der anderen Röhrchen abgezogen.

Zur Überprüfung der Durchmischung und des Temperaturverhaltens des Agars führten wir Versuche mit unterschiedlichen Agar-Temperaturen durch. Der Agar darf bei der Herstellung der Zell-Agar-Suspension nicht zu heiß sein, um die Proteine nicht zu denaturieren und die Makrophagen damit abzutöten<sup>77</sup>. Der Agar muss daher deutlich unter 60°C mit den Zellen vermengt werden. Um andererseits die Agar-Zell-Suspension in die NMR-Röhrchen füllen zu können, muss sie flüssig bleiben. Die Versuche mit verschiedenen Temperaturen ergeben eine geringe Viskosität bei 52°C, eine mittlere Viskosität zwischen 40 und 50°C und eine hohe Viskosität bei physiologischen 37°C mit Verklumpungen bereits innerhalb der Pipettenspitze. Wir entschieden uns daher für die Verarbeitung der Agar-Zell-Suspension aus 100µl Zell-PBS-Suspension (25°C) und 400µl Agar (52°C) bei einer Mischungs-Temperatur von 45-50°C. Um die Integrität der Zellen in einem solchen Temperaturbereich zu überprüfen, betteten wir die erstarrte Agar-Zell-Suspension in Paraffin ein und fertigten eine HE- und PB-Färbung an 1µm-Schnitten durch.

Abbildung 29 zeigt einen Bildausschnitt aus dem Paraffinschnitt mit intakter Zelle, welche durch Kernechtfärbung cytoplasmatisch rot erscheint. Die Zellwand ist mikroskopisch intakt, die Zelle ist nicht entrundet. Im linken oberen Bildausschnitt sind einbettungsbedingte Schrumpfungartefakte des Agars sichtbar.



Abb. 29 In Agar eingebetteter Makrophage. Intakte Zellwand, Zelle nicht entrundet

---

Im angefertigten Paraffinschnitt in Abbildung 30 sind die eingebetteten Makrophagen gut sichtbar. Sie sind homogen über den ganzen Schnitt verteilt und auch zum Rand hin zeigen sich keine grösseren Zellkonzentrationen. Es finden sich keine bläulichen Eisenpartikel-Aggregate im Agar oder ausserhalb des Agar-Zylinders. Im Kontrast dazu sind die Zellen bläulich-violett gefärbt.

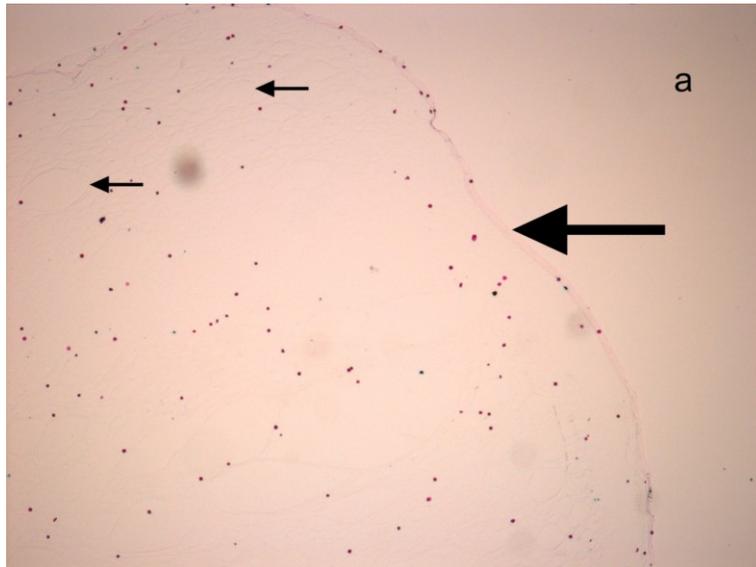


Abb.30 Nach Einbetten des Agarphantoms in Paraffin und anschliessendem 0,5-1  $\mu\text{m}$  dickem Mikrotom-Schnitt ist das Agar-Gel mit den diffus verteilten Makrophagen noch gut von der zelllosen Umgebung (a) abgrenzbar (großer Pfeil). Es ist keine Makrophagen-Aggregation sichtbar. Die wabenförmige Auflockerung im Agar (kleine Pfeile im oberen Bildabschnitt) ergibt sich aus Schrumpfungsartefakten durch die Einbettung ( 50fach | Zeiss Axioskop | Berliner-Blau-Färbung )

Um zu kontrollieren, ob bei der Herstellung des Agars viele Luftblasen eingeschlossen werden, wurde bei 17 Tesla ein hochaufgelöstes 3D-Bild einer Agar-Leerprobe gemacht. Dieses zeigt wenige Luftblasen über den Querschnitt des Phantoms hinweg verteilt.

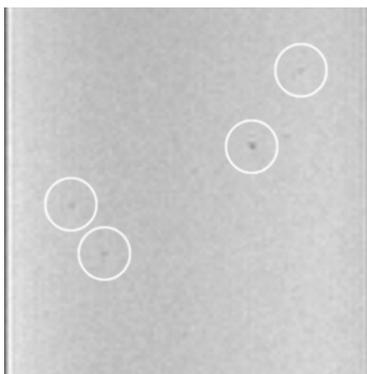
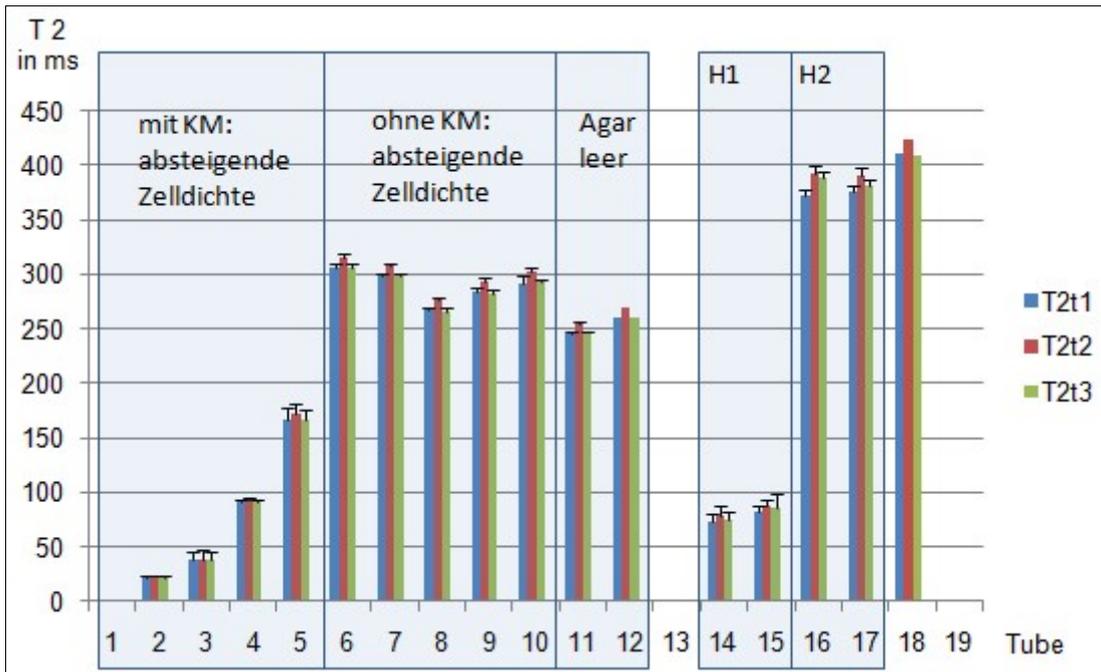


Abb. 31 Agar-Leerprobe zeigt Luftblasen im HR-3D FLASH, 38x38 $\mu\text{m}$ , TE:4[ms]



Tube	Inhalt	Zelldichte in Cells/ml	Labelstatus
1	0.5 % Agarose	1x10 <sup>7</sup>	gelabelt
2	0.5 % Agarose	7.5x10 <sup>6</sup>	gelabelt
3	0.5 % Agarose	5x10 <sup>6</sup>	gelabelt
4	0.5 % Agarose	2.5x10 <sup>6</sup>	gelabelt
5	0.5 % Agarose	1x10 <sup>6</sup>	gelabelt
6	0.5 % Agarose	1x10 <sup>7</sup>	ungelabelt
7	0.5 % Agarose	7.5x10 <sup>6</sup>	ungelabelt
8	0.5 % Agarose	5x10 <sup>6</sup>	ungelabelt
9	0.5 % Agarose	2.5x10 <sup>6</sup>	ungelabelt
10	0.5 % Agarose	1x10 <sup>6</sup>	ungelabelt
11	0.5 % Agarose	0	Leerprobe
12	0.5 % Agarose	0	Leerprobe
H1 14	Hydrogel 1:1	1x10 <sup>7</sup>	gelabelt
H1 15	Hydrogel 1:1	5x10 <sup>6</sup>	gelabelt
H2 16	Hydrogel 1:1	1x10 <sup>7</sup>	ungelabelt
H2 17	Hydrogel 1:1	5x10 <sup>6</sup>	ungelabelt
18	Hydrogel 1:1	0	Leerprobe

Abb. 32 mit Tab.4 Agar- und Hydrogel-Phantome und deren T2-Zeiten. T2 von Agarphantomen mit Kontrastmittel und absteigenden Zelldichten (erster blauer Kasten), ohne Kontrastmittel und absteigender Zelldichte (zweiter blauer Kasten), ohne Kontrastmittel und ohne Zellen (dritter blauer Kasten). T2 von Hydrogelphantomen mit Kontrastmittel und absteigender Zelldichte (Kasten H1) und ohne Kontrastmittel und absteigender Zelldichte (Kasten H2). Balken 18 zeigt die Hydrogelleerprobe ohne Kontrastmittel und ohne Zellen. Die unterschiedlichen Farben jedes Balkens stellen unterschiedliche Messzeitpunkte an den gleichen Proben dar.

---

Abbildung 32 zeigt die  $T_2$ -Relaxationszeiten für Agarphantome (Balken 1-12) und Hydrogelphantome (H1, H2, Balken 14-18).

Im ersten Bereich der Graphik ist an den Agarphantomen eine deutliche Zunahme der  $T_2$ -Zeiten ( 20ms - 160 ms ) mit absteigender Zelldichte bei gleichbleibender Kontrastmittelkonzentration zu erkennen. Die Zelldichten, an denen wir dies sehen, bewegen sich von  $1 \times 10^7$  (Phantom 1) bis hinab zu  $1 \times 10^6$  Cells/ml (Phantom 5). Dies ist auch in Tab.4 ablesbar.

Der rechte Teil im Schaubild 32 zeigt die untersuchten Hydrogelphantome. Kasten H1 zeigt die  $T_2$ -Verkürzung durch das Kontrastmittel an, Kasten H2 den Effekt unterschiedlicher Zellkonzentrationen. Der Vergleich von ungelabelten Zellen (Abb. 32, Kasten H2) und der Hydrogel-Leerprobe (Balken 18) zeigt keinen Unterschied (Bereich 373 – 423 ms).

Um den Zeitverlauf der  $T_2$ - und  $T_2^*$ -Zeiten über einen längeren Zeitraum hinweg darzustellen, führten wir die Messung zu den Zeitpunkten  $t_0=0h$ ;  $t_2=7,15h$ ;  $t_3=22,7h$ ;  $t_4=28,93h$  durch (verschiedenfarbige Balken). Wie in der Abbildung zu sehen, sind lediglich geringe Unterschiede zu erkennen. Dadurch sollten über den Zeitraum der Messung stabile  $T_2$ - und  $T_2^*$ -Werte zu erwarten sein.

### **Untersuchung der Zelldichte**

Variiert man die Zelldichte in Agarphantomen ohne Kontrastmittel (Abbildung 32, zweiter blauer Kasten, Röhrchen 6-10), so zeigen sich keine grossen Unterschiede in der  $T_2$ -Relaxationszeit (Bereich 260 - 305 ms ). Um den Einfluss des Agars auf die Relaxation zu erfassen, wurden neben den gelabelten und ungelabelten Zellphantomen stets auch Messungen an reinen 0,5-prozentigen Agarphantomen ohne Zellen durchgeführt (siehe Abbildung 32 und Tabelle 4, Röhrchen 11+12). Hierbei ergibt sich ein mittlerer  $T_2$ -Wert von  $209,5 \pm 25,2$  ms und ein mittlerer  $T_2^*$ -Wert von  $46,4 \pm 15,2$  ms.

Um den Einfluss ungelabelter Zellen auf die Relaxation zu untersuchen, wurden Agarphantome mit ungelabelten Zellen untersucht. Folgende Zelldichten wurden gemessen:  $1,5 \cdot 10^5$  /  $2 \cdot 10^5$  /  $4 \cdot 10^5$  /  $6 \cdot 10^5$  /  $8 \cdot 10^5$  /  $1 \cdot 10^6$  /  $2 \cdot 10^6$  /  $4 \cdot 10^6$  /

$6 \cdot 10^6 / 8 \cdot 10^6$  Zellen/0,5ml. Der mittlere  $T_2$ -Wert steigt im Vergleich zu reinem Agar signifikant an auf  $229,5 \pm 21,0$  ms (ANOVA  $T_2$  vs. Agarose  $p = 0,018$ ). Nicht signifikant steigt der mittlere  $T_2^*$ -Wert auf  $52,0 \pm 18,1$  ms an (ANOVA  $T_2^*$  vs. Agarose  $p = 0,630$ ).

Datum	Zelldichte ungelabeled Zellen/0,5ml
04.08.2008	$5 \cdot 10^6$
11.08.2008	$2 \cdot 10^6$
14.08.2008	$2 \cdot 10^6$
25.08.2008	$4 \cdot 10^6$
29.08.2008	$6 \cdot 10^5$
29.08.2008	$8 \cdot 10^5$
29.08.2008	$6 \cdot 10^6$
01.09.2008	$4 \cdot 10^5$
11.09.2008	$1,5 \cdot 10^5$
11.09.2008	$2 \cdot 10^5$
15.09.2008	$1 \cdot 10^6$
15.09.2008	$2 \cdot 10^6$
15.09.2008	$4 \cdot 10^6$
15.09.2008	$6 \cdot 10^6$
15.09.2008	$8 \cdot 10^6$
19.09.2008	$2 \cdot 10^6$
19.09.2008	$8 \cdot 10^6$
02.10.2008	$4 \cdot 10^5$

Tab. 5 Ungelabelte Zellen und zugehöriges Datum

$\Delta R_2$  und  $\Delta R_2^*$  aus der Differenz der  $R_2$ - bzw.  $R_2^*$ -Relaxationsraten ungelabelter Zell-Agar-Phantome und reiner Agar-Phantome korrelieren nicht mit der Zelldichte ( $\Delta R_2$  mit  $r = -0,202$ ;  $p = 0,238$  und  $\Delta R_2^*$  mit  $r = 0,097$ ;  $p = 0,596$ ). Die Zellen selbst haben in unserem Zelldichte-Bereich somit keinen direkten Einfluss auf  $\Delta R_2$  und  $\Delta R_2^*$ .

Unter dieser Voraussetzung wird in unserer Arbeit der Einfluss des Kontrastmittels auf die  $R_2$ -Relaxation untersucht.

### 3.3 Eisenbeladung der Makrophagen (ICPMS)

Zunächst wird die Qualität der ICP-MS-Ergebnisse überprüft. Das ICP-MS-Gerät führt anfangs eine Eichung durch. Hierbei wird anhand definierter Standards mit 1000 ppm, 500 ppm und Reinstwasser mit 0 ppm eine Eichgerade erstellt. Die mittlere Abweichung der Standards von der Eichgeraden beträgt  $-0,17 \pm 1,88 \%$  ( n = 5 ). Zur Kontrolle der Eisenwerte aus VSOP werden Standards mit definiertem VSOP-Inhalt von 20  $\mu\text{gFe/ml}$  ( n = 5 ) und 40  $\mu\text{gFe/ml}$  ( n = 5 ) per ICP-MS bestimmt. Es ergibt sich eine mittlere Streuung von  $-1,72 \pm 6,13 \%$ .

Die Eisenaufnahme pro Makrophage geht mit der angebotenen Kontrastmittelkonzentration einher und man sieht Eisenbeladungsstärken von 0,09 bis 12,25 [ $\mu\text{gFe/Zelle}$ ]. In den meisten Fällen wird das Protokoll für dieselbe Kontrastmittelkonzentration zwei- bis dreimal wiederholt – so etwa 6,24  $\mu\text{gFe/ml}$  am 15.9.2008 / 19.9.2008 / 2.10.2008 (siehe Tabelle 6).

ICPMS in $\mu\text{gFe/Zelle}$	Labelstärke in $\mu\text{VSOP/30ml}$	Labelstärke in $\mu\text{gFe/ml}$ Medium bei 28 $\text{mgFe/ml}$	Labeldatum
0,09	6,6875	6,24	19.09.2008
0,13	6,6875	6,24	02.10.2008
0,19	6,6875	6,24	15.09.2008
0,21	13,375	12,48	11.09.2008
0,27	26,75	24,97	14.12.2008
0,98	40,125	37,45	15.09.2008
1,06	26,75	24,97	25.08.2008
1,27	160,5	149,8	13.12.2008
1,56	133,75	124,83	13.12.2008
1,56	80,25	74,9	29.08.2008
1,62	60,1875	56,18	15.09.2008
1,75	107	99,86	30.10.2008
1,97	66,875	62,42	11.09.2008
2,12	53,5	49,93	15.09.2008
2,13	107	99,86	19.09.2008
2,85	107	99,86	15.09.2008
2,99	53,5	49,93	11.08.2008
3,81	214	199,73	30.10.2008
4,57	160,5	149,80	29.08.2008
6,69	267,5	249,66	29.08.2008
10,76	214	199,73	14.08.2008
12,25	133,75	124,83	01.09.2008

Tab. 6 Eisenbeladung der Makrophagen und die angewandten Labelstärken

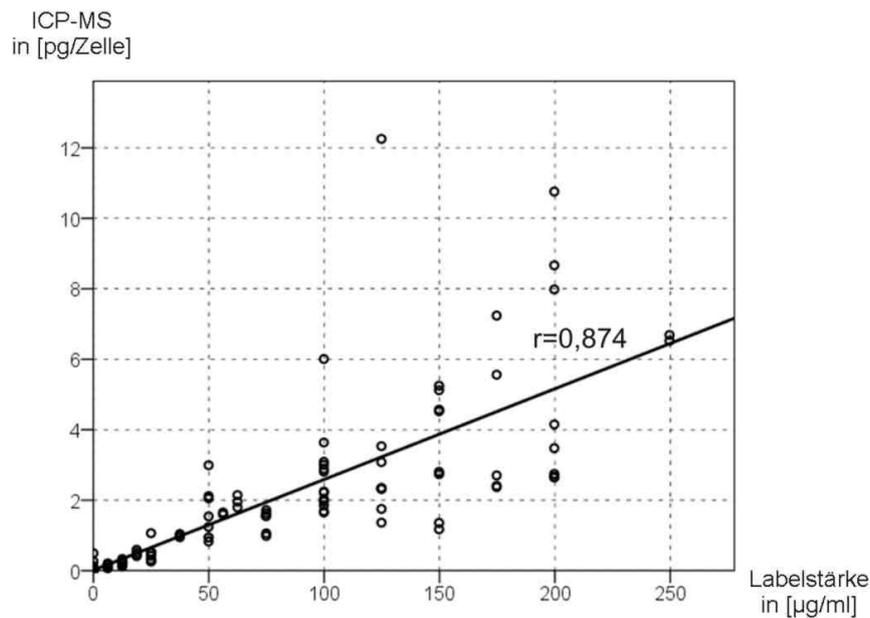


Abb.33 Eisenbeladung, Labelstärke und Ausgleichsgerade

Die Graphik 33 zeigt einen Anstieg der Eisenbeladung gegen höhere Labelstärken hin (Pearson:  $r = 0,874$  ;  $p < 0,0001$  ). Die Ausgleichsgerade zeigt eine Korrelation von  $r^2 = 0,764$ . Die Graphik enthält mehr Datenpunkte als aus den 22 oben erwähnten Protokollen hervorgehen, da hier noch die zwei Protokolle à 10 Labelstärken in doppelter Ausführung, welche für die Bestimmung der Sensitivität der Preußisch-Blau-Färbung durchgeführt wurden, Eingang finden. Inklusive der ungelabelten Proben ergibt dies für die Abbildung 33 insgesamt 102 Datenpunkte. Der Eisengehalt der ungelabelten Proben beträgt  $0,09 \pm 0,16$   $\mu\text{gFe/Zelle}$ . Trotz der grösseren Streuung in Protokollen einzelner Labelstärken wie beispielsweise bei 125 und 200  $\mu\text{gFe/ml}$  lässt sich eine steigende Tendenz feststellen (siehe lineare Regressionsgerade mit  $r = 0,874$ ). Daraus lässt sich bei gegebener Labelstärke  $x$  [ $\mu\text{g/ml}$ ] die zelluläre Eisenbeladung  $b$  [ $\mu\text{g/Zelle}$ ] anhand folgender Formel berechnen

$$b = ax \text{ mit } a = 0,026 * \frac{\text{ml} * \mu\text{g}}{\mu\text{g} * \text{Zelle}}$$

Die Standardabweichungen der einzelnen Labelstärken werden jeweils durch den Mittelwert der Eisenbeladung der jeweiligen Labelstärke dividiert, um zu schauen, ob die Variation der Eisenbeladung von der Labelstärke abhängt. Wie

in Abbildung 34 sichtbar, zeigen die Variationskoeffizienten der einzelnen Labelstärken keine allgemeine Tendenz.

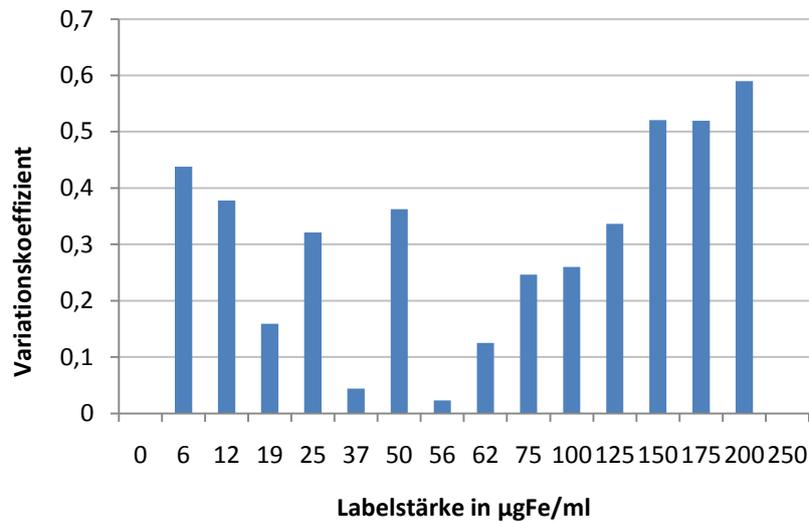


Abb.34 Variationskoeffizienten der Eisenbeladung bezogen auf die einzelnen Labelstärken [ $\mu\text{gFe/ml}$ ]

Eine Übersicht über die Protokoll-Verteilung stellt die Fläche in Abbildung 35 dar. Dabei ist zu erkennen, dass wir die Protokollabstände im unteren Bereich der gemessenen Eisenbeladungen dichter gewählt haben. Auch im unteren Zelldichte-Bereich wählten wir dichtere Abstände. Die dritte Achse, die z-Achse, zeigt den Gesamteisenbereich, den wir mit unseren Versuchen abdecken. Er reicht von minimal 0,036  $\mu\text{gFe/ml}$  bis maximal 196  $\mu\text{gFe/ml}$ .

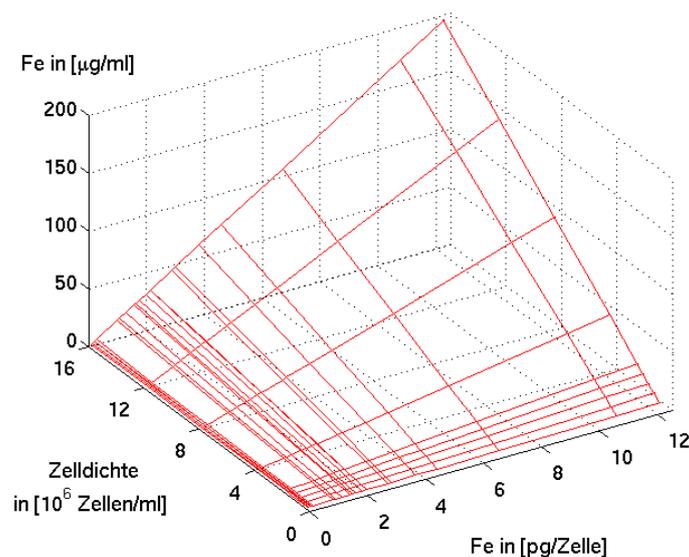


Abb. 35 Gesamteisenmenge pro ml Medium

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, wie die gemessenen  $R_2$ -Relaxationszeiten von der Gesamteisenmenge des Phantoms oder von der Eisenbeladung der einzelnen Zelle abhängen.

Interessant in Bezug auf die Eisenbeladung der Makrophagen ist ausserdem, welcher Anteil des angebotenen Eisens tatsächlich von den Zellen aufgenommen wurde. Dies stellt einen indirekten Marker für die Phagozytoseaktivität der Makrophagen dar. Der Wert 100% würde bedeuten, dass die Makrophagen alles angebotene Eisen völlig aufgenommen haben. In Abbildung 36 sieht man, dass von dem angebotenen Eisen zwischen 2,8 und 32,7 % aufgenommen wurden. Ebenso ist erkennbar, dass es keinen direkten Zusammenhang zwischen der prozentualen Eisenaufnahme an angebotenen Eisen und der Labelstärke, also dem Eisenangebot gibt.

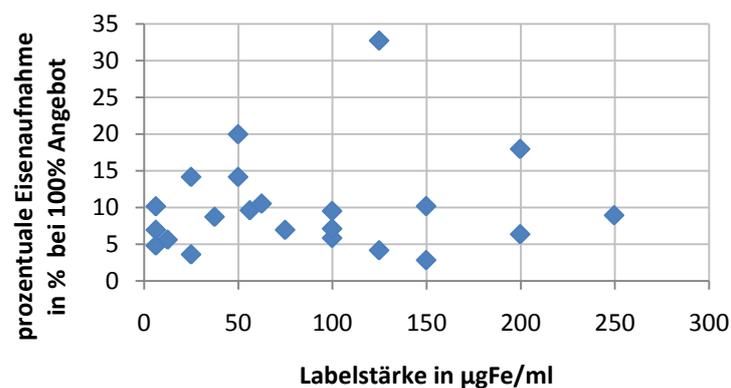


Abb.36 prozentuale Eisenaufnahme [%] bei 100% Angebot als Grad für den Aktivierungslevel der Makrophagen bezogen auf die Labelstärke [ $\mu\text{gFe/ml}$ ]

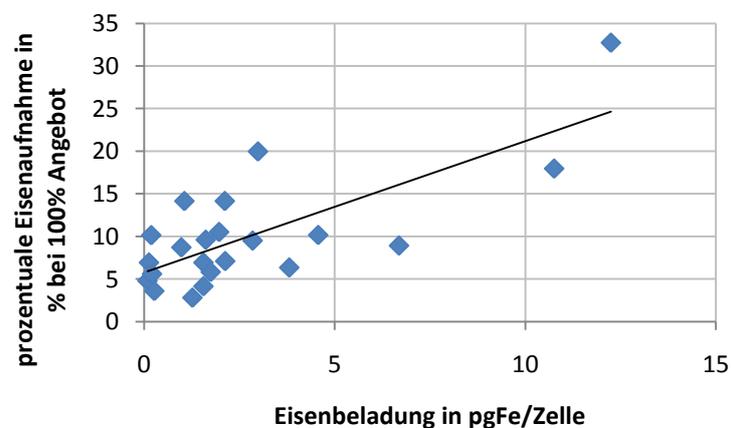


Abb.37 Prozentuale Eisenaufnahme [%] bei 100% Angebot als Grad für den Aktivierungslevel der Makrophagen bezogen auf die Eisenbeladung [ $\text{pgFe/Zelle}$ ]

In Abbildung 37 hingegen ist ein Zusammenhang der prozentualen Eisenaufnahme und der tatsächlichen zellulären Eisenbeladung sichtbar. Mit steigender Eisenbeladung wird eine bessere Eisenausschöpfung des bestehenden Eisenangebots sichtbar. Dabei ergeben sich bei zeitlich nahegelegenen oder sogar am selben Tag durchgeführten Protokollen eine ähnliche prozentuale Eisenaufnahme.

### 3.4 MR-Relaxometrie zur Quantifizierung von $T_2$ und $T_2^*$

#### 3.4.1 Die $T_2$ -Messungen

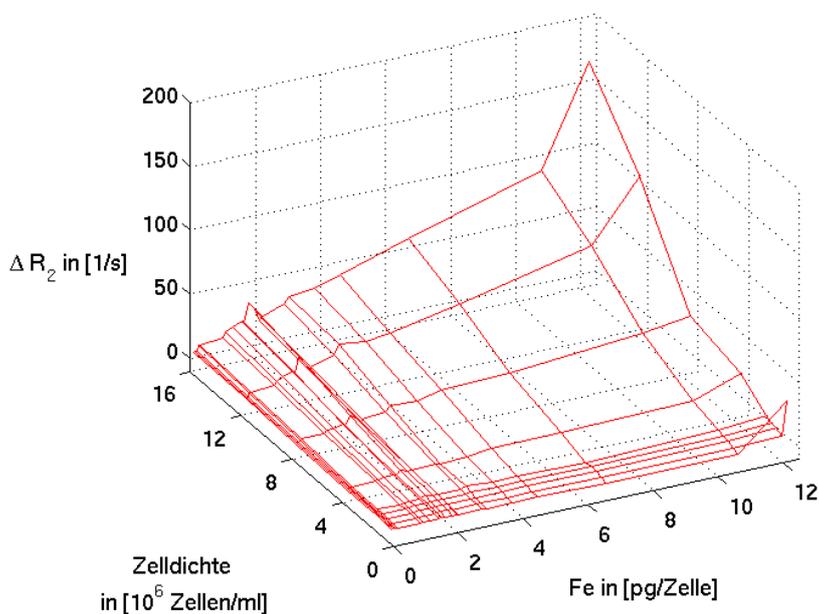


Abb.38 Fläche aus Eisenbeladung, Zelldichte und  $R_2$

Die dargestellte Fläche besteht aus 229 Messpunkten. Diese stammen von 458 gemessenen NMR-Röhrchen, bei denen jeweils zwei bei gleicher Eisenbeladung dieselbe Zellzahl enthalten und dann arithmetisch gemittelt werden. Es werden insgesamt 22 Protokolle gemessen bei einer Messzeit von ungefähr 5 Stunden pro Protokoll. Die Fläche lässt sich so in Richtung der Zellbeladung in 22 einzelne Kurven und in Richtung der Zelldichte in 9 einzelne Kurven zerlegen. Hierbei wird die Zelldichte in 9 Stufen variiert ( $16 \cdot 10^6$  /  $12 \cdot 10^6$  /  $8 \cdot 10^6$  /  $4 \cdot 10^6$  /  $2 \cdot 10^6$  /  $16 \cdot 10^5$  /  $12 \cdot 10^5$  /  $8 \cdot 10^5$  /  $4 \cdot 10^5$  [Zellen/ml] ). Dazu kommt noch zusätzlich die Zelldichte 0 für Leeragar. Die Labelstärke wird in 14

---

Stufen variiert (6,24 / 12,48 / 24,97 / 37,45 / 49,93 / 56,18 / 62,42 / 74,90 / 99,86 / 124,83 / 149,80 / 199,73 / 249,66 [ $\mu\text{gFe/ml}$ ] ) und ergibt, wie schon in Kapitel 3.3 erläutert, Eisenbeladungen zwischen 0,09 und 12,25 [ $\text{pg Fe/Zelle}$ ].

Die  $R_2$ -Relaxationsraten bewegen sich im Bereich von -0,5 bis 164,9 [1/s]. Die Standardabweichungen (in der Abbildung nicht gezeigt) der  $R_2$ -Relaxationsraten bewegen sich zwischen 0,025 und 27,172 [1/s]. Es ist mit wachsendem  $R_2$ -Wert eine Zunahme der Standardabweichung sichtbar. Dies entspricht einer normalen Zunahme der Messungenauigkeit bei grossen  $R_2$ -Werten.

Um die Zusammenhänge zwischen  $\Delta R_2$ , Eisenbeladung und Zelldichte besser untersuchen zu können, wird jeweils ein Parameter konstant gehalten und die beiden übrigen verglichen.

### **$\Delta R_2$ vs. Eisenbeladung**

Bei konstanter Beladungsstärke nehmen die  $\Delta R_2$ -Relaxationsraten zu höheren Zelldichten hin zu. Schaubild 39 zeigt die interpolierten Regressionsgeraden durch die Messpunkte. Die Regressionsgeraden werden mit größeren Eisenbeladungen steiler. Ihre Steigung ist die Relaxivität  $r_{2n}$  bei konstanter Eisenbeladung.

Die Korrelationskoeffizienten der 5 abgebildeten Regressionsgeraden sind größer als  $r = 0,986$  bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,001$ . Die Regressionsgeraden aller 22 Protokolle bewegen sich zwischen  $r = 0,944$  ( 12,25  $\text{pgFe/Zelle}$  ) und  $r = 0,998$  ( 2,13  $\text{pgFe/Zelle}$  ) bei einem Signifikanzniveau  $p < 0,001$ .

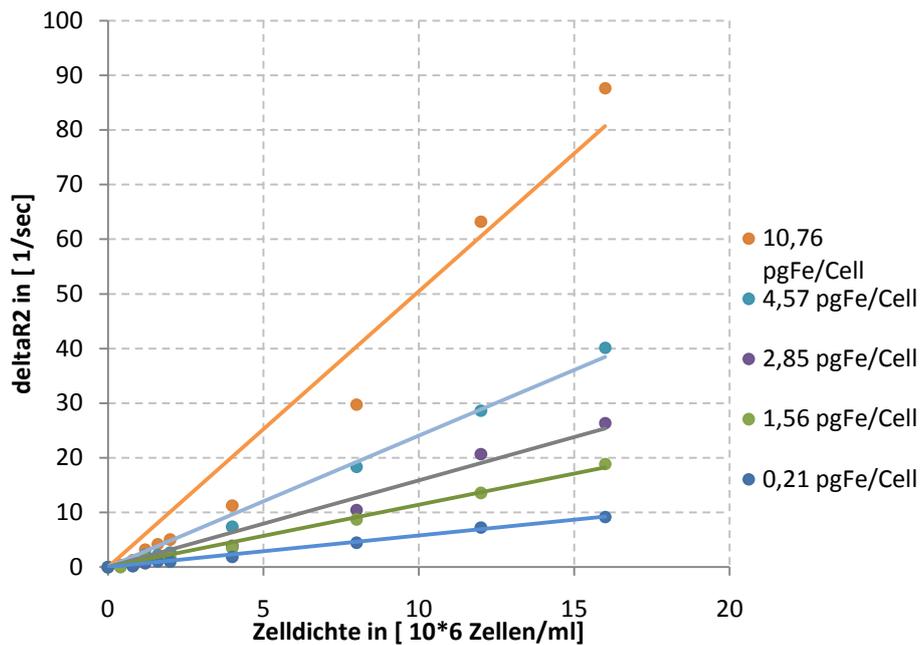


Abb. 39 Messpunkte und Ausgleichsgeraden bei konstanten Eisenbeladungsstärken (verschiedene Farben entsprechen unterschiedlichen Eisenbeladungsstärken). Der Übersichtlichkeit halber sind von 22 Eisenbeladungsstärken nur 5 dargestellt.

Abbildung 40 zeigt die unterschiedlichen Relaxivitäten  $r_{2n} = \Delta R_2 / \Delta n$  (mit  $n =$  Zelldichte) der 5 exemplarischen Eisenbeladungen aus Abbildung 39 und des Rests der 22 Protokolle. Die  $r_{2n}$ -Werte zeigen eine positive lineare Korrelation zu der Eisenbeladung, das heißt die Relaxivitäten steigen mit zunehmender Eisenbeladung an.

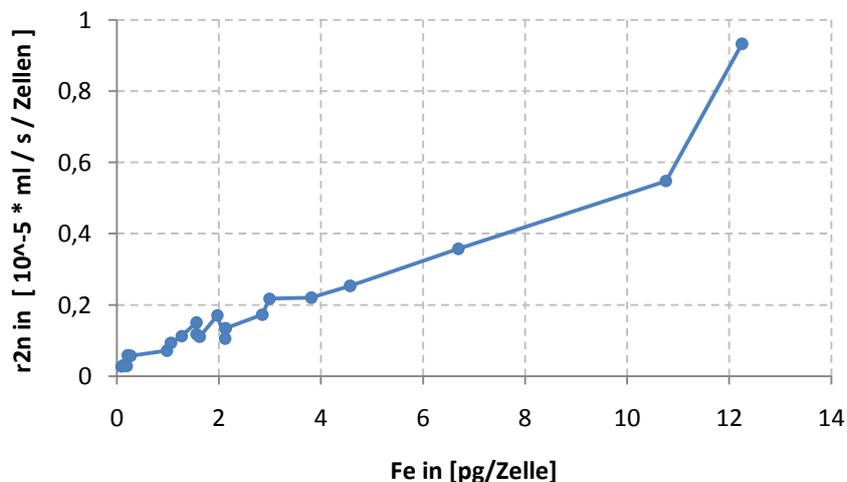


Abb.40  $r_{2n}$  bezogen auf die Eisenbeladung pgFe/Zelle

## $\Delta R_2$ vs. Zelldichte

Belässt man die Zelldichte konstant und verändert die Eisenbeladung, wie in Abbildung 41 dargestellt, so zeigen sich zunehmende  $\Delta R_2$ -Relaxationsraten mit zunehmender Eisenbeladungsstärke. Die interpolierten Geraden zeigen eine steigende Tendenz. Die Korrelationskoeffizienten bei konstanter Zellzahl bewegen sich zwischen  $r = 0,659$  ( $4 \cdot 10^5$  Zellen/ml) und  $r = 0,980$  ( $8 \cdot 10^6$  Zellen/ml) bei einem Signifikanz-Niveau  $p < 0,001$ . Es sind nur wenige grob neben den Ausgleichsgeraden liegende Messpunkte sichtbar.

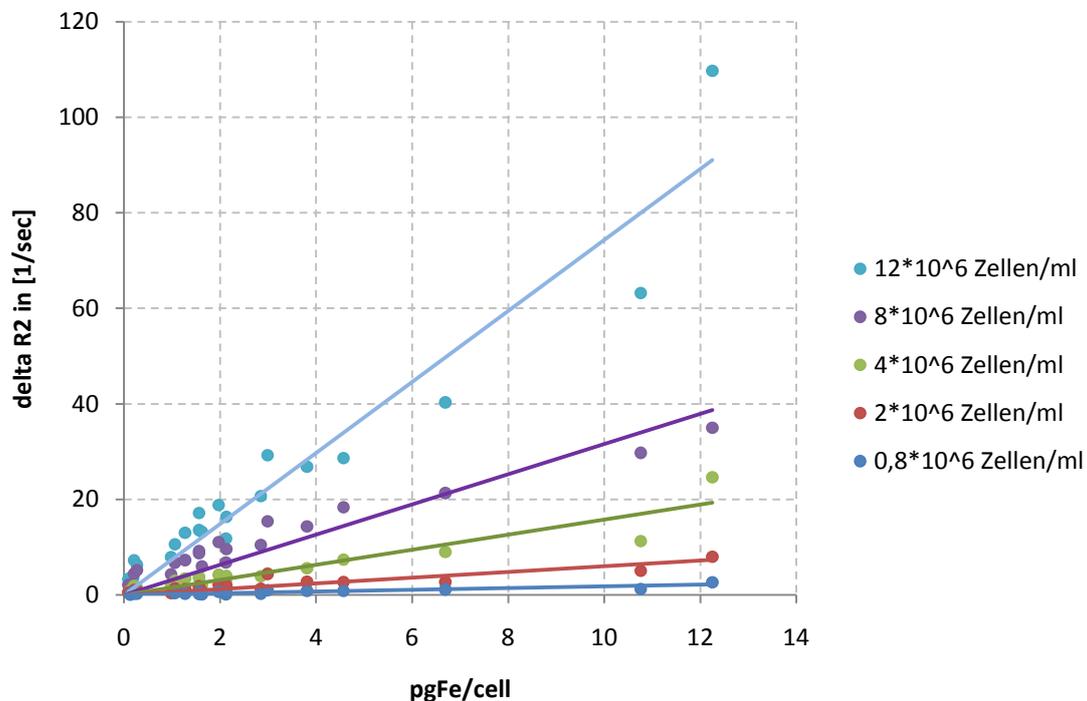


Abb. 41 Messpunkte und Ausgleichsgeraden bei konstanter Zelldichte (verschiedene Farben entsprechen unterschiedlichen Zelldichten). Der Übersichtlichkeit halber sind von den 10 Zelldichten nur 5 dargestellt.

Abbildung 42 zeigt die unterschiedlichen Relaxivitäten  $r_{2z} = \Delta R_2 / \Delta n$  (mit  $n =$  Zelldichte) der 5 exemplarischen Eisenbeladungen aus Abbildung 41 und des Rests der 22 Protokolle. Die  $r_{2z}$ -Werte zeigen eine positive lineare Korrelation zu der Zelldichte, das heißt die Relaxivitäten steigen mit zunehmender Zelldichte an.

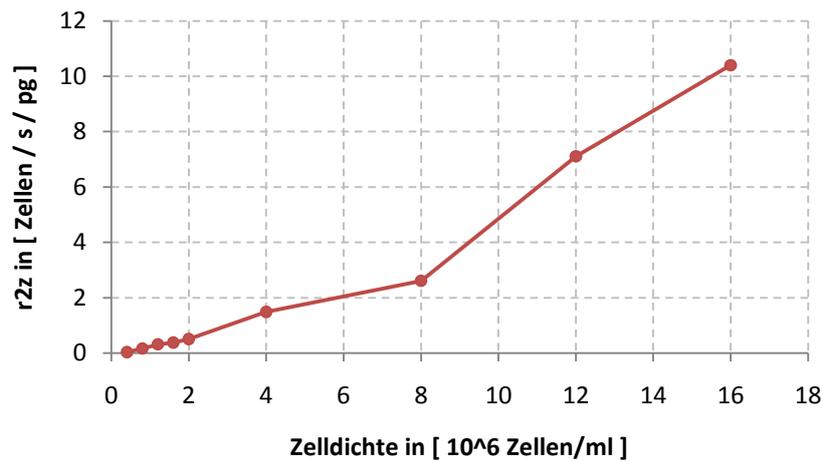


Abb.42 r<sub>2z</sub> bezogen auf die Zelldichte [10<sup>6</sup> Zellen/ml]

### ΔR<sub>2</sub> vs. Gesamteisenmenge

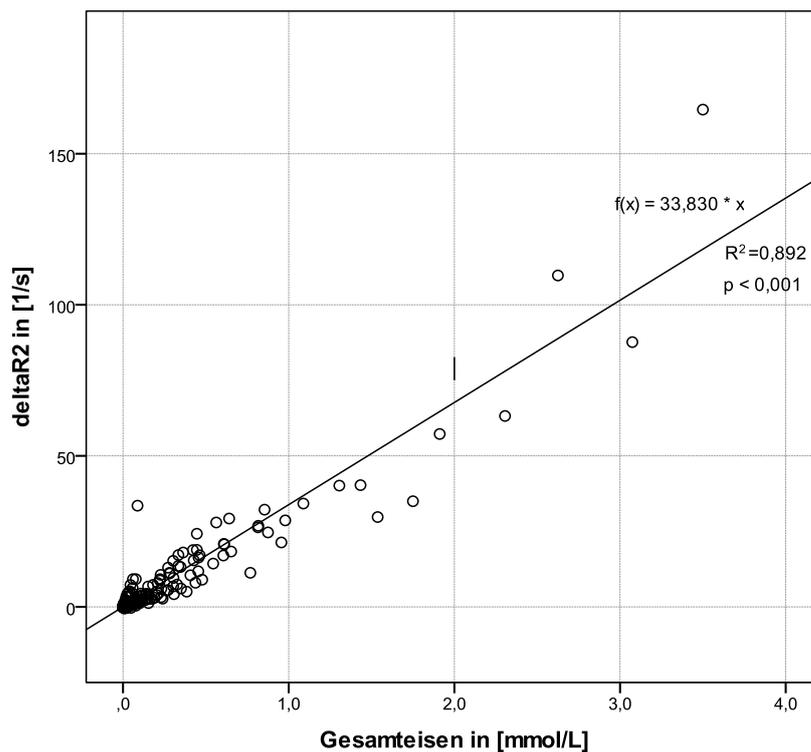


Abb. 43 Intrazelluläres VSOP: ΔR<sub>2</sub> -Werte aufgetragen gegen Gesamteisenmenge der Probe

Die Gesamteisenmenge unserer Versuche mit intrazellulärem VSOP reicht von 0 bis 3,5 mM (=mmol/L). Es ist eine positive Korrelation der ΔR<sub>2</sub> -Werte mit dem Gesamteisen der Probe sichtbar (Abbildung 43). Dabei ist der

Korrelationskoeffizient  $r = 0,945$  bei einer Signifikanz von  $p < 0,001$ . Die Regressionsgerade hat die Gleichung

$$f(x) = 33,830 * x$$

Die Steigung der Geraden markiert die Relaxivität  $r_2 = 33,830 \text{ mM}^{-1} * \text{s}^{-1}$  von intrazellulärem VSOP bei einer Feldstärke von 7,05 T und einer Temperatur von 18°C. Dabei reicht das 95%-Konfidenzintervall von 32,225 bis 35,435  $\text{mM}^{-1} * \text{s}^{-1}$ .

### VSOP in Lösung: $\Delta R_2$ vs. Gesamteisenmenge

Für die Bestimmung der Relaxivität von extrazellulärem VSOP in Lösung wird eine Reihe mit 0,0 / 0,05 / 0,1 / 0,5 / 1,0 / 5,0 / 10,0 / 20,0 / 40,0 / 70,0 / 120,0  $\mu\text{gFe/ml}$  durchgeführt mit 2 NMR-Tubes pro Konzentration. Die molare Gesamteisenmenge reicht von 0,0008 bis 2,14 mmol/l. Die  $\Delta R_2$ -Werte reichen von 0,15 bis 144 [1/s]. Es zeigt sich eine positive Korrelation von  $r=0,996$  bei  $p<0,001$ . Die berechnete Regression ergibt eine  $r_2$ -Relaxivität von 68,275  $\text{mM}^{-1} * \text{s}^{-1}$  bei einem 95%-Konfidenzintervall von 65,228 bis 71,322  $\text{mM}^{-1} * \text{s}^{-1}$ . Siehe Abb. 44.

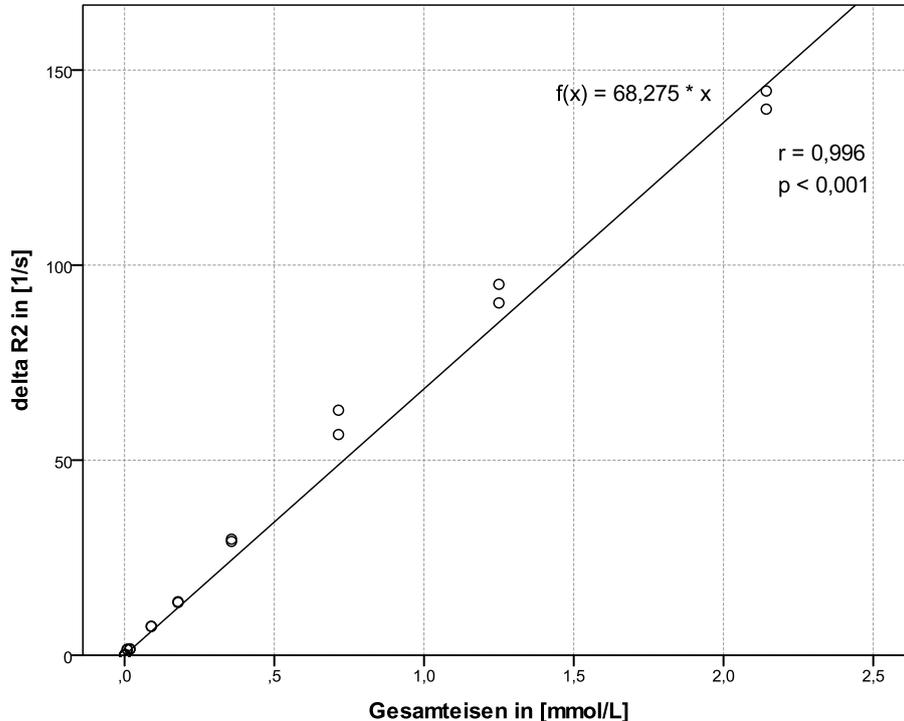


Abb.44 Extrazelluläres VSOP:  $\Delta R_2$ -Werte aufgetragen gegen Gesamteisenmenge der Probe

## Vergleich mit Vorversuchen

Vergleiche mit den  $r_2$ -Relaxivitäten von intrazellulärem VSOP aus den Vorversuchen zeigen, dass die  $r_2$ -Relaxivität aus dem Versuch um 5,7% abweicht (graue Felder, Tabelle 7). Dabei gilt  $\% \Delta r_2 = \frac{r_2 - r_{2\text{vorversuch}}}{r_{2\text{vorversuch}}}$  mit  $r_2 = 33,830 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  und  $r_{2\text{vorversuch}} = 32 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . Daraus ergibt sich  $\% \Delta r_2 = 5,7 \%$ .

Der Vergleich mit den  $r_2$ -Relaxivitäten von extrazellulärem VSOP in Lösung aus den Vorversuchen zeigt, dass die  $r_2$ -Relaxivität aus dem Versuch um 13,5% abweicht (graue Felder, Tabelle 7). Dabei gilt  $\% \Delta r_2 = \frac{r_2 - r_{2\text{vorversuch}}}{r_{2\text{vorversuch}}}$  mit  $r_2 = 68,275 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  und  $r_{2\text{vorversuch}} = 79 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . Daraus ergibt sich  $\% \Delta r_2 = 13,5 \%$ .

Contrast	Proton	r1				r2				r1/r2	
		in solution		in cells		in solution		in cells		in solution	in cells
Agent	Frequency	[s-1mM-1]	r	[s-1mM-1]	r	[s-1mM-1]	r	[s-1mM-1]	r		
	[MHz]										
AMNP (9)	63	10.2	-	1.1	-	357	-	248	-	0.029	0.004
Rh-AMNP	300	4.78	>0.97	0.21	>0.99	379	>0.99	56	>0.99	0.012	0.004
Rh-AMNP	500	3.28	>0.97	0.19	>0.95	389	>0.99	37	>0.99	0.008	0.005
Rh-AMNP	750	2	>0.97	0.10	>0.97	354	>0.99	23	>0.99	0.005	0.004
AMI-25	300	1.98	>0.95	0.57	>0.95	148	>0.95	72	>0.95	0.001	0.008
AMI-25	500	1.02	>0.97	0.22	>0.97	140	>0.97	60	>0.90	0.007	0.004
AMI-25	750	0.79	>0.97	0.15	>0.92	150	>0.97	19	>0.97	0.005	0.008
<b>Vorversuch VSOP C-200</b>	<b>300</b>	<b>4.09</b>	<b>&gt;0.97</b>	<b>0.25</b>	<b>&gt;0.90</b>	<b>79</b>	<b>&gt;0.90</b>	<b>32</b>	<b>&gt;0.90</b>	<b>0.051</b>	<b>0.008</b>
<b>Versuch VSOP C-200</b>	<b>300</b>					<b>68,275</b>		<b>33,830</b>	<b>&gt;0.94</b>		
VSOP C-200	500	1.77	>0.97	0.06	>0.97	103	>0.97	30	>0.97	0.017	0.002
VSOP C-200	750	1.57	>0.97	0.14	>0.97	112	>0.97	15	>0.97	0.014	0.009

Tab.7 Relaxivitäten verschiedener Kontrastmittel. Darunter r1- und r2-Werte von VSOP C-200 in Lösung und intrazellulär (Vorversuch und Versuch fettgedruckt und unterlegt)

Der Vergleich der von uns ermittelten  $r_2$ -Relaxivitäten von extrazellulärem VSOP in Lösung mit  $68,275 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  und von intrazellulärem VSOP mit  $33,830 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  zeigt, dass sich die Relaxivität mit der Internalisation von VSOP im untersuchten Bereich um den Faktor 2,02 verringert.

### 3.4.2 Die $T_2^*$ -Messungen

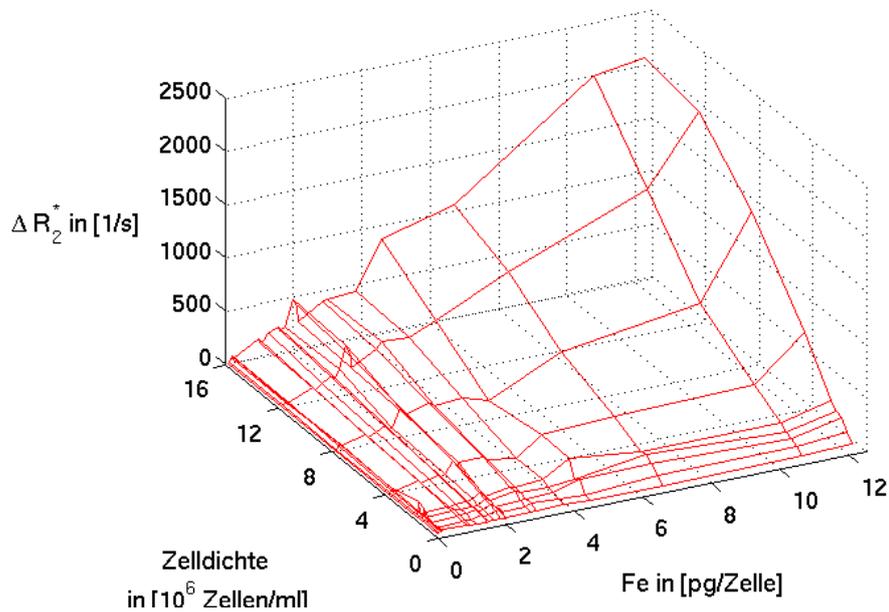


Abb.45 Fläche aus Eisenbeladung, Zelldichte und  $R_2^*$

Die Fläche der  $\Delta R_2^*$ -Werte besteht wie bei den  $\Delta R_2$ -Werten aus 229 Messpunkten (Erläuterungen zur Messung siehe Seite 69).

Die  $\Delta R_2^*$ -Relaxationsraten befinden sich zwischen -37,492 und 2113,219 [1/s].

Es werden zur Übersichtlichkeit im Folgenden  $\Delta R_2^*$ , Eisenbeladung und Zelldichte wieder mit jeweils einem konstant-gehaltenen Parameter getrennt betrachtet.

#### $\Delta R_2^*$ vs. Eisenbeladung

Bei konstanter Beladungsstärke nehmen die  $\Delta R_2^*$ -Relaxationsraten zu höheren Zelldichten hin zu. Schaubild 46 zeigt die interpolierten Regressionsgeraden durch die Messpunkte. Die Regressionsgeraden werden mit größeren Eisenbeladungen steiler. Ihre Steigung ist die Relaxivität  $r_{2n}^*$  bei konstanter Eisenbeladung.

Die Korrelationskoeffizienten der 5 abgebildeten Regressionsgeraden sind größer als  $r = 0,947$  bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,001$ . Die

Regressionsgeraden aller 22 Protokolle bewegen sich zwischen  $r = 0,929$  ( 0,09 pgFe/Zelle ) und  $r = 0,998$  ( 6,69 pgFe/Zelle ) bei einem Signifikanzniveau  $p < 0,001$ .

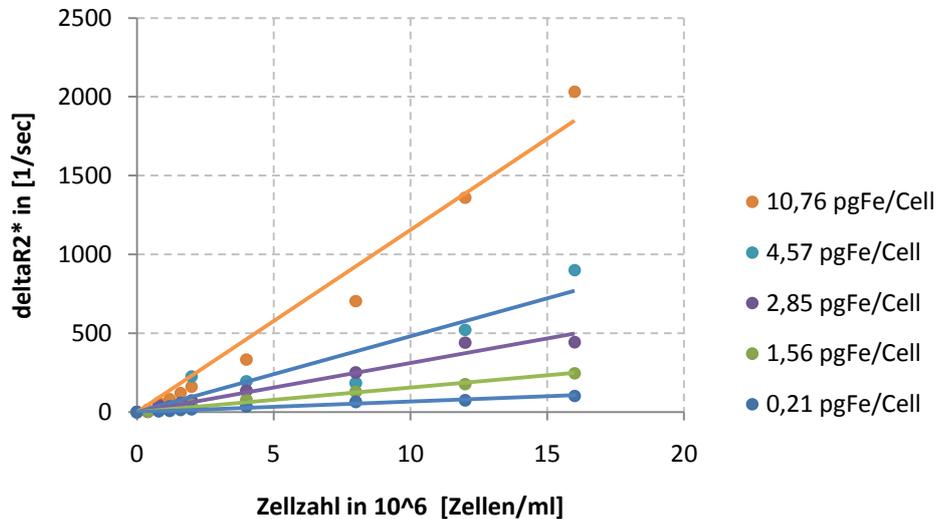


Abb. 46 Messpunkte und Ausgleichsgeraden bei konstanten Eisenbeladungsstärken (verschiedene Farben entsprechen unterschiedlichen Eisenbeladungsstärken). Der Übersichtlichkeit halber sind von 22 Eisenbeladungsstärken nur 5 dargestellt.

Abbildung 47 zeigt die unterschiedlichen Relaxivitäten  $r_{2n}^*$  der 5 exemplarischen Eisenbeladungen aus Abbildung 46 und des Rests der 22 Protokolle. Die  $r_{2n}^*$ -Werte zeigen eine positive lineare Korrelation zu der Eisenbeladung, das heißt die Relaxivitäten steigen mit zunehmender Eisenbeladung an.

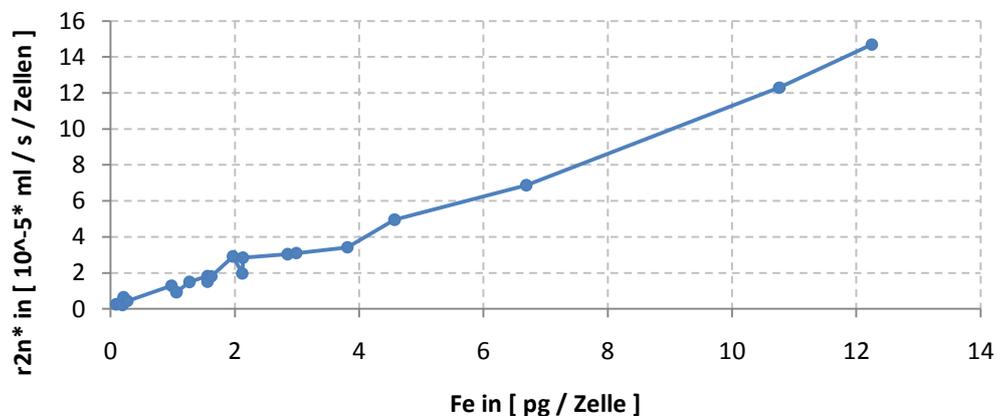


Abb.47  $r_{2n}^*$  (normiert) bezogen auf die Eisenbeladung pgFe/Zelle

## $\Delta R_2^*$ vs. Zelldichte

Belässt man die Zelldichte konstant und verändert die Eisenbeladung, wie in Abbildung 48 dargestellt, so zeigen sich zunehmende  $\Delta R_2^*$ -Relaxationsraten mit zunehmender Eisenbeladungsstärke. Die interpolierten Geraden zeigen eine steigende Tendenz. Die Korrelationskoeffizienten bei konstanter Zellzahl bewegen sich zwischen  $r = 0,478$  ( $4 \cdot 10^5$  Zellen/ml) und  $r = 0,992$  ( $16 \cdot 10^6$  Zellen/ml) bei  $p < 0,05$ . Es sind nur wenige grob neben den Ausgleichsgeraden liegende Messpunkte sichtbar.

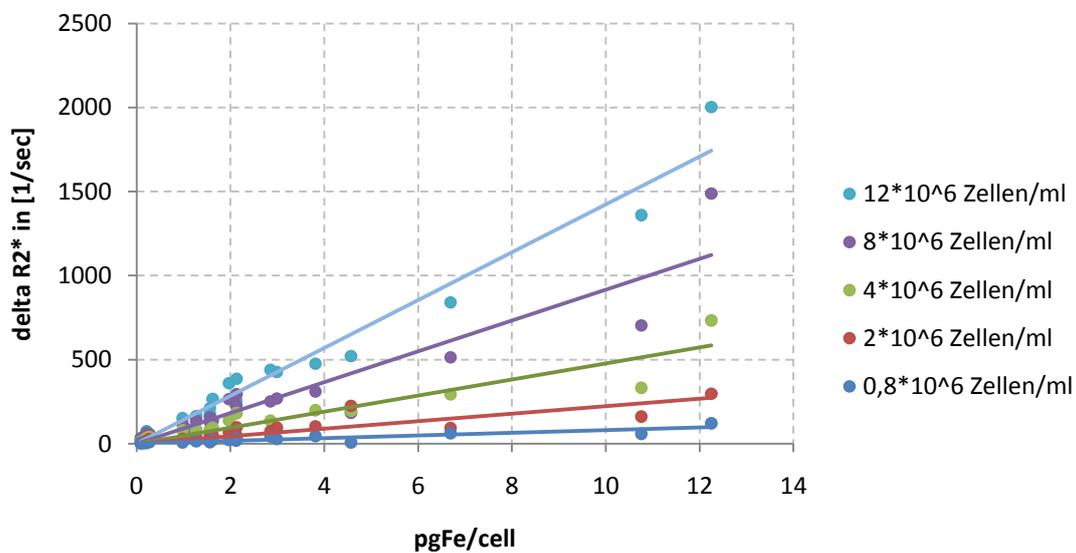


Abb. 48 Messpunkte und Ausgleichsgeraden bei konstanter Zelldichte (verschiedene Farben entsprechen unterschiedlichen Zelldichten). Der Übersichtlichkeit halber sind von den 10 Zelldichten nur 5 dargestellt.

Abbildung 49 zeigt die unterschiedlichen Relaxivitäten  $r_{2Z}^*$  der 5 exemplarischen Eisenbeladungen aus Abbildung 48 und des Rests der 22 Protokolle. Die  $r_{2Z}^*$ -Werte zeigen eine positive lineare Korrelation zu der Zelldichte, das heißt die Relaxivitäten steigen mit zunehmender Zelldichte an.

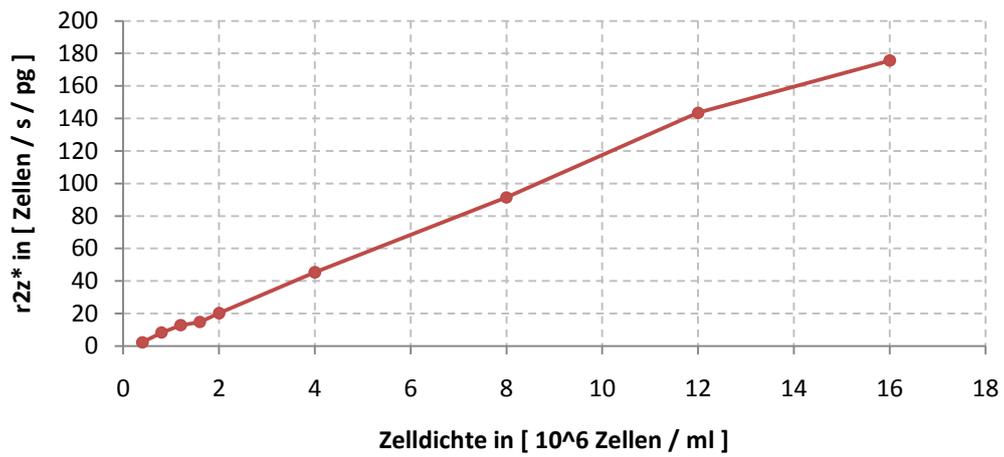


Abb.49  $r_{2z}^*$  bezogen auf die Zelldichte [ $10^6$  Zellen/ml]

### $\Delta R_2^*$ vs. Gesamteisenmenge

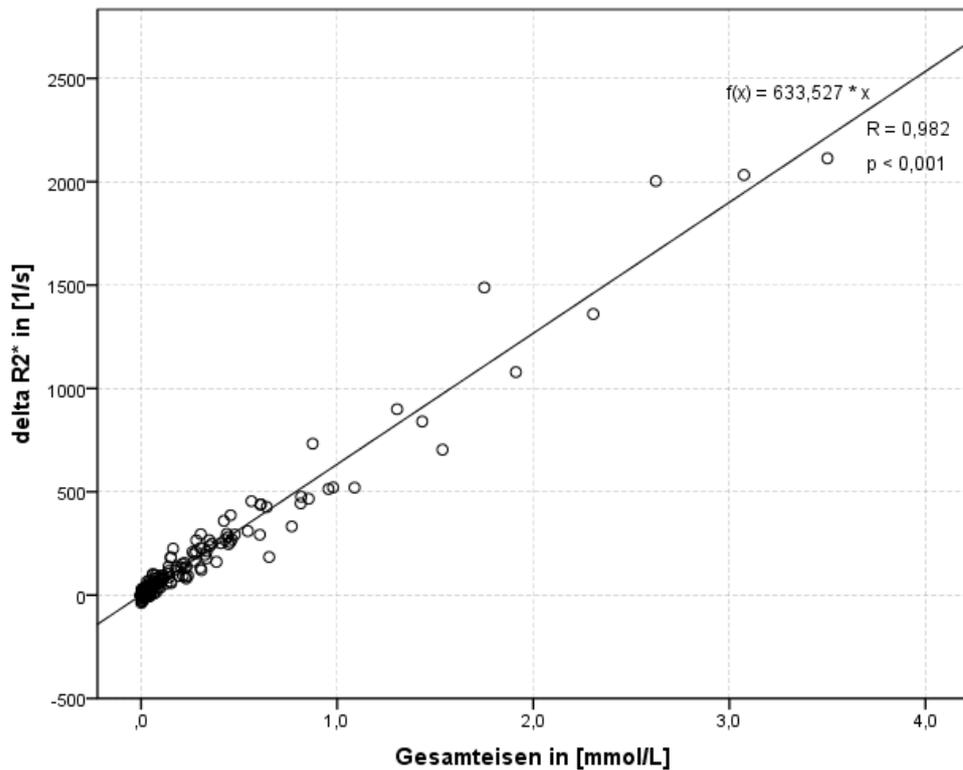


Abb. 50 Zusammenhang der  $\Delta R_2^*$  -Werte und der Gesamteisenmenge in mM (mmol/l).

Es besteht eine positive Korrelation der  $\Delta R_2^*$ -Werte mit dem Gesamteisen der Probe (Abbildung 50). Dabei ist der Korrelationskoeffizient  $r = 0,982$  bei einer

Signifikanz von  $p < 0,001$ . Die Regressionsgerade hat die Gleichung

$$f(x) = 633,527 * x$$

Die Steigung ist die Relaxivität  $r_2^* = 633,527 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  von intrazellulärem VSOP bei einer Feldstärke von 7,05 T und einer Temperatur von 18°C. Dabei reicht das 95%-Konfidenzintervall von 616,741 bis 650,313  $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ .

Der Vergleich mit der  $r_2$ -Relaxivität von 33,830  $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  zeigt, dass die  $r_2^*$ -Relaxivität etwa 19mal so groß ist.

### $\Delta R_2^*$ vs. $\Delta R_2$

Es wurden die jeweils für eine Beladungsstärke und eine Zelldichte vorliegenden  $\Delta R_2^*$ -Werte und  $\Delta R_2$ -Werte miteinander verglichen. Es zeigt sich dabei ein Korrelationskoeffizient von  $r = 0,935$  bei  $p < 0,001$ . Abbildung 51 verdeutlicht dies anhand der extrapolierten Gerade.

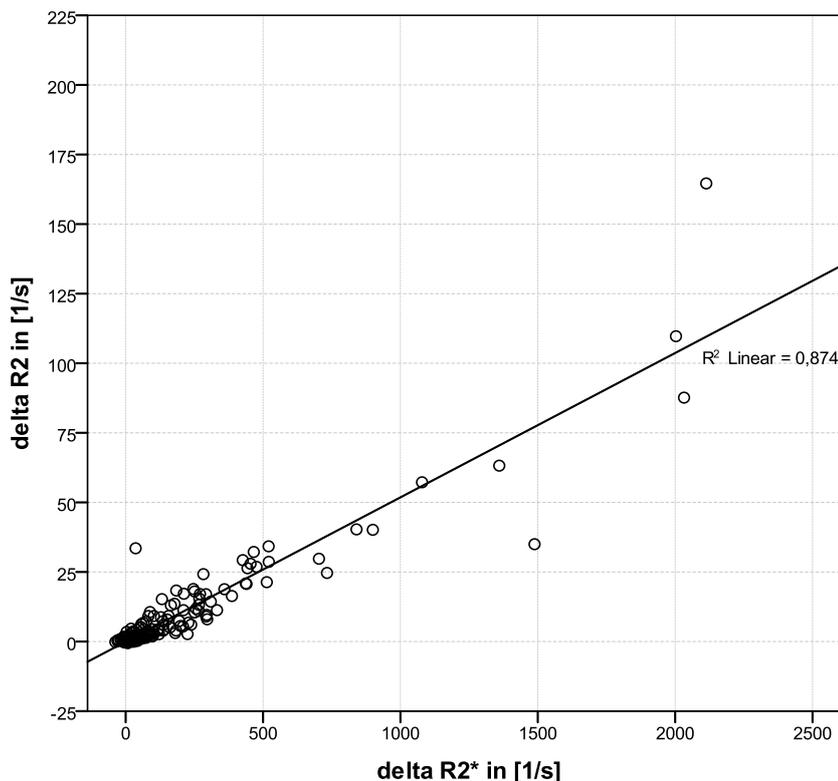


Abb. 51 Lineare Korrelation zwischen  $\Delta R_2^*$  und  $\Delta R_2$ .

Zur Veranschaulichung aller unserer Messdaten dienen die Abbildungen 52 und 53. Die Flächen bauen auf einer Interpolation der  $\Delta R_2$ - und  $\Delta R_2^*$ -Werte jeweils aufgetragen gegen die Gesamteisenmenge und die Zelldichte auf (erstellt mit XYZ-Gridding in OriginPro 8G, Northampton, USA). Die Flächen steigen gegen höhere Zelldichten und höhere Eisenbeladungen hin an.

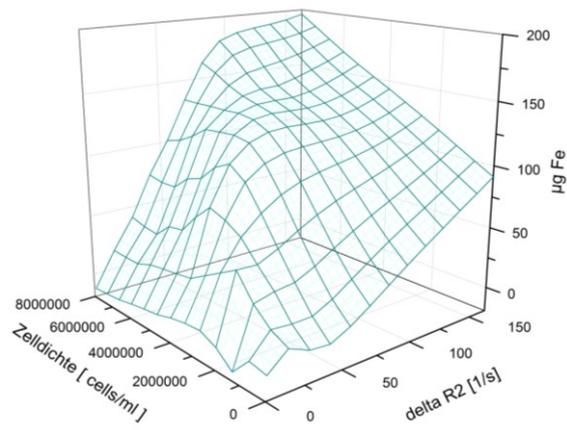


Abb.52  $\Delta R_2$ -Fläche mit  $\Delta R_2$ , Zelldichte und Gesamteisenmenge. Zelldichten beziehen sich auf 0,5ml

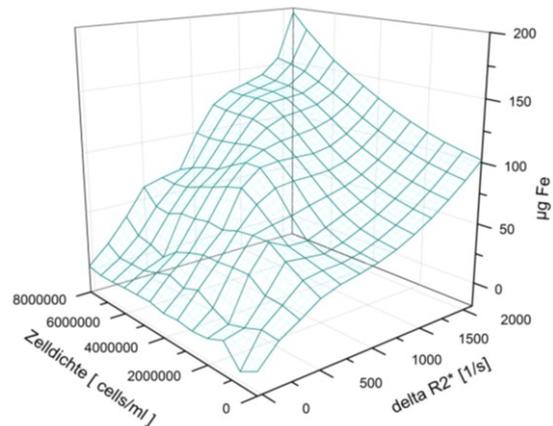


Abb. 53  $\Delta R_2^*$ -Fläche mit  $\Delta R_2$ , Zelldichte und Gesamteisenmenge. Zelldichten beziehen sich auf 0,5ml

---

### 3.4.3 Bestimmung der Zelldichte

Stark vereinfacht betrachtet, lässt sich über die linearen Zusammenhänge mithilfe  $\Delta R_2$ ,  $\Delta R_2^*$  und Eisenbeladung die lokale Zelldichte errechnen. Wie in Abbildung 33 sichtbar steht die Eisenbeladung in einem linearen Zusammenhang mit der Labelstärke. Durch eine definierte Labelstärke kann somit die zelluläre Eisenbeladung errechnet werden. Die Eisenbeladung führt zu der Relaxivität  $r_{2n}$  in Abbildung 40 und zur Relaxivität  $r_{2n}^*$  in Abbildung 47.

Für die Bestimmung der lokalen Zelldichte kann folgende Formel angewendet werden:

$$\text{Zelldichte} \left[ \frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \right] = \frac{\left( \frac{\Delta R_2}{r_{2n}} \right) + \left( \frac{\Delta R_{2\text{stern}}}{r_{2n\text{stern}}} \right)}{2} \quad (2)$$

mit  $\Delta R_2$ = gemessenes korrigiertes  $R_2$

mit  $\Delta R_{2\text{star}}$ = gemessenes gegen Hintergrund korrigiertes  $R_2^*$

mit  $r_{2n}$ = aus der Eisenbeladung berechnete Relaxivität  $r_{2n}$  (siehe Abb.40)

mit  $r_{2n\text{star}}$ = aus der Eisenbeladung berechnete Relaxivität  $r_{2n\text{star}}$  (siehe Abb.47).

Es wird das arithmetische Mittel aus den über die  $\Delta R_2$ - und  $\Delta R_2^*$ -Werte errechneten Zelldichten gebildet. Nach Rechnung und Diagramm sollten die Zelldichten theoretisch gleich sein. Graphisch betrachtet, entsprechen die zwei Zähler des Terms in Formel (2) den x-Achsen-Werten in Abbildung 39 und Abbildung 46.

Die Anwendung der Formel (2) an allen von uns erhobenen  $\Delta R_2$ - und  $\Delta R_2^*$ -Daten führt zu den Zelldichte-Werten in Abbildung 62. Nach durchgeführtem Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest sind diese Werte normalverteilt. Wie in der Abbildung sichtbar, befindet sich der Zelldichte-Zielwert stets innerhalb der einfachen Standardabweichung der errechneten Werte. Im Schaubild ist die mittlere senkrechte Linie der Zelldichte-Zielwert (jeweils unter dem Schaubild angegeben). Die flankierenden Linien links und rechts markieren -1SD und +1SD.

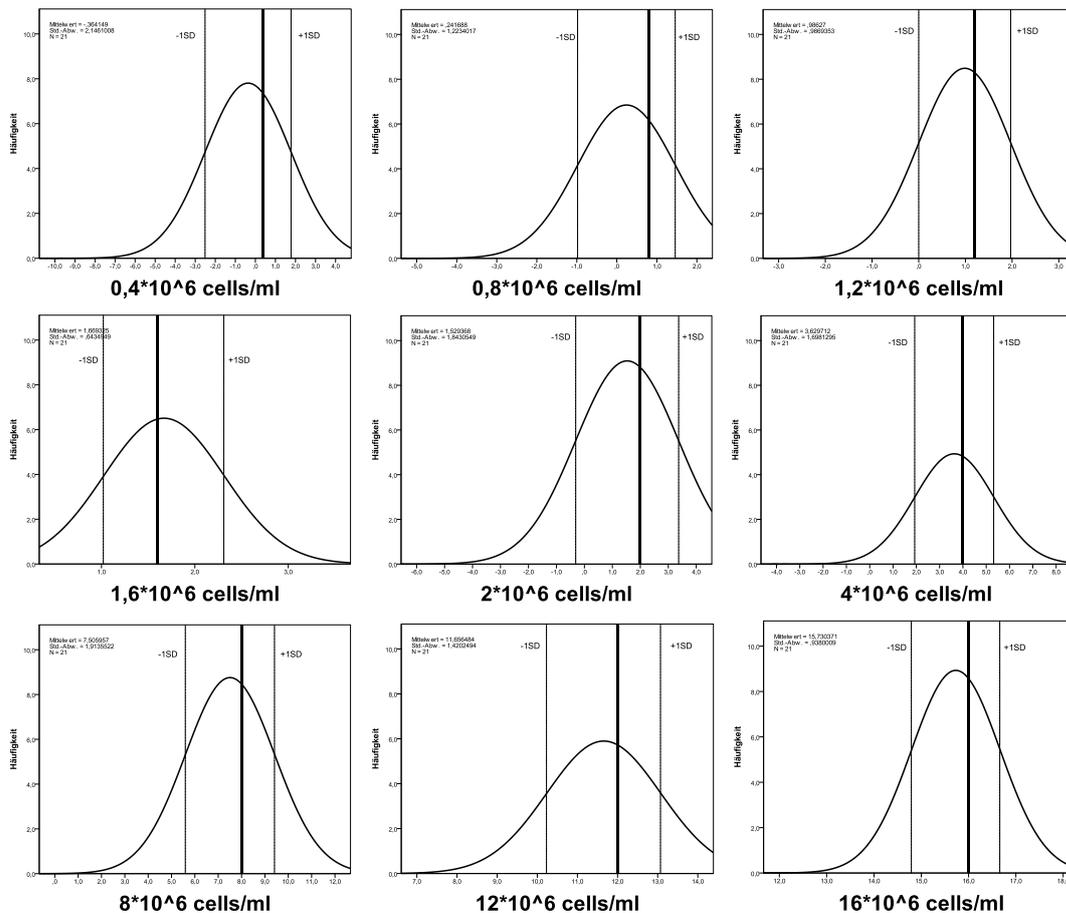


Abb.62 Normalverteilungen der errechneten Ergebnisse aus Formel (1). Die mittlere senkrechte Linie markiert den tatsächlichen Zelldichte-Zielwert (jeweils unter dem Schaubild angegeben). Die flankierenden senkrechten Linien links und rechts sind die Standardabweichungen -1SD und +1SD aus den errechneten Zelldichten über alle Eisenbeladungen.

Aufgrund der breiten Normalverteilungen fragten wir uns, welche Werte den Randbereich ausmachen. Aus diesem Grund bestimmten wir die prozentualen Abweichungen der einzelnen Zelldichte-Ergebnisse vom Zelldichte-Zielwert. Der Übersichtlichkeit halber sind in Abbildung 63 nur 3 Zelldichte-Reihen aufgetragen. Die 0,4 (hellblau) / 2 (grün) / 16 (rot) \*  $10^6$  Zellen/ml -Zielwert-Reihen zeigen, dass bei geringer Eisenbeladung und geringer Zelldichte von  $0,4 \cdot 10^6$  der Fehler groß ist und mit steigender Eisenbeladung abnimmt (hellblaue Punkte). Für hohe Zelldichten ( $16 \cdot 10^6$  Zellen/ml, rote Punkte) trifft dies nicht zu. Hier sind die Fehler schon im unteren Beladungsbereich sehr klein.

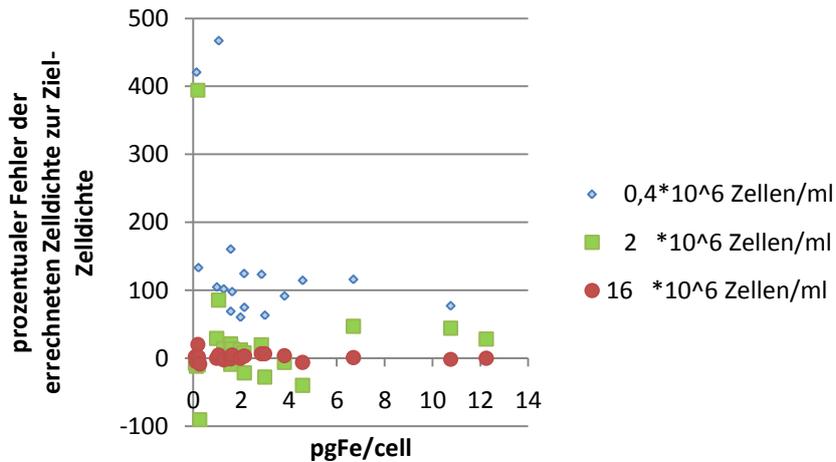


Abb. 63 Prozentuale Abweichung der errechneten Zelldichte vom Zelldichten-Zielwert. Dargestellt für die 3 Zelldichten 0,4 / 2 / 16 \*10<sup>6</sup> Zellen/ml.

Wir schlussfolgern daraus, dass die Fehler mit unserer linearen Approximation in Formel (2) bei geringen Zelldichten erst mit wachsender Beladung kleiner werden. Dies ist verständlich, wenn man bedenkt, dass bei niedriger Zelldichte und kleinen Beladungen nur kleine  $\Delta R_2$ - und  $\Delta R_2^*$ -Werte auftreten, die damit große relative Fehler aufgrund unserer Messungengenauigkeit aufweisen. Ebenso folgern wir, dass unsere lineare Approximation für hohe Zelldichten wie z.B.  $16 \cdot 10^6$  Zellen/ml sowohl für geringe als auch hohe Eisenbeladungen wenig fehlerbehaftete Ergebnisse liefert.

### 3.5 Eisennachweis über Histologie ( Färbungen )

#### Transmissions-Elektronen-Mikroskopie

Die TEM-Bilder zeigen die intrazelluläre Aufnahme der Eisen-Oxid-Nanopartikel. Es ist die Aggregation der VSOPs innerhalb der Phagosomen und eine Fusion zweier Phagosomen erkennbar (Schaubild 54). Im Vergleich zweier Zellbeladungsstärken sind im elektronenmikroskopischen Bild deutliche Unterschiede in der Phagosomenbeladung sichtbar. So sind bei hoher Eisenbeladungsstärke von  $2,76 \pm 0,05$  [pgFe/Zelle] die Phagosomen mit Eisen ausgefüllt, während sie bei niedriger Beladung mit  $0,31 \pm 0,2$  [pgFe/Zelle] weniger dunkel erscheinen.

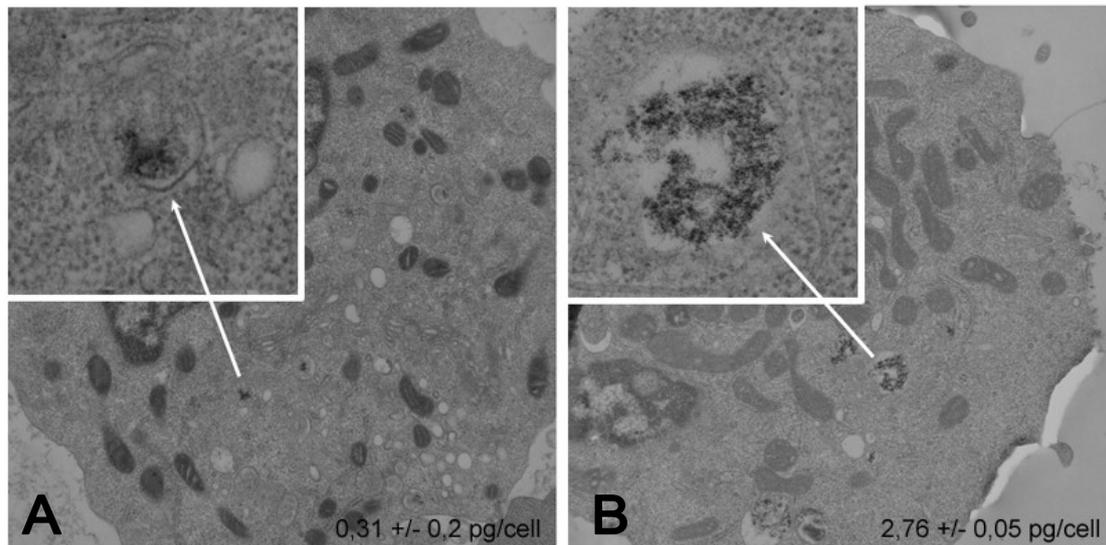


Abb.54 Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (TEM) von peritonealen Maus-makrophagen (200'000fache Vergrößerung) bei niedriger (A) und hoher (B) Zellbeladung

#### Das mikroskopische Bild

##### Sensitivität der Färbungen

In den Ausstrichpräparaten werden in den High-Power-Fields mit hoher Zelldichte  $88,0 \pm 28,4$  Zellen ausgezählt. In Fields mit mittlerer Dichte  $30,9 \pm 17,5$  und bei niedriger Dichte  $25,7 \pm 20,0$  Zellen. In den Zytospins werden im Durchschnitt pro Gesichtsfeld  $47,1 \pm 28,0$  Zellen ausgezählt.

Mit steigender zellulärer Eisenbeladung sind in den Ausstrichen und Zytospins mehr Eisen-positive Zellen erkennbar. Dies zeigt Abbildung 55.

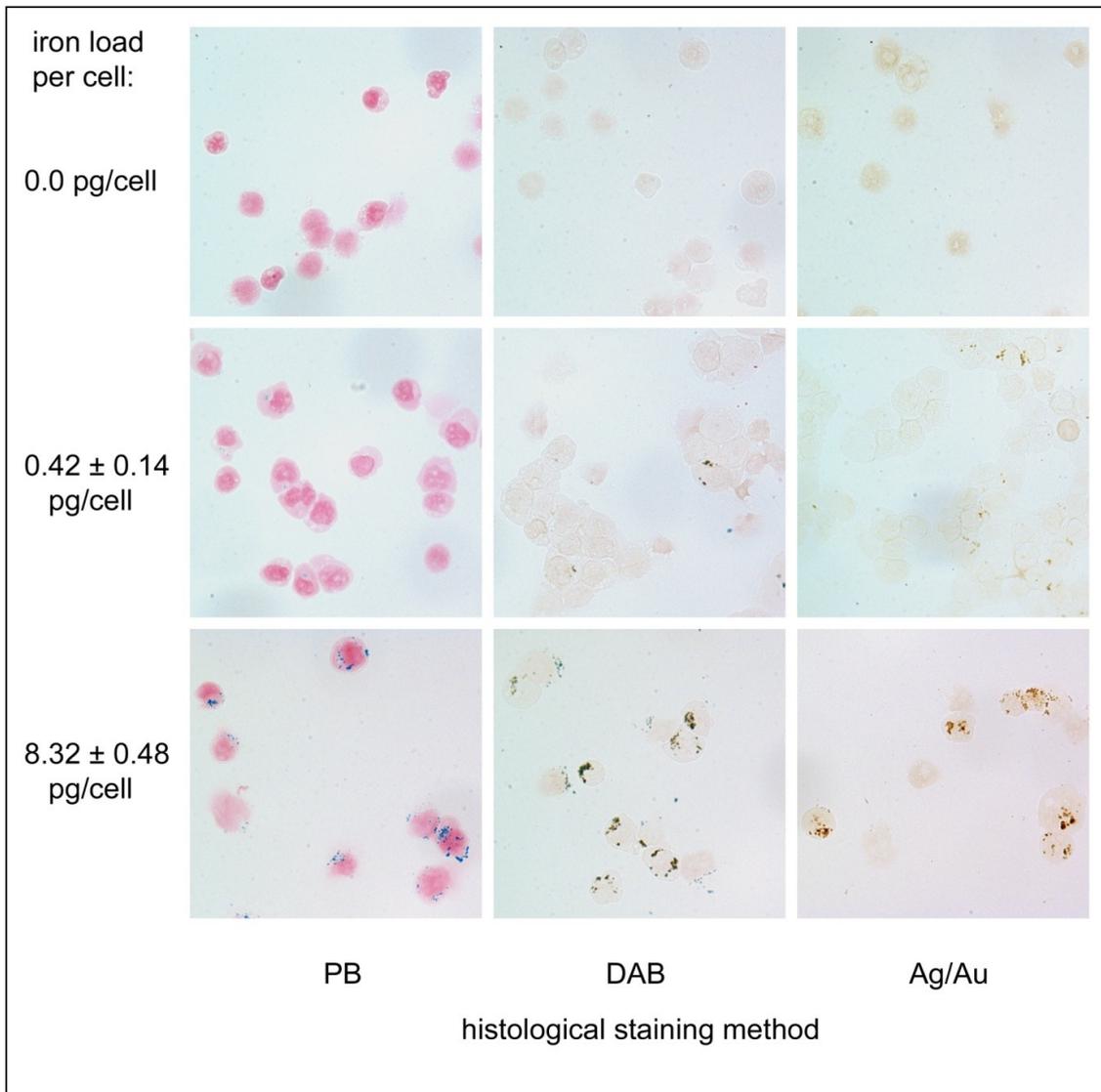


Abb.55 Preußisch-Blau-Färbung (PB), Diaminobenzidin-Verstärkung (+ DAB) und Silber-Gold-Verstärkung (+ Ag/Au) bei 3 verschiedenen zellulären Eisenbeladungen. Bei einer Eisenbeladung von 0 pg/Zelle keine Färbung der Zellen sichtbar. Bei 0,42 pg/Zelle sind vereinzelt eisen-positive Zellen zu erkennen, während bei einer hohen Eisenbeladung von 8,32 pg/Zellen deutlich eisenpositive Zellen in allen 3 Färbungen zu sehen sind.

Im Vergleich zur Preußisch-Blau-Färbung (PB) führen die Verstärkung (= Enhancement) der Preußisch-Blau-Färbung mit Diaminobenzidin (DAB) und Silber-Gold (Ag-Au) zu einer höheren Sensitivität für den Eisennachweis (siehe

Tabelle 8). Betrachtet man die Minimalwerte (fettgedruckt), so zeigen bei Eisenbeladungen unter 0,672 pg/Zelle alle 3 Färbungen weniger als 25% eisen-positive Zellen. Bei Eisenbeladungen über 1,351 pg/Zelle (PB+DAB-Färbung) können mehr als 50% eisen-positive Zellen nachgewiesen werden sowie über 2,550 pg/Zelle (PB+DAB-Färbung) mehr als 75%. Folgende Formel beschreibt das Verhalten der Sensitivität der Färbungen

$$y = a - b * c^x$$

Die dazugehörigen Variablen a, b und c für die jeweilige Färbung sind in nachfolgender Tabelle aufgeführt.

	a	b	c	y (x=25)	y (x=50)	y (x=75)
PB	109,42	113,61	0,75	1,049	2,295	4,220
PB+DAB	97,78	110,25	0,54	<b>0,672</b>	<b>1,351</b>	<b>2,550</b>
PB+DAB+AgAu	91,12	94,51	0,61	0,717	1,670	3,550

Tab.8 Rechnerische Ergebnisse der zelluläre Eisenbeladung y in [pg/Zelle] bei den verschiedenen Färbungen PB, PB+DAB, PB+DAB+AgAu unter Angabe der Formelvariablen.

Aus der Tabelle ist zu entnehmen, dass die Eisenbeladung, um 25%, 50% und 75% eisenpositive Zellen bestimmen zu können, für die Preußisch-Blau-Färbung höher liegt als für die Diaminobenzidin- und Silber-Gold-verstärkten Färbemethoden. Da jedoch diese Werte aus den Regressionskurven der Datensätze abgeleitet sind, lässt sich keine Aussage über signifikante Unterschiede zwischen den drei Färbungen machen.

Nachfolgend sind die Schaubilder mit den Prozentwerten eisenpositiver Zellen im Vergleich zur Eisenbeladung einzeln dargestellt (die x-Achse entspricht hier den y-Werten in Tab.8 und die y-Achse den x-Prozent-Werten in Tab.8). Hiermit lässt sich die Eisenbeladung bei einem untersuchten Prozentsatz eisenpositiver Zellen ablesen.

## PB

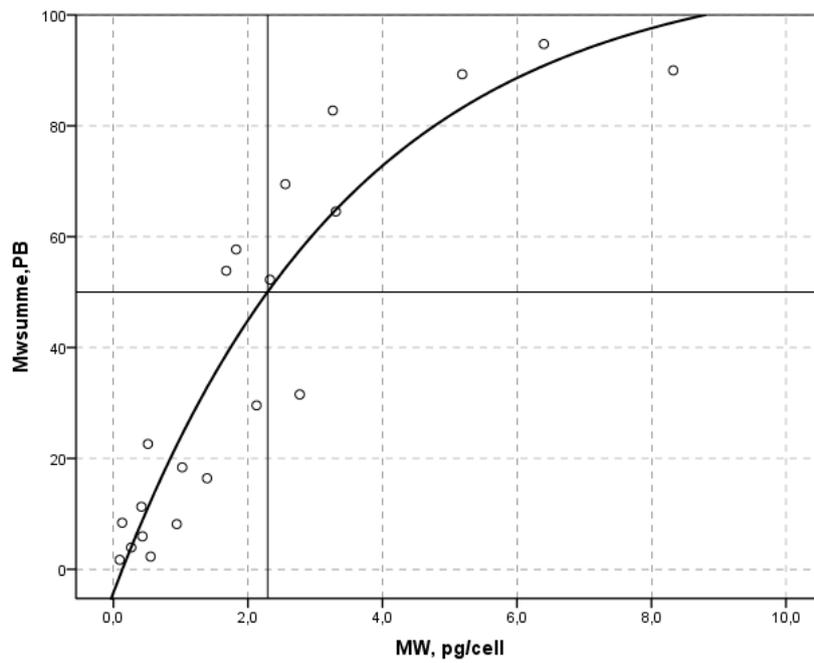


Abb.56 Preußisch-Blau-Färbung: Mittlerer Prozentsatz an gelabelten Zellen in [%] bezogen auf die Eisenbeladung in [pg/Zelle]

## DAB

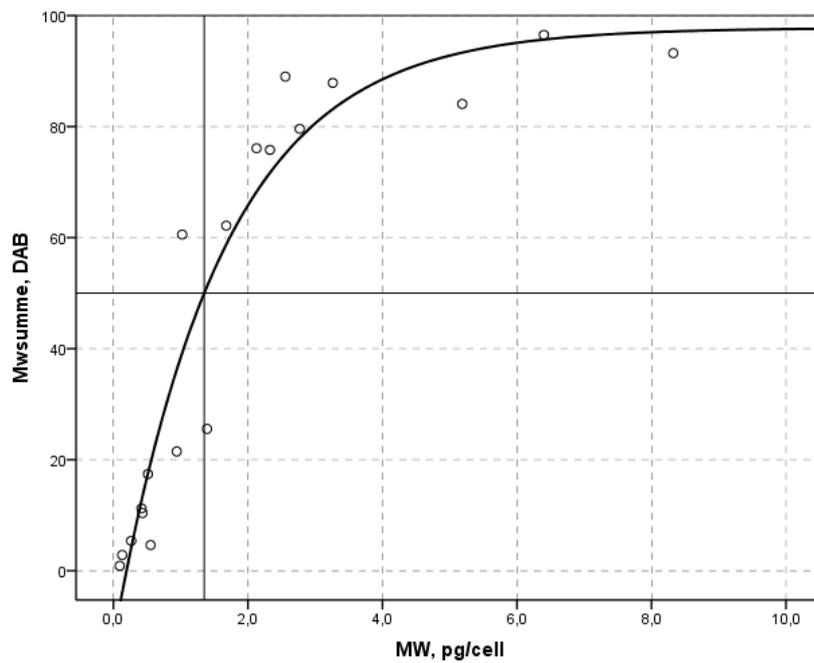


Abb.57 DAB-verstärkte Preußisch-Blau-Färbung: Mittlerer Prozentsatz an gelabelten Zellen in [%] bezogen auf die Eisenbeladung in [pg/Zelle]

## Ag-Au

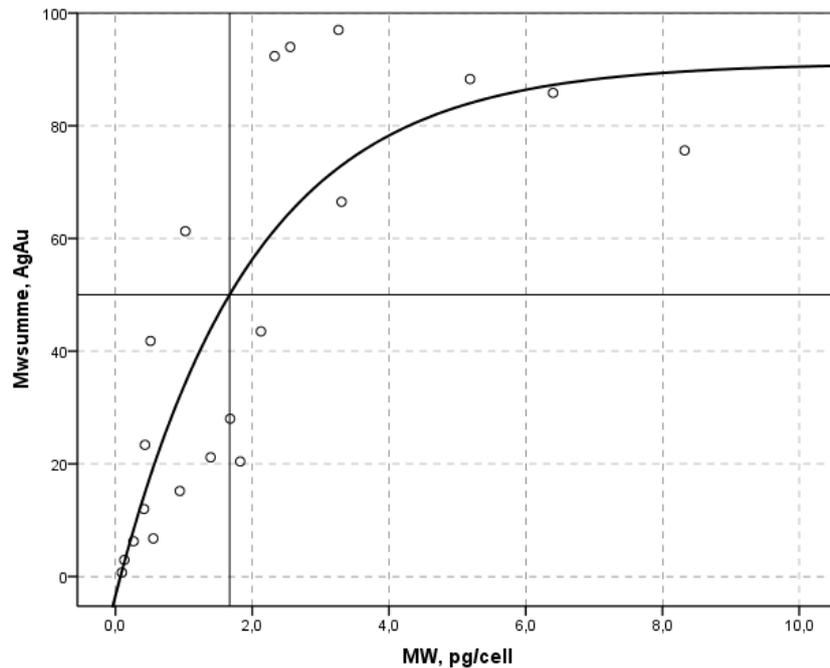


Abb.58 Ag-Au-verstärkte Preußisch-Blau-Färbung: Mittlerer Prozentsatz an gelabelten Zellen in [%] bezogen auf die Eisenbeladung in [pg/Zelle]

## Sensitivität der MR-Messung

Für den Vergleich mit der MRT werden die Zellen aus denselben Protokollen wie für die Histologie in MR-Phantomen vermessen. Wie in Abbildung 59 sichtbar steigt die Relaxationsrate  $\Delta R_2$  bei zunehmenden Eisenbeladungsstärken nur schwach an, während für die Relaxationsrate  $\Delta R_2^*$  ein steiler linearer Anstieg sichtbar ist. Die Korrelationskoeffizienten liegen sowohl für  $\Delta R_2^*$  ( $r = 0,973$ ) als auch für  $\Delta R_2$  ( $r = 0,958$ ) nahe an  $r = 1$ . Wie in Schaubild 59 ebenso zu erkennen ist, gelingt durch die Linearität bis hinab zum Nullpunkt der Eisennachweis geringster Eisenbeladungen durch die Messung der  $\Delta R_2$ - und  $\Delta R_2^*$ -Werte. Die Beziehung zwischen  $\Delta R_2$  bzw.  $\Delta R_2^*$  und der Zelldichte ist im unteren Teil der Abbildung 59 sichtbar. Sie zeigt ein in kleinste Zelldichten sich veränderndes  $\Delta R_2^*$ , während kaum eine Änderung des  $\Delta R_2$  ab Zelldichten von  $8 \cdot 10^5$  (Zellbeladung: 0,26pg/cell) abwärts zu erkennen ist.

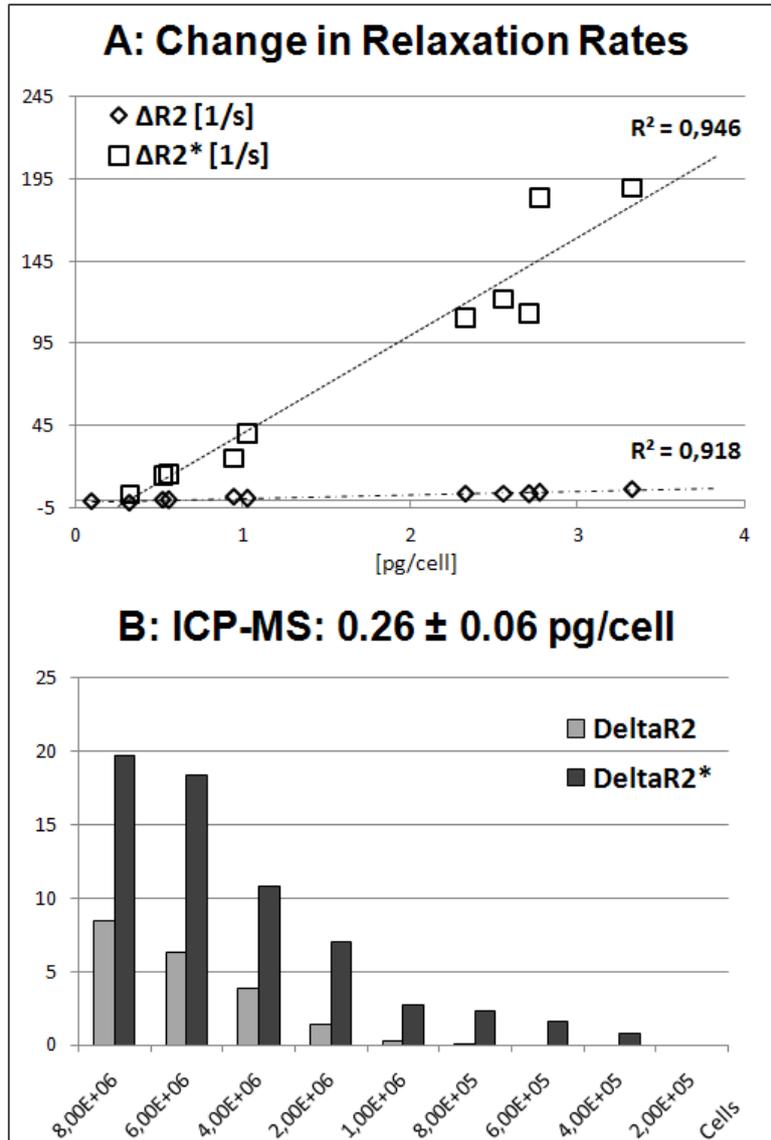


Abb.59 Änderung der Relaxationsrate  $\Delta R2$  und  $\Delta R2^*$  mit zunehmender Eisenbeladung.

---

## 4. Diskussion

In dieser Arbeit haben wir gezeigt, dass

- 1) es möglich ist, bei gleichbleibend guter Viabilität reproduzierbar eine Makrophagenzelllinie mit Eisenkontrastmittel zu labeln.
- 2) genau definierte Phantome herstellbar sind, in welchen intakte eisengelabelte Zellen homogen verteilt sind, die artefaktarm sind und welche stabile Bedingungen über einen längeren Zeitraum schaffen.
- 3) die Eisenbeladung pro Zelle per ICP-MS sehr exakt bestimmt werden kann und jeweils linear mit der Labelstärke und der Phagozytoseaktivität der Zellen zusammenhängt.
- 4) die  $R_2$ - und die  $R_2^*$ -Relaxationsraten positiv mit der Zelldichte und der Eisenbeladung korrelieren und über ihre Bestimmung die molare Gesamteisenmenge wie auch die Zelldichte errechnet werden kann.
- 5) VSOP in PMJ2-R-Makrophagen lysosomal aufgenommen wird und eine quantitative Aussage über die Sensitivität von MR und Färbungen zum Eisennachweis gemacht werden kann.

### 4.1 Zellkultur und Labeling

Die Zellkultur bildet das optimalste Modell für die MR-Messung, da sie unkontrollierbare Effekte mit anderen Zellen minimiert<sup>29</sup>.

Die PMJ2-R-Makrophagen von Adami et al.<sup>1</sup> stellen ein stabiles Zellsystem dar. Dies zeigt sich an dem vernachlässigbaren Einfluss der Zellpassage und der Labelstärke auf die Viabilität (Abb.23, Abb.26). Signifikanten Einfluss auf die Viabilität hat jedoch der Labelvorgang selbst (Abb.24). Engberink et al.<sup>66</sup> zeigten, dass SPIOs in niedriger und mittlerer Dosis keinen Einfluss auf die Viabilität haben. Wir konnten dies für das USPIO VSOP zeigen. Ein berechtigter Einwand Engberinks et al.<sup>66</sup> war, dass die Viabilität lediglich direkt nach dem Labeling bestimmt wird. Auch in dieser Studie wurde die Viabilität direkt nach

---

dem Labelvorgang bestimmt. Die Viabilität längere Zeit danach gilt es deshalb in zukünftigen Studien noch näher zu untersuchen.

Bezüglich der Toxizität von SPIOs/USPIOs fand Engberink bei hohen Eisenkonzentration von 3,7 mgFe/ml eine Reduktion der Viabilität auf  $76\pm 3,3\%$  ( $P=0,015$ ) für SPIOs und  $83\pm 2,3\%$  ( $P=0,08$ ) für USPIOs. Bei uns reichen die Eisenkonzentrationen von 6 – 250  $\mu\text{gFe/ml}$ , liegen also mindestens um den Faktor 14 unter Engberinks maximaler Eisenkonzentration. Die Viabilität unserer Zellen wird durch die gewählten Eisenkonzentrationen nicht beeinflusst (Kap. 3.1, Abb.26). Naqvi et al.<sup>65</sup> zeigten an murinen Makrophagen, dass außerdem eine längere Labeling-Dauer von 6 anstatt 3 Stunden bei höheren Kontrastmittelkonzentrationen zum Viabilitätsverlust führt. Die Viabilität in unseren Versuchen blieb jedoch durch das fixe 4h-Protokoll unbeeinflusst.

Soenen et al.<sup>90</sup> verglichen VSOP mit Endorem, Resovist und Magnetoliposomen und zeigten erhöhte ROS-Levels nach dem VSOP-Labeling. Heymer et al.<sup>37</sup> belegten dies und zeigten, dass erhöhte ROS-Levels innerhalb 24h nach VSOP-Labeling entstehen und zytotoxisch wirken können. Corot et al.<sup>23</sup> und Stroh et al.<sup>97</sup> zeigten, dass die ROS-Level in RAW-Makrophagen durch VSOP transient erhöht waren und nach einem Tag wieder abfielen. Die Zeiträume unserer Studie mit 4h Labling und danach maximal 8h Messung schließen eine späte Zellschädigung durch erhöhte ROS-Level nicht aus. Eine massive akute Zelltoxizität können wir durch unseren Viabilitätsnachweis jedoch ausschließen (Abb. 24). Die erhöhten ROS-Level können nach Lunov et al.<sup>56</sup> durch ein Vitamin-E-Derivat, den ROS-Scavenger Trolox und durch N-Acetylcystein antagonisiert werden. Salgo et al.<sup>81</sup> bestätigten diese Ergebnisse. Nach Corot et al.<sup>23</sup> kann eine Erhöhung der ROS-Level wirksam durch den Eisenchelator Deferoxamin verhindert werden.

Williams et al.<sup>111</sup> zeigten, dass aufgrund der Phagozytoseaktivität für das Labeling von Makrophagen mit USPIOs kein Transfection-Agent benötigt wird. Wir konnten dies für VSOP anhand unserer TEM-Aufnahmen belegen (Abb.54). Die Eisenaufnahme selbst steht nach Morris et al.<sup>62</sup> in einem Zusammenhang mit dem Scavenger-Rezeptor-A, da sie durch die Expressionshemmung dieses

---

Rezeptors durch einen p38-MAP-Kinase-Inhibitor abnimmt. Eine Abnahme der USPIO-Aufnahme in Apo-E-KO-Mäusen durch einen p38-MAP-Kinase-Inhibitor wurde auch durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt<sup>44</sup>. Auf der anderen Seite fand unsere Arbeitsgruppe eine Steigerung der USPIO-Aufnahme durch erhöhte ATII-Levels wie bei aktiviertem RAAS zum Beispiel im Rahmen renaler Hypertension.

## 4.2 Phantombau

Simon et al.<sup>88</sup> zeigten an Lymphomzellen, dass Ficoll eine gleichmässige Zellverteilung garantiert und die Einbettung in Agarose zu Zelltod und Eisenfreisetzung führt. Dies traf nicht für die PMJ2-R-Makrophagen zu. Hier sanken die Zellen im Ficoll rasch ab - was problematisch bei 5 Stunden dauernden Messprotokollen ist - und die Agarose-Einbettung hatte keinen Einfluss auf die Integrität der Makrophagen. Auch bei Kuhlpetter et al.<sup>48</sup> zeigten sich bei der Lungenkarzinomzell-Einbettung in Agargel keine Eisenfreisetzung. Chajra et al.<sup>21</sup> bezeichneten Agar als zuverlässiges Trägermedium und Maxwell et al.<sup>57</sup> schrieben Agar Bindegewebe-Eigenschaften zu. Es finden sich in der Literatur verschiedene Konzentrationen des Agargels. So verwendeten Muller et al.<sup>63</sup> und Pintaske et al.<sup>70</sup> 1%iges Agargel. Kuhlpetter et al.<sup>48</sup> und Mills et al.<sup>60</sup> führten ihre Messungen an 2%igem Agargel durch. Wir entschieden uns für die Einbettung in 0,5%iges Agargel, da dies in warmem Zustand eine geringere Viskosität aufweist - was sich für das Pipettieren in die NMR-Röhrchen als günstig erweist - und trotzdem in erkaltetem Zustand einen ausreichend stabilen Träger für die Zellen darstellt. Unsere Untersuchungen hierzu (siehe Abbildung 29-31) bestätigen dies.

Der Vorteil vom untersuchten Kollagen-Hydrogel beschrieben Geckil et al.<sup>32</sup> und Chen et al.<sup>22</sup> in der Nachahmung einer ECM (extrazellulären Matrix), in der Wachstum und Zell-Zell-Interaktion ermöglicht werden. Hunt et al.<sup>41</sup> zeigten Vorteile des Hydrogels wie die alpha-helikale Struktur des Kollagens-Typ-I, die resultierende fibrilläre Struktur der Matrix und die Degradierbarkeit im Gegensatz zu Agargel auf. Als Nachteil von Hydrogel führten sie

---

Schrumpfungsartefakte an. Dies wäre bei uns für die Messung an definierten Zelldichten nachteilig gewesen.

Den Vorteil der örtlichen Fixierung der Zellen wollten wir ausnutzen, stießen jedoch auf einen weiteren Nachteil von Kollagen-Hydrogel: die Aggregation von Kollagen-Typ-I mit VSOP mit resultierender Inhomogenität (Abb.27). Außer Kollagen-Hydrogel beschrieben Tibbitt et al.<sup>105</sup> Hydrogele aus Fibrin, Hyaluronsäure, Chitosan, Alginate und Seidenfibrillen. Die Eignung für die Phantomherstellung bleibt bei ihnen noch zu untersuchen.

Aus unserem Vergleich der gängigsten Einbettmedia Agar, Ficoll und Kollagen-Hydrogel zeigt sich Agar als günstiges Einbettmedium. Seine leichte Herstellbarkeit, die homogenen Signaleigenschaften und der fehlende Einfluss auf die Makrophagen-Integrität sprechen außerdem dafür.

Wie bei Brisset et al.<sup>15</sup> ergaben die  $T_2$ -Messungen ungelabelter Zellen im MR (Kap 3.2, Abb.32, Tab.4) bei unterschiedlicher Zelldichte keine signifikanten Unterschiede. Damit spielt die Änderung der Zelldichte ohne Kontrastmittel keine Rolle. Anders als Brisset fanden wir jedoch eine signifikante  $R_2$ -Steigerung bei Anwesenheit ungelabelter Zellen im Vergleich zu reinen Agarphantomen. Dies blieb bei  $R_2^*$  aus.

### 4.3 Eisenbeladung der Zellen

Die ICP-MS stellt die quantitative Erweiterung des qualitativen Eisennachweises durch die Preußisch-Blau-Färbung und ihre Enhancements DAB und Ag/Au dar. Sie ist ein hochsensitives Messinstrument, das den Parameter Eisenbeladung quantifizierbar macht. Mit einer mittleren Abweichung von  $-0,17 \pm 1,88\%$  ( $n=5$ ) besitzt sie eine hohe Genauigkeit. Voraussetzung für die Eisenbestimmung in Zellen jedoch ist die Lokalisation des Eisen intra- und nicht extrazellulär. Eine hohe Viabilität als Voraussetzung dafür konnte in unseren Experimenten mit 90% intakten Makrophagen direkt nach dem Labelvorgang gezeigt werden (Abb.24).

Für die Bestimmung der zellulären Eisenbeladung verwendeten schon Fleige et al.<sup>29</sup> die ICP-AES. Hierbei untersuchten sie VSOP-C125, welches ebenfalls ein

---

Citrat-Coating aufweist und eine Entwicklungsvorstufe von VSOP-C200 darstellt. Das ICP-AES wurde durch Brisset et al.<sup>15</sup> ausserdem für die Eisenbestimmung nach AMNP- und Ferumoxtran-10-Labeling verwandt. Hierbei zeigten sich Werte von 7,9pgFe/Zelle für AMNP und 0,45pgFe/Zelle für Ferumoxtran-10. VSOP-C200 führte in unseren Versuchen zu Werten zwischen 0,09 und 12,25 pgFe/Zelle. Die höhere Eisenbeladung ist ein Hinweis auf eine bessere Aufnahme von VSOP. Unsere Vorversuche<sup>45</sup> bestätigten dies mit mittleren Eisenbeladungen von 0,51±0,11 für Rh-AMNP, 0,16±0,01 für AMI-25 und 1,33±0,44pgFe/Zelle für VSOP.

Entgegen den Untersuchungen von Luvov et al.<sup>56</sup> mit dem USPIO Supravist an menschlichen Makrophagen, die mit steigender Labelstärke keine Steigerung der zellulären Eisenbeladung ergaben, zeigen unsere Ergebnisse, dass mit steigender VSOP-Labelstärke die Eisenbeladungen ansteigen (Abb. 33).

Bei der Untersuchung der Labeling-Dauer zeigten Elste et al.<sup>27</sup> eine maximale Signalintensitätsreduktion in Leber und Milz nach 4h Inkubation. Nach diesem Ergebnis richteten wir unsere Labeldauer aus. Sie beträgt ebenfalls 4h.

Auf Genebene kann nach einem Ansatz von Li et al.<sup>52</sup> von der Columbia University eine Fe-Bestimmung vorgenommen werden. Dabei werden IRP (Iron regulatory proteins) und IRE (iron-responsive elements) in einem Fluoreszenz-Assay quantifiziert. Sie eignen sich für chronische Eisenbelastungen von Zellen wie bei der Hämochromatose. Für akute Eisenbelastung, wie es in unseren Versuchen der Fall ist, stellt die ICP-MS den Goldstandard dar.

#### **4.4 MR-Relaxometrie zur Quantifizierung von T<sub>2</sub> und T<sub>2</sub>\***

Zur Betrachtung der MR-Detektionsgrenzen von VSOP führten Soenen et al.<sup>90</sup> einen Vergleich mit dextranbeschichtetem Endorem, Carboxydextranbeschichtetem Resovist und lipid-umhüllten Magnetoliposomen durch. Hier ergab sich für die Magnetoliposomen eine Detektionsgrenze von 50 Zellen/µl und 500 Zellen/µl für VSOP. Fleige et al.<sup>29</sup> zeigten, dass internalisiertes VSOP-C125 eine Detektionsgrenze von 50µmol/l im Gegensatz zu 300µmol/l bei extrazellulärem Kontrastmittel besitzt. Wir konnten eine Änderung der

Relaxationsraten bis hinab zu 0,6  $\mu\text{mol/L}$  ( $2 \cdot 10^5$  Cells/ml, 0,9pg/cell) bzw. 0,8  $\mu\text{mol/l}$  für extrazelluläres VSOP unter unseren günstigen Messbedingungen ausmachen. Unsere Vorversuche<sup>45</sup> zeigen, dass die Internalisation von AMNP und VSOP die  $T_2$ -Zeit verlängert.

Unsere Versuche zeigen außerdem, dass reiner Agar aufgrund unterschiedlicher Herstellung signifikant unterschiedliche intrinsische  $R_2$  besitzt (Kap.3.2, Abb.28, Röhrchen 16-19). Darum werden alle Messwerte gegen den jeweiligen Agar (Röhrchen 21) korrigiert ( $\Delta$ ). Dies führt aufgrund der nicht zu vermeidenden Messungenauigkeiten auch zu negativ korrigierten  $\Delta R_2$  von bis zu -0.5 [1/s] ( $2 \cdot 10^5$  Cells/ml, 0,98pg/cell) .

#### 4.4.1 Korrelation zwischen $T_2$ und der Eisenbeladung

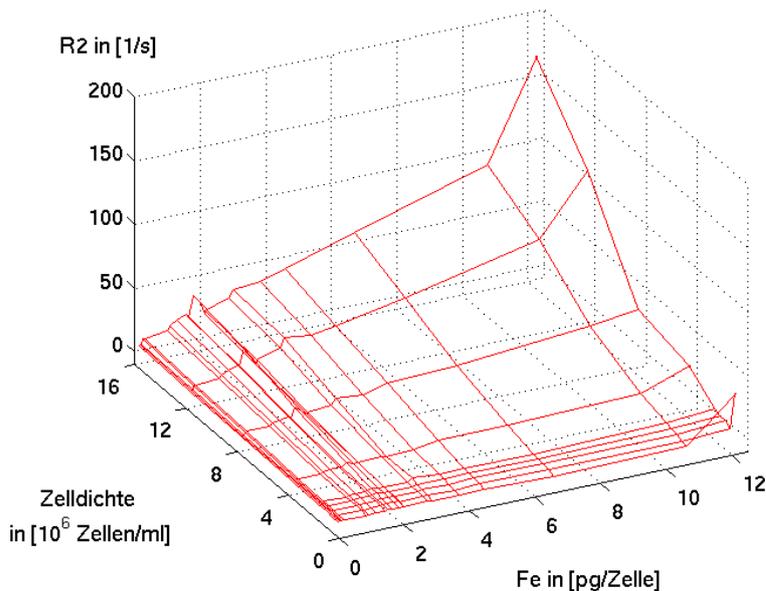


Abb.60 Fläche aus Eisenbeladung, Zelldichte und  $\Delta R_2$

Abbildung 60 zeigt einen Anstieg von  $\Delta R_2$  mit steigender Zelldichte und steigender Eisenbeladung. Den linearen Zusammenhang mit  $\Delta R_2$  zeigen auch Abbildung 39 für die Zelldichte und Abbildung 41 für die Eisenbeladung. Letzteres wurde auch durch Simon et al.<sup>88</sup> an Ferumoxtran-10 und Brisset et al.<sup>15</sup> an AMNP und Ferumoxtran-10 gezeigt. Im Gegensatz zu Simon et al.<sup>88</sup> mit Eisenkonzentrationen von 0-20  $\mu\text{gFe/ml}$  decken unsere Versuche mit 0 - 196  $\mu\text{gFe/ml}$  (0-3,5 mM) jedoch einen größeren Bereich ab.

Einhergehend mit den Ergebnissen von Simon et al.<sup>88</sup>, Brisset et al.<sup>15</sup>, Bilotey et al.<sup>7</sup> und Bulte et al.<sup>19</sup>, beobachten wir eine Abnahme der  $r_2$ -Relaxivität mit Internalisation der USPIOs (siehe Kap.3.4.1). Im Vergleich mit einer Verkürzung der  $r_2$ -Relaxivität um den Faktor 1,4 bei Bilotey, ergeben unsere Versuche eine Verkürzung um den Faktor 2,02. Bilotey zeigte durch Ausfällungsversuche in Wasser mit Erhöhung der Na-Ionenstärke, dass hier die Clusterbildung von Nanopartikeln zu einer Abnahme der  $r_2$ -Relaxivität führt. Wie von Simon et al.<sup>88</sup> und Kuhlpeteter et al.<sup>48, 45</sup> vorgeschlagen, könnten diese Internalisations- und Cluster-Effekte auf  $r_2$  auf einer Veränderung des Einflusses der Wasser-Diffusion und der inhomogenen Verteilung der Eisenoxidnanopartikel, wie von Tanimoto et al.<sup>99</sup> untersucht, beruhen.

#### 4.4.2 Korrelation zwischen $T_2^*$ und der Eisenbeladung

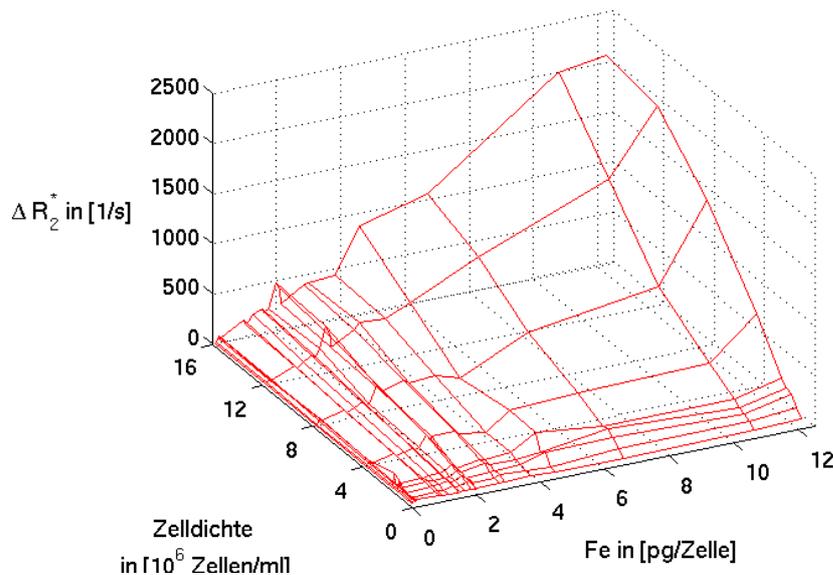


Abb.61 Fläche aus Eisenbeladung, Zelldichte und  $\Delta R_2^*$

Analog zu den den  $\Delta R_2$ -Werten zeigt die  $\Delta R_2^*$ -Fläche einen Anstieg gegen hohe Eisenbeladungen und Zelldichten hin. Dies unterstreicht die Ergebnisse von Kuhlpeteter et al.<sup>48</sup> bei 3 Tesla, welche an SPIO-gelabelten Lungenkarzinomzellen einen linearen Zusammenhang zwischen  $R_2^*$  und der Eisenbeladung und zwischen  $R_2^*$  und der Zelldichte fanden. Kuhlpeteter et al.

---

untersuchten hierbei jedoch lediglich 4 Eisenkonzentrationen und Zelldichten von 0 –  $3 \cdot 10^5$  Cells/ml.

Bowen et al.<sup>12</sup> konnten zeigen, dass die  $R_2^*$ -Messung im Vergleich zur  $R_2$ -Messung eine 70fache und im Vergleich zur  $R_1$ -Messung eine 3100fache Sensitivität besitzt. Dass die  $R_2^*$ -Messung für kleine Zelldichten eine höhere Sensitivität als die  $R_2$ -Messung besitzt, konnte auch Kuhlpetter et al.<sup>48</sup> zeigen. Wir können dies in Kapitel 3.5 mit Abbildung 59 belegen.

Für die Differenzierung „internalisiertes Kontrastmittel“ vs. „freies Kontrastmittel“ benutzten Bowen et al.<sup>12</sup> und Kuhlpetter et al.<sup>48</sup> den Parameter  $R' = R_2^* - R_2$ . Sie hatten gezeigt, dass sich  $R_2^*$  und  $R_2$  bei freiem Kontrastmittel gleichen, während internalisiertes Kontrastmittel unterschiedliche  $R_2^*$  und  $R_2$  aufweist. Für folgende in-vivo-Experimente am Tiermodell wird dies ein wichtiger nicht zu vernachlässigender Faktor sein.

Wir konnten anhand der Formel (2) näherungsweise die Zelldichten bestimmen. Die Makrophagen-Zelldichte vor Ort kann im Verlauf als Indiz für den Entzündungszustand vor Ort genommen werden, beispielweise als Marker für die Entstehung arteriosklerotischer Plaques oder die Vulnerabilität atherosklerotischer Plaques<sup>49</sup>.

## 4.5 Eisennachweis über Histologie ( Färbungen )

Unsere Ergebnisse zeigen, dass eine intrazelluläre vesikuläre VSOP-Aufnahme bei bestehender Zellintegrität nach dem Labeln mittels Transmissions-elektronenmikroskopie darstellbar ist (Abb.54). Schon Saini et al. benutzten das TEM, um Eisenkontrastmittel in Kupffer-Zellen nachzuweisen<sup>80</sup>. Die endosomale und temperaturabhängige Aufnahme von AMNPs in murine RAW 264.7-Makrophagen und HeLa-Zellen wurde durch Wilhelm et al. im TEM nachgewiesen<sup>110</sup>. Auch Fleige et al.<sup>28</sup> zeigten eine perinukleäre vakuoläre Lokalisation des Kontrastmittels in Ratten-Mikroglia. Alternativ konnten Stroh et al.<sup>96</sup> eine endosomale Aufnahme von VSOP durch konfokale Laser-Scanning-

---

Mikroskopie und fluoreszierenden Rhodamin-VSOP und ANEPPS-Membran-Markern an embryonalen Stammzellen nachweisen.

In unseren TEM-Aufnahmen sind qualitativ eine der Labelstärke entsprechende Beladung der Zellen sichtbar. Selbst bei niedriger Labelstärke von nur  $0,31 \pm 0,2 \text{ pg/cell}$  (Abb.54) zeigt die TEM eine vesikuläre Aufnahme, bei der die Preußisch-Blau- und DAB/Ag-Au-Färbungen nicht einmal 25% eisen-positive Zellen zeigen (Tab.8).

Für die Preußisch-Blau-Färbung zeigten Rausch et al.<sup>72</sup> und Bierry et al.<sup>5</sup>, dass damit eisenbeladene Hasen- und Ratten-Makrophagen dargestellt werden können. Unsere Arbeit weitet diese Aussage auf peritoneale Mausmakrophagen aus. Bierry et al.<sup>5</sup> zeigte, dass diese Färbung Kontrastmittel sowohl in Makrophagen entzündeter als auch nicht-entzündeter Foci nachweist. Die PMJ2-R-Makrophagen unterlagen keiner Stimulation, könnten damit als Modell ohne Entzündungsaktivität dienen.

Eine Korrelation zwischen MRI und Histochemie zeigte de Vries et al.<sup>107</sup> auf. Wir zeigten, dass die Preußisch-Blau-Färbung - wie schon durch Schroeter et al.<sup>85</sup> angeführt - gewissen Einschränkungen bezüglich der Sensitivität im unteren Eisenbeladungsbereich unterliegt. Erst das Enhancement mit DAB und Ag-Au zeigte bei Schroeter et al.<sup>85</sup> einen besseren mikroskopischen Nachweis. Wir bestätigten seine Aussage und konnten durch die Durchführung von Zytospins empirische Regressionsgeraden erstellen, die einen Zusammenhang zwischen der Eisenbeladung und der Viabilität in den jeweiligen Färbungen herstellen (Abb.56-58). Wir schlussfolgern daraus, dass die Preußisch-Blau-Färbung ohne Enhancement bei niedrigen Beladungen zu falsch negativen Ergebnissen führen kann. Es ist daher sinnvoll, immer die DAB- und Ag-Au-Verstärkung anzuwenden (siehe Tabelle 8).

Der Vergleich mit unseren MRT-Messungen wies  $\Delta R_2$  und  $\Delta R_2^*$ -Werte bis in den unteren Eisenbeladungsbereich nach. Der lineare Zusammenhang zwischen Relaxationsraten und Eisenbeladung (Abb.59) macht den histologischen Eisennachweis somit für quantitative Betrachtungen entbehrlich.

---

Bei Fragen nach der Makrophagen-Lokalisation ist und bleibt die Histochemie Standardmethode. Hierbei sind für den Nachweis der Zellen in kommenden in-vivo-Studien noch die Markierung über die Makrophagenspezifischen Marker Mac-1 und Mac-2 denkbar, welche auf den PMJ2-R nachweisbar sind. Schroeter et al.<sup>85</sup> benutzten hierfür den Ratten-Makrophagen-spezifischen ED1-Antikörper. Für humane Makrophagen führte Bonnemain von der Guerbet-Gruppe Mac-3 als Marker an<sup>10</sup>. Neben Eisenkontrastmittel können auch spezifische Substanzen wie der VCAM-1-Ligand VINP-28 zur Makrophagen-Darstellung verwendet werden. VCAM-1 wird früh in subklinischen Gefäßwandpathologien exprimiert. Es findet sich auf aktivierten Makrophagen und Endothelzellen<sup>64</sup>.

Für die Bestimmung der Eisenbeladung könnten Makrophagen aus dem Blut extrahiert werden<sup>56</sup>. Für die Isolierung von humanen Makrophagen zeigten Steinbach et al.<sup>94</sup>, dass dies nach der Methode von Böyum (1968) mit Dichtegradienten-Zentrifugation möglich ist oder dass, wie auch bei Engberink et al. beschrieben<sup>66</sup>, Monozyten über ein CD14-FACS-Gate extrahiert werden können.

---

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Wir konnten zeigen, dass murine Peritonealmakrophagen PMJ2-R ein stabiles Modellsystem für das reproduzierbare Labeling mit VSOP darstellen. TEM zeigten die lysosomale Aufnahme. Es gelang uns, die Sensitivität der ICP-MS zu belegen und einen linearen Zusammenhang zwischen zellulärer Eisenbeladung und Labelstärke nachzuweisen. Wir stellten genau definierte homogene Zell-Agar-Phantome her, an denen wir lineare Zusammenhänge zwischen den  $T_2$ - und  $T_2^*$ -Werten der Phantome, ihrer Zelldichte und Eisenbeladung bzw. Gesamteisenmenge aufzeigten. Der Vergleich mit VSOP in Lösung zeigte die Abnahme der  $r_2$ -Relaxivität mit der Internalisation. Beim Vergleich der MR-Messung mit der Preußisch-Blau-Färbung und ihren Enhancements wiesen wir eine größere Sensitivität der MRT für geringe Labelstärken und speziell von  $R_2^*$  für geringe Zelldichten nach.

Der nächste logische Schritt ist die in-vivo-Anwendung am Tiermodell, um die Anfälligkeit unserer in-vitro-Messungen für Artefakte unter suboptimalen Bedingungen, wie sie unter physiologischen Schwankungen herrschen, untersuchen zu können. Dabei ist das Labeling nicht gezielt steuerbar. Studien unserer Arbeitsgruppe<sup>44</sup> und von Corot et al.<sup>24</sup> haben gezeigt, dass das Kontrastmittel nicht zwangsläufig über den Weg der monozytären Phagozytose, anschließender Transmigration in Plaques und Differenzierung in Makrophagen erfolgen muss, sondern das Kontrastmittel nach intimal diffundieren und ortsständig phagozytiert werden kann. Eine gezielte Anwendung des Kontrastmittels an einem Ort in einer Zellart wird daher schwierig. Schwierigkeiten von Tiermodellen im MRT sind außerdem Bewegungsartefakte durch Herzschlag, Blutstrom oder Atmung<sup>48</sup>. Kleine Beladungen erfordern darüberhinaus ein möglichst homogenes Magnetfeld - es ist ein guter Shim notwendig, was durch inhomogene anatomische Struktur und unterschiedliche Eisenverteilungen im Körper erschwert wird. Ist die in-vivo-Anwendung im Tiermodell erfolgreich und erweisen sich die Messmethoden als robust und

stabil replizierbar, so könnte das ganze auf den Menschen übertragen werden, um Entzündungsprozesse orten zu können.

Die Darstellung und Quantifizierung der Makrophagen als essentielle Plauekomponente könnte einen Rückschluss auf die Entzündungsaktivität und in Zukunft eine verlässliche Darstellung des Ausmaßes und der Progression von arteriosklerotischen Plaques erlauben. Aufgrund der bereits zu Beginn erwähnten klinischen Relevanz der Arteriosklerose ist die Weiterentwicklung der bildgebenden Diagnostik als Voraussetzung für Therapie essentiell. Eine Ausweitung auf andere makrophagen-assoziierte Entzündungsprozesse im Körper wie auf die Multiple Sklerose, Granulomatöse Erkrankungen oder lokale Entzündungsherde wäre denkbar.

Das langfristige Ziel ist und bleibt die gesamte Darstellung des Entzündungsstatus eines Patienten mithilfe eines einzelnen Ganzkörper-MRTs.

## 6. Literaturverzeichnis

### 6.1 Materialübersicht

Verwendete Materialien	Hersteller
15ml Tubes	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany
50ml Tubes	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany
Agar Typ Ib (Art.Nr.A0576)	Sigma-Aldrich Inc., St.Louis, MO, USA
Axioskop	Zeiss, Jena, Germany
Axio-Vision	Zeiss, Jena, Germany
Preußisch-Blau-Färbung	Perl's Prussian Blue Staining, Colbourne Lab
Bruker Biospec 7 T, 300 MHz	Bruker Biospin GmbH, Ettlingen, Germany
Cacodynatpuffer	
DAB substrate kit for peroxidase	Art.SK-4100, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
digitale Analysenwaage	Kern GmbH, Balingen, Germany
DMEM-HG mit 4,5g/l Glucose + 2 mM	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria
Entellan	Art.107960, Merck, Darmstadt, Germany
entmineralisiertes Wasser	Millipore Inc., Billerica, MA, USA
Eosin	Waldeck Chroma, Münster, Germany
Ethanol 50%, 75%, 95%	AppliChem, Darmstadt, Germany
FCS (fetal calf serum) 5%	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria
Ficoll	Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden
Glutaraldehyd	
Hämalaun	Waldeck Chroma, Münster, Germany
HEPES 5mM	Sigma-Aldrich Inc., St.Louis, MO, USA
Heraeus Megafuge 1.0	Heraeus Instruments, Hanau, Germany
Hydrogel (Collagen Typ I)	Arthro Kinetics AG, Esslingen, Germany
Isopropanol	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Germany
Kalium-Ferrocyanid 2%	Sigma-Aldrich Inc., St.Louis, MO, USA
Kernechtrot 1%	Merck, Darmstadt, Germany

Kulturflasche 175 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany
Kulturflasche 25 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany
Kulturflasche 75 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany
L-Glutamin 2 mM	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria
Matlab 2008	The MathWorks Inc., Natick, MA, USA
Methenamin Versilberungskit nach Gomori	Art.1.00820., Merck, Darmstadt, Germany
NaCl - Lösung 0,9%	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany
NaOH 2%	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Germany
NMR-Tube-Caps	Wilmad, New jersey, 002 Harding Hwy., 688 Buena, New Jersey,
NMR-Tubes 5mm Durchmesser	Wilmad, New jersey, 002 Harding Hwy., 688 Buena, New Jersey,
Paraffin	Merck, Darmstadt, Germany
Paraformaldehyd (PFA) 4 Vol. %	Merck, Darmstadt, Germany
Paravision 4	Bruker Biospin GmbH, Ettlingen, Germany
PBS	phosphate buffered saline
Phantomhalter aus Teflon	Wissenschaftl.Werkstatt, Physik, Uni Würzburg
Phasen-Kontrast-Mikroskop	Hund, Wetzlar, Germany
Pipetten 5 / 100 / 1000 / 5000 µl	Eppendorf, Hamburg, Germany
Pipettus accu-jet®	BrandTechScientific Inc., Essex, CT, USA
PMJ2-R [CRL 2458]	peritoneale Mausemakrophagen
Rotihistol	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Germany
Salpetersäure HNO <sub>3</sub> 66% reinst	Merck, Darmstadt, Germany
Salzsäure 2%	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Germany
Schlitten-Mikrotom	Leitz, Wetzlar, Germany
SPSS Version 15.0	SPSS Inc., Chicago, Illinois
Sterile Werkbank	Heraeus Instruments, Hanau, Germany
SUPERFROST Objektträger silanisiert	Menzel GmbH, Braunschweig, Germany
Trypanblau	Sigma-Aldrich Inc., St.Louis, MO, USA
Varian ICP-MS	Varian Inc., Palo Alto, CA, USA
VSOP C 200 vitro	Ferropharm, Teltow, Germany
Wasserbad	GFL 1083
Xylol	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Germany
Zellschaber kurz	Biochrom AG, Berlin, Germany
Zellschaber lang	Biochrom AG, Berlin, Germany

Tab.9 Verwendete Materialien

## 6.2 Beispielprotokoll

Protokoll für Montag, 01.09.08 für K6Lu/Ep5 (Labelkonz.: 13,375 µl VSOP/10 <sup>8</sup> /30ml)				J.Bremicker	
Röhrcheninhalt	Volumenverteilung	Zellzahl			Dichte pro ml
1	5‰ Agar	in 3ml PBS → Pallett+0,4ml Agar	8*10 <sup>6</sup>	gelabeled	1,6*10 <sup>7</sup>
2	5‰ Agar	in 3ml PBS → Pallett+0,4ml Agar	8*10 <sup>6</sup>	gelabeled	1,6*10 <sup>7</sup>
3	5‰ Agar	in 3ml PBS → Pallett+0,4ml Agar	6*10 <sup>6</sup>	gelabeled	1,2*10 <sup>7</sup>
4	5‰ Agar	in 3ml PBS → Pallett+0,4ml Agar	6*10 <sup>6</sup>	gelabeled	1,2*10 <sup>7</sup>
5	5‰ Agar	in 3ml PBS → Pallett+0,4ml Agar	4*10 <sup>6</sup>	gelabeled	8*10 <sup>6</sup>
6	5‰ Agar	in 3ml PBS → Pallett+0,4ml Agar	4*10 <sup>6</sup>	gelabeled	8*10 <sup>6</sup>
7	5‰ Agar	in 3ml PBS → Pallett+0,4ml Agar	2*10 <sup>6</sup>	gelabeled	4*10 <sup>6</sup>
8	5‰ Agar	in 3ml PBS → Pallett+0,4ml Agar	2*10 <sup>6</sup>	gelabeled	4*10 <sup>6</sup>
9	5‰ Agar	in 3ml PBS → Pallett+0,4ml Agar	1*10 <sup>6</sup>	gelabeled	2*10 <sup>6</sup>
10	5‰ Agar	in 3ml PBS → Pallett+0,4ml Agar	1*10 <sup>6</sup>	gelabeled	2*10 <sup>6</sup>
11	5‰ Agar	in 3ml PBS → Pallett+0,4ml Agar	8*10 <sup>5</sup>	gelabeled	1,6*10 <sup>6</sup>
12	5‰ Agar	in 3ml PBS → Pallett+0,4ml Agar	8*10 <sup>5</sup>	gelabeled	1,6*10 <sup>6</sup>
13	5‰ Agar	in 3ml PBS → Pallett+0,4ml Agar	6*10 <sup>5</sup>	gelabeled	1,2*10 <sup>6</sup>
14	5‰ Agar	in 3ml PBS → Pallett+0,4ml Agar	6*10 <sup>5</sup>	gelabeled	1,2*10 <sup>6</sup>
15	5‰ Agar	in 3ml PBS → Pallett+0,4ml Agar	4*10 <sup>5</sup>	gelabeled	8*10 <sup>5</sup>
16	5‰ Agar	in 3ml PBS → Pallett+0,4ml Agar	4*10 <sup>5</sup>	gelabeled	8*10 <sup>5</sup>
17	5‰ Agar	in 3ml PBS → Pallett+0,4ml Agar	2*10 <sup>5</sup>	gelabeled	4*10 <sup>5</sup>
18	5‰ Agar	in 3ml PBS → Pallett+0,4ml Agar	2*10 <sup>5</sup>	gelabeled	4*10 <sup>5</sup>
19	5‰ Agar	in 3ml PBS → Pallett+0,4ml Agar	1*10 <sup>6</sup>	ungelabeled	2*10 <sup>6</sup>
20	5‰ Agar	in 3ml PBS → Pallett+0,4ml Agar	1*10 <sup>6</sup>	ungelabeled	2*10 <sup>6</sup>
21	5‰ Agar	0,5ml Agar		Leerprobe	
ICPms		in 1ml PBS	1*10 <sup>6</sup>	gelabeled	2*10 <sup>6</sup>

>>benötigte Zellzahl:

4,7\*10<sup>7</sup> Zellen gelabeled → zur Sicherheit 10\*10<sup>7</sup>=1\*10<sup>8</sup>

8\*10<sup>6</sup> Zellen ungelabeled → zur Sicherheit 5\*10<sup>7</sup>

5,5\*10<sup>7</sup> Zellen insgesamt → zur Sicherheit 1,5\*10<sup>8</sup>

	Count4	* Kammern-faktor	* 1/Verdünnung	* V <sub>gesamt</sub> in ml	-	Zellzahl
Zellzahl A		* 10 <sup>4</sup>	*	*		
Zellzahl NL		* 10 <sup>4</sup>	*	*		

Zellzahl A		Volumen A	
Zellzahl G	10 <sup>8</sup>	Volumen VA	auffüllen auf 30ml
Probe 19/20 ungelabeled	1*10 <sup>6</sup>	Volumen 19/20	0,01 * Volumen VA =

Labeling mit Auffüllen auf 30ml	10 <sup>8</sup> in 30 ml mit 13,375µl VSOP (über 4h)
Zellzahl N nach Labeling	
N/10 <sup>8</sup>	
Volumen VN = N/10 <sup>8</sup> * Volumen N	

Beginn Labeling: Ende Labeling: Beginn Messung:	30ml	10 <sup>8</sup>	ALLES MIT PBS		
	3ml	10 <sup>7</sup>	+27ml PBS	30ml	10 <sup>7</sup>
				3ml	10 <sup>6</sup>



---

CT	Computer-Tomographie
DAB	Diaminobenzidin
DMEM HG	Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose
DMSO	Dimethylsulfoxid
ETL	Echo Train Length
FA	Flip Angle
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FID	Free Induction Decay
FLASH	Fast Low Angle Shot
flask	Kulturflasche
FOV	Field-of-View
GRE	Gradienten-Echo-Sequenz
HEPES	Hydroxyethyl-Piperaziny-Ethansulfonsäure
HF-Puls	Hochfrequenz-Puls
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
KM	Kontrastmittel
MGE	Multi-Gradienten-Echo-Sequenz
MHC	Major Histocompatibility Complex
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie (synonym "NMR-Bildgebung")
MSME	Multi-Spin-Multi-Echo-Sequenz
NMR	Nuclear-Magnetic-Resonance
NSA	Number of Signal Averages
PACS	Picture Archiving and Communication System
PB	Preußisch Blau, Prussian Blue, Preußisch Blau
PBS	Phosphate-Buffered Saline
RF	Radiofrequency
ROI	Region of Interest
SI	Signalintensität
SNR	Signal-to-Noise-Ratio, Signal-zu-Rausch-Verhältnis
SPIO	Superparamagnetic Iron Oxide Particles
t	Zeit
T	Tesla
TE	Time of Echo
TEM	Transmissions-Elektronen-Mikroskopie
TI	Time of Inversion
TR	Time of Repetition
USPIO	Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Particles
VCAM	Vascular cell adhesion protein
VSOP	Very Small Superparamagnetic Iron Oxide Particles

---

## 6.4 Literaturverzeichnis

1. Adami, C, Brunda, M; Palleroni, A. V. In vivo immortalization of murine peritoneal macrophages: a new rapid and efficient method for obtaining macrophage cell lines. *Journal of Leukocyte Biology*. 1993;53:475–478.
2. Arbab, A, Bashaw, L; Miller, B. R.; Jordan, E. K.; Lewis, B. K.; Kalish, H.; Frank, J. A. Characterization of biophysical and metabolic properties of cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and transfection agent for cellular MR imaging. *Radiology*. 2003;229:838–846.
3. Basse-Lüsebrink, T. *Einsatz der MR-Bildgebung zur Darstellung 19F-markierter Zellen in-vitro*. Diploma: Würzburg, 2007.
4. Bee, A, Massart, B; Neveu, S. Synthesis of very fine maghemite particles. *J Magnetism and Magnetic Materials*. 1995:6–9.
5. Bierry, G, Jehl, F; Boehm, N.; Robert, P.; Prevost, G.; Dietemann, J. L.; Desal, H.; Kremer, S. Macrophage activity in infected areas of an experimental vertebral osteomyelitis model: USPIO-enhanced MR imaging feasibility study. *Radiology*. 2008;248:114–123.
6. Billotey, C, Aspod, C; Beuf, O.; Piaggio, E.; Gazeau, F.; Janier, M. F.; Thivolet, C. T-cell homing to the pancreas in autoimmune mouse models of diabetes: in vivo MR imaging. *Radiology*. 2005;236:579–587.
7. Billotey, C, Wilhelm, C; Devaud, M.; Bacri, J. C.; Bittoun, J.; Gazeau, F. Cell internalization of anionic maghemite nanoparticles: quantitative effect on magnetic resonance imaging. *Magn Reson Med*. 2003;49:646–654.
8. Blasi, E, Radzioch, D; Merletti, L.; Varesio, L. Generation of macrophage cell line from fresh bone marrow cells with a myc/raf recombinant retrovirus. *Cancer Biochem Biophys*. 1989;10:303–317.
9. Bloch, F. The Principle of Nuclear Induction. *Science*. 1953;118:425–430.
10. Bonnemain, B. [Nanoparticles: the industrial viewpoint. Applications in diagnostic imaging]. *Annales Pharmaceutiques Francaises*. 2008;66:263–267.
11. Boor, R, Goebel, B; Doepp, M.; Taylor, M. J. Somatosensory evoked potentials after posterior tibial nerve stimulation--normative data in children. *Eur J Paediatr Neurol*. 1998;2:145–152.
12. Bowen, C, Zhang, X; Saab, G.; Gareau, P. J.; Rutt, B. K. Application of the static dephasing regime theory to superparamagnetic iron-oxide loaded cells. *Magn Reson Med*. 2002;48:52–61.
13. Braun, K, Dunsch, L; Pipkorn, R.; Bock, M.; Baeuerle, T.; Yang, S.; Waldeck, W.; Wiessler, M. Gain of a 500-fold sensitivity on an intravital MR contrast agent based on an endohedral gadolinium-cluster-fullerene-conjugate: a new chance in cancer diagnostics. *Int J Med Sci*. 2010;7:136–146.
14. Braun, J, Renz-Polster, H. *Basislehrbuch Innere Medizin*. 2., korrigierte Aufl.: Urban & Fischer: München, 2001.
15. Brisset, J, Desestret, V; Marcellino, S.; Devillard, E.; Chauveau, F.; Lagarde, F.; Nataf, S.; Nighoghossian, N.; Berthezene, Y.; Wiart, M. Quantitative effects of cell internalization of two types of ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles at 4.7 T and 7 T. *Eur Radiol*. 2010;20:275–285.
16. Bühling, Lepenies; Witt. *Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pathologie*: Urban & Fischer Verlag Jena, 2000.
17. Bulte, J, Jonge, M de; Kamman, R. L.; Zuiderveen, F.; The, T. H.; Leij, L. de; Go, K. G. Magnetite as a potent contrast-enhancing agent in magnetic resonance imaging to visualize blood-brain barrier disruption. *Acta Neurochir Suppl (Wien)*. 1993;57:30–34.

- 
18. Bulte, J, Kraitchman, D. Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. *NMR Biomed.* 2004;17:484–499.
  19. Bulte, J, Zhang, S; van Gelderen, P.; Herynek, V.; Jordan, E. K.; Duncan, I. D.; Frank, J. A. Neurotransplantation of magnetically labeled oligodendrocyte progenitors: magnetic resonance tracking of cell migration and myelination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:15256–15261.
  20. Carrel, A. On the Permanent Life of Tissues Outside of the Organism. *J Exp Med.* 1912;15:516–528.
  21. Chajra, H, Rousseau, C; Cortial, D.; Ronzière, M. C.; Herbage, D.; Mallein-Gerin, F.; Freyria, A. M. Collagen-based biomaterials and cartilage engineering. Application to osteochondral defects. *Biomed Mater Eng.* 2008;18:S33-45.
  22. Chen, W, Tabata, Y; Tong, Yen Wah. Fabricating tissue engineering scaffolds for simultaneous cell growth and drug delivery. *Curr. Pharm. Des.* 2010;16:2388–2394.
  23. Corot, C, Port, M; Guilbert, I.; Robert, P.; Raynal, I.; Robic, C.; Raynaud, J. S.; Prigent, P.; Dencausse, A.; Idee, J. M. Superparamagnetic Contrast Agents. *Mol Cell MR Imag*:59–83.
  24. Corot, C, Robert, P; Idee, J. M.; Port, M. Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006;58:1471–1504.
  25. Craig, E, Frajola, W; Greider, M. H. An embedding technique for electron microscopy using EPON 812. *J Cell Biol.* 1962;12:190–194.
  26. Dans, A, Tan, F; Villarruz, E. Chelation therapy for atherosclerotic cardiovascular disease (Review). *Cochrane Database Syst Rev.* 2008:1–33.
  27. Elste, V, Wagner, S; Taupitz, M.; Pfefferer, D.; Kresse, M.; Hamm, B.; Berg, R.; Wolf, K. J.; Semmler, W. Magnetic resonance lymphography in rats: effects of muscular activity and hyperthermia on the lymph node uptake of intravenously injected superparamagnetic iron oxide particles. *Acad Radiol.* 1996;3:660–666.
  28. Fleige, G, Nolte, C; Synowitz, M.; Seeberger, F.; Kettenmann, H.; Zimmer, C. Magnetic labeling of activated microglia in experimental gliomas. *Neoplasia.* 2001;3:489–499.
  29. Fleige, G, Seeberger, F; Laux, D.; Kresse, M.; Taupitz, M.; Pilgrimm, H.; Zimmer, C. In vitro characterization of two different ultrasmall iron oxide particles for magnetic resonance cell tracking. *Invest Radiol.* 2002;37:482–488.
  30. Frank, J, Anderson, S; Kalsih, H.; Jordan, E. K.; Lewis, B. K.; Yocum, G. T.; Arbab, A. S. Methods for magnetically labeling stem and other cells for detection by in vivo magnetic resonance imaging. *Cytotherapy.* 2004;6:621–625.
  31. Gadner, H, Gaedicke, G; Niemeyer, C.; Ritter, J. *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*, 2006.
  32. Geckil, H, Xu, F; Zhang, Xiaohui; Moon, SangJun; Demirci, Utkan. Engineering hydrogels as extracellular matrix mimics. *Nanomedicine (Lond).* 2010;5:469–484.
  33. Glauert, A, Glauert, R. Araldite as an embedding medium for electron microscopy. *J Biophys Biochem Cytol.* 1958;4:191–194.
  34. Grundmann, E. *Einführung in die allgemeine Pathologie*: Gustav-Fischer-Verlag Stuttgart, 1996.
  35. Herbort, C, Vogt, F; Lauenstein, T. C.; Dirsch, O.; Corot, C.; Robert, P.; Ruehm, S. G. Magnetic resonance imaging of experimental atherosclerotic plaque: comparison of two ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide. *J Magn Reson Imaging.* 2006;24:388–393.
  36. Herold, G. *Innere Medizin - Eine vorlesungsorientierte Darstellung*, 2007.
  37. Heymer, A, Haddad, D; Weber, M.; Gbureck, U.; Jakob, P. M.; Eulert, J.; Noth, U. Iron oxide labelling of human mesenchymal stem cells in collagen hydrogels for articular cartilage repair. *Biomaterials.* 2008;29:1473–1483.

- 
38. Hirsch, A, Haskal, Z. ACC/AHA 2005 Practice Guidelines for the Management of Patients with Peripheral Arterial Disease (Lower Extremity, Renal, Mesenteric and Abdominal Aortic). *Circulation*. 2006.
  39. Hofman, J, Branderhorst, W; Eikelder, H. M. ten; Cappendijk, V. C.; Heeneman, S.; Kooi, M. E.; Hilbers, P. A.; ter Haar Romeny, B. M. Quantification of atherosclerotic plaque components using in vivo MRI and supervised classifiers. *Magn Reson Med*. 2006;55:790–799.
  40. Hundley, W, Bluemke, D; Finn, J. P.; Flamm, S. D.; Fogel, M. A.; Friedrich, M. G.; Ho, V. B.; Jerosch-Herold, M.; Kramer, C. M.; Manning, W. J.; Patel, M.; Pohost, G. M.; Stillman, A. E.; White, R. D.; Woodard, P. K. ACCF/ACR/AHA/NASCI/SCMR 2010 expert consensus document on cardiovascular magnetic resonance: a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents. *Circulation*. 2010;121:2462–2508.
  41. Hunt, N, Grover, L. Cell encapsulation using biopolymer gels for regenerative medicine. *Biotechnol. Lett*. 2010;32:733–742.
  42. Junkermann, H. [Indications and contraindications for contrast-enhanced MRI and CT during pregnancy]. *Radiologe*. 2007;47:774–777.
  43. Klinker, Pape; Silbernagl. *Physiologie*: Thieme Verlag Stuttgart, 2005.
  44. Klug, G, Bauer, L; Bauer, W. R. Patterns of USPIO deposition in murine atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2008;28:E157; author reply E158-9.
  45. Klug, G, Kampf, T; Bloemer, S.; Bremicker, J.; Ziener, C. H.; Heymer, A.; Gbureck, U.; Rommel, E.; Noth, U.; Schenk, W. A.; Jakob, P. M.; Bauer, W. R. Intracellular and extracellular T(1) and T(2) relaxivities of magneto-optical nanoparticles at experimental high fields. *Magn Reson Med*. 2010.
  46. Korosoglou, G, Weiss, R; Kedziorek, D. A.; Walczak, P.; Gilson, W. D.; Schar, M.; Sosnovik, D. E.; Kraitchman, D. L.; Boston, R. C.; Bulte, J. W.; Weissleder, R.; Stuber, M. Noninvasive detection of macrophage-rich atherosclerotic plaque in hyperlipidemic rabbits using "positive contrast" magnetic resonance imaging. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52:483–491.
  47. Kraitchman, D, Bulte, J. Imaging of stem cells using MRI. *Basic Res Cardiol*. 2008;103:105–113.
  48. Kuhlpeiter, R, Dahnke, H; Matuszewski, L.; Persigehl, T.; Wallbrunn, A. von; Allkemper, T.; Heindel, W. L.; Schaeffter, T.; Bremer, C. R2 and R2\* mapping for sensing cell-bound superparamagnetic nanoparticles: in vitro and murine in vivo testing. *Radiology*. 2007;245:449–457.
  49. Lancelot, E, Amirbekian, V; Brigger, I.; Raynaud, J. S.; Ballet, S.; David, C.; Rousseaux, O.; Le Greneur, S.; Port, M.; Lijnen, H. R.; Bruneval, P.; Michel, J. B.; Ouimet, T.; Roques, B.; Amirbekian, S.; Hyafil, F.; Vucic, E.; Aguinaldo, J. G.; Corot, C.; Fayad, Z. A. Evaluation of matrix metalloproteinases in atherosclerosis using a novel noninvasive imaging approach. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2008;28:425–432.
  50. Lauterbur, P. Nobel Lecture. All science is interdisciplinary--from magnetic moments to molecules to men. *Biosci Rep*. 2004;24:165–178.
  51. Lewin, M, Carlesso, N; Tung, C. H.; Tang, X. W.; Cory, D.; Scadden, D. T.; Weissleder, R. Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. *Nat Biotechnol*. 2000;18:410–414.
  52. Li, J, Ram, G; Gast, Katherine; Chen, Xia; Barasch, Kimberly; Mori, Kiyoshi; Schmidt-Ott, Kai; Wang, Jianjun; Kuo, Hung-Chieh; Savage-Dunn, Cathy; Garrick, Michael D.; Barasch, Jonathan. Detection of intracellular iron by its regulatory effect. *Am. J. Physiol., Cell Physiol*. 2004;287:C1547-59.

- 
53. Lucas, A, Greaves, D. Atherosclerosis: role of chemokines and macrophages. *Expert Rev Mol Med.* 2001;3:1–18.
  54. Lüllmann, Mohr; Hein. *Pharmakologie und Toxikologie*: Thieme Verlag Stuttgart, 2006.
  55. Lüllmann-Rauch, R. *Histologie*. Verstehen - Lernen - Nachschlagen: Thieme Verlag, 2003.
  56. Lunov, O, Syrovets, T; Buchele, B.; Jiang, X.; Rocker, C.; Tron, K.; Nienhaus, G. U.; Walther, P.; Mailander, V.; Landfester, K.; Simmet, T. The effect of carboxydextran-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles on c-Jun N-terminal kinase-mediated apoptosis in human macrophages. *Biomaterials.* 2010;31:5063–5071.
  57. Maxwell, A, Wang, T; Yuan, Lingqian; Duryea, Alexander P.; Xu, Zhen; Cain, Charles A. A tissue phantom for visualization and measurement of ultrasound-induced cavitation damage. *Ultrasound Med Biol.* 2010;36:2132–2143.
  58. McAteer, M, Akhtar, A; Zur Muhlen, C. von; Choudhury, R. P. An approach to molecular imaging of atherosclerosis, thrombosis, and vascular inflammation using microparticles of iron oxide. *Atherosclerosis.* 2010;209:18–27.
  59. McLachlan, S, Morris, M; Lucas, M. A.; Fisco, R. A.; Eakins, M. N.; Fowler, D. R.; Scheetz, R. B.; Olukotun, A. Y. Phase I clinical evaluation of a new iron oxide MR contrast agent. *J Magn Reson Imaging.* 1994;4:301–307.
  60. Mills, P, Ahrens, E. Enhanced Positive-Contrast Visualization of Paramagnetic Contrast Agents Using Phase Images. *Magn Reson Med.* 2009;62:1349–1355.
  61. Moore, A, Weissleder, R; Bogdanov, A., JR. Uptake of dextran-coated monocrystalline iron oxides in tumor cells and macrophages. *Journal of Magnetic Resonance Imaging.* 1997;7:1140–1145.
  62. Morris, J, Olzinski, A; Bernard, R. E.; Aravindhan, K.; Mirabile, R. C.; Boyce, R.; Willette, R. N.; Jucker, B. M. p38 MAPK inhibition reduces aortic ultrasmall superparamagnetic iron oxide uptake in a mouse model of atherosclerosis: MRI assessment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:265–271.
  63. Muller, K, Skepper, J; Tang, T. Y.; Graves, M. J.; Patterson, A. J.; Corot, C.; Lancelot, E.; Thompson, P. W.; Brown, A. P.; Gillard, J. H. Atorvastatin and uptake of ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles (Ferumoxtran-10) in human monocyte-macrophages: implications for magnetic resonance imaging. *Biomaterials.* 2008;29:2656–2662.
  64. Nahrendorf, M, Jaffer, F; Kelly, K. A.; Sosnovik, D. E.; Aikawa, E.; Libby, P.; Weissleder, R. Noninvasive vascular cell adhesion molecule-1 imaging identifies inflammatory activation of cells in atherosclerosis. *Circulation.* 2006;114:1504–1511.
  65. Naqvi, S, Samim, M; Abdin, Mz; Ahmed, Farhan Jalees; an Maitra; Prashant, Ck; Dinda, Amit K. Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress. *Int J Nanomedicine.* 2010;5:983–989.
  66. Oude Engberink, R, van der Pol, S; Dopp, E. A.; Vries, H. E. de; Blezer, E. L. Comparison of SPIO and USPIO for in vitro labeling of human monocytes: MR detection and cell function. *Radiology.* 2007;243:467–474.
  67. Paus, H. *Physik in Experimenten und Beispielen. 2.*, aktualis. und überarb: Hanser: München, Wien, 2002.
  68. Pfeifer H. The Early Years of NM Spectroscopy in Germany. Zentrum für Magnetische Resonanz der Universität Leipzig. <http://mrz.uni-leipzig.de/pfeifer.html>.
  69. Pilgrimm H. Superparamagnetische Teilchen mit vergrößerter R 1-Relaxivität, Verfahren zur Herstellung und deren Verwendung, Europäische Patentschrift EP 0 888 545 B1, 1999.

- 
70. Pintaske, J, Helms, G; Bantleon, R.; Kehlbach, R.; Wiskirchen, J.; Claussen, C. D.; Schick, F. [A preparation technique for quantitative investigation of SPIO-containing solutions and SPIO-labelled cells by MRI]. *Biomedizinische Technik*. 2005;50:174–180.
  71. Purcell, E, Torrey, H; Pound, R. V. Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid. 1945.
  72. Rausch, M, Baumann, D; Neubacher, U.; Rudin, M. In-vivo visualization of phagocytotic cells in rat brains after transient ischemia by USPIO. *NMR Biomed*. 2002;15:278–283.
  73. Reimer, P, Vosshenrich, R. [Contrast agents in MRT. Substance, effects, pharmacology and validity]. *Radiologe*. 2004;44:273–283.
  74. Renz-Polster, Braun. *Basislehrbuch Innere Medizin*: Urban & Fischer Jena, 2001.
  75. Robertson, J. New observations on the ultrastructure of the membranes of frog peripheral nerve fibers. *J Biophys Biochem Cytol*. 1957;3:1043–1048.
  76. Ross, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115–126.
  77. Roti Roti, J. Cellular responses to hyperthermia (40–46 degrees C): cell killing and molecular events. *Int J Hyperthermia*. 2008;24:3–15.
  78. Roux, W. *Beiträge zur Entwicklungsmechanik des Embryo : Nr 7 ; Über Mosaikarbeit und neuere Entwicklungshypothesen*: J. F. Bergmann: Wiesbaden, 1893.
  79. Ruska, E. Nobel lecture. The development of the electron microscope and of electron microscopy. *Biosci Rep*. 1987;7:607–629.
  80. Saini, S, Stark, D; Hahn, P. F.; Wittenberg, J.; Brady, T. J.; Ferrucci, J. T., JR. Ferrite particles: a superparamagnetic MR contrast agent for the reticuloendothelial system. *Radiology*. 1987;162:211–216.
  81. Salgo, M, Pryor, W. Trolox inhibits peroxynitrite-mediated oxidative stress and apoptosis in rat thymocytes. *Arch Biochem Biophys*. 1996;333:482–488.
  82. Satoshi Ito, S. Anti-alias Image Reconstruction using Phase Scrambling Imaging Technique. *World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering 2006 IFMBE Proceedings*. 2007;14:1451–1454.
  83. Schellenberger, E, Schnorr, J; Reutelingesperger, C.; Ungethum, L.; Meyer, W.; Taupitz, M.; Hamm, B. Linking proteins with anionic nanoparticles via protamine: ultrasmall protein-coupled probes for magnetic resonance imaging of apoptosis. *Small*. 2008;4:225–230.
  84. Scherer, W, Syverton, J; Gey, G. O. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med*. 1953;97:695–710.
  85. Schroeter, M, Saleh, A; Wiedermann, D.; Hoehn, M.; Jander, S. Histochemical detection of ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO) contrast medium uptake in experimental brain ischemia. *Magn Reson Med*. 2004;52:403–406.
  86. Schulze, E, Ferrucci, J, JR.; Poss, K.; Lapointe, L.; Bogdanova, A.; Weissleder, R. Cellular uptake and trafficking of a prototypical magnetic iron oxide label in vitro. *Invest Radiol*. 1995;30:604–610.
  87. Sigma. Agarose Product Information CAS-NMB: 9012-36-6: Sigma: Saint Louis Missouri USA, 1996.
  88. Simon, G, Bauer, J; Saborovski, O.; Fu, Y.; Corot, C.; Wendland, M. F.; Daldrup-Link, H. E. T1 and T2 relaxivity of intracellular and extracellular USPIO at 1.5T and 3T clinical MR scanning. *Eur Radiol*. 2006;16:738–745.
  89. Skolucka, N, Saczko, J; Kotulska, M.; Kulbacka, J.; Choromanska, A. [Electroporation and its application]. *Pol Merkur Lekarski*. 2010;28:501–504.

- 
90. Soenen, S, Himmelreich, U; Nuytten, Nele; Cuyper, Marcel de. Cytotoxic effects of iron oxide nanoparticles and implications for safety in cell labelling. *Biomaterials*. 2011;32:195–205.
  91. Sosnovik, D. Molecular imaging in cardiovascular magnetic resonance imaging: current perspective and future potential. *Top Magn Reson Imaging*. 2008;19:59–68.
  92. Sosnovik, D, Nahrendorf, M; Weissleder, R. Magnetic nanoparticles for MR imaging: agents, techniques and cardiovascular applications. *Basic Research in Cardiology*. 2008;103:122–130.
  93. Sosnovik, D, Weissleder, R. Emerging concepts in molecular MRI. *Curr Opin Biotechnol*. 2007;18:4–10.
  94. Steinbach, F, Thiele, B. Phenotypic investigation of mononuclear phagocytes by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*. 1994;174:109–122.
  95. Stoetzel, C. *Ionenadsorption an nanoskaligen Calciumphosphatpartikeln*, 2007.
  96. Stroh, A, Faber, C; Neuberger, T.; Lorenz, P.; Sieland, K.; Jakob, P. M.; Webb, A.; Pilgrimm, H.; Schober, R.; Pohl, E. E.; Zimmer, C. In vivo detection limits of magnetically labeled embryonic stem cells in the rat brain using high-field (17.6 T) magnetic resonance imaging. *Neuroimage*. 2005;24:635–645.
  97. Stroh, A, Zimmer, C; Gutzeit, C.; Jakstadt, M.; Marschinke, F.; Jung, T.; Pilgrimm, H.; Grune, T. Iron oxide particles for molecular magnetic resonance imaging cause transient oxidative stress in rat macrophages. *Free Radical Biology and Medicine*. 2004;36:976–984.
  98. Tang, T, Howarth, S; Miller, S. R.; Graves, M. J.; Patterson, A. J.; U. King-Im JM; Li, Z. Y.; Walsh, S. R.; Brown, A. P.; Kirkpatrick, P. J.; Warburton, E. A.; Hayes, P. D.; Varty, K.; Boyle, J. R.; Gaunt, M. E.; Zalewski, A.; Gillard, J. H. The ATHEROMA (Atorvastatin Therapy: Effects on Reduction of Macrophage Activity) Study. Evaluation using ultrasmall superparamagnetic iron oxide-enhanced magnetic resonance imaging in carotid disease. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53:2039–2050.
  99. Tanimoto, A, Pouliquen, D; Kreft, B. P.; Stark, D. D. Effects of spatial distribution on proton relaxation enhancement by particulate iron oxide. *J Magn Reson Imaging*. 1994;4:653–657.
  100. Taupitz, M. *Ein neues Kontrastmittel für die MRT auf der Basis Citrat-stabilisierter magnetischer Eisenoxid-Nanopartikel: Wirkstofffindung, präklinische Entwicklung und klinische Prüfung*, 2005.
  101. Taupitz, M, Wagner, S; Schnorr, J.; Kravec, I.; Pilgrimm, H.; Bergmann-Fritsch, H.; Hamm, B. Phase I clinical evaluation of citrate-coated monocrystalline very small superparamagnetic iron oxide particles as a new contrast medium for magnetic resonance imaging. *Invest Radiol*. 2004;39:394–405.
  102. Thet, M, Yokote, Y; Chu, Q.; Wang, Q. T.; Kishino, K.; Tamura, N.; Shimada, J.; Amano, O.; Kanda, Y.; Kunii, S.; Takekawa, F.; Hatano, H.; Shimada, C.; Hasegawa, H.; Sakagami, H. Non-apoptotic cell death induced by nutritional starvation in J774.1 mouse macrophage-like cell line. *Anticancer Res*. 2009;29:5083–5088.
  103. Thomas, C. *Spezielle Pathologie*: Schattauer Verlag Stuttgart, 1996.
  104. Thorek, D, Chen, A; Czupryna, J.; Tsourkas, A. Superparamagnetic iron oxide nanoparticle probes for molecular imaging. *Annals of Biomedical Engineering*. 2006;34:23–38.
  105. Tibbitt, M, Anseth, K. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnol. Bioeng*. 2009;103:655–663.

- 
106. Tysiak, E, Asbach, P; Aktas, O.; Waiczies, H.; Smyth, M.; Schnorr, J.; Taupitz, M.; Wuerfel, J. Beyond blood brain barrier breakdown - in vivo detection of occult neuroinflammatory foci by magnetic nanoparticles in high field MRI. *J Neuroinflammation*. 2009;6:20.
  107. Vries, I de, Lesterhuis, W; Barentsz, J. O.; Verdijk, P.; van Krieken, J. H.; Boerman, O. C.; Oyen, W. J.; Bonenkamp, J. J.; Boezeman, J. B.; Adema, G. J.; Bulte, J. W.; Scheenen, T. W.; Punt, C. J.; Heerschap, A.; Figdor, C. G. Magnetic resonance tracking of dendritic cells in melanoma patients for monitoring of cellular therapy. *Nature Biotechnology*. 2005;23:1407–1413.
  108. Weishaupt, D. *Wie funktioniert MRI ?* 5.Auflage: Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2006.
  109. Weissleder, R, Stark, D; Engelstad, B. L.; Bacon, B. R.; Compton, C. C.; White, D. L.; Jacobs, P.; Lewis, J. Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity. *AJR Am J Roentgenol*. 1989;152:167–173.
  110. Wilhelm, C, Billotey, C; Roger, J.; Pons, J. N.; Bacri, J. C.; Gazeau, F. Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. *Biomaterials*. 2003;24:1001–1011.
  111. Williams, J, Ye, Q; Hitchens, T. K.; Kaufman, C. L.; Ho, C. MRI detection of macrophages labeled using micrometer-sized iron oxide particles. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. 2007;25:1210–1218.
  112. Wintermark, M, Sincic, R; Sridhar, D.; Chien, J. D. Cerebral perfusion CT: technique and clinical applications. *J Neuroradiol*. 2008;35:253–260.
  113. Zhu, W, Artemov, D. Biocompatible blood pool MRI contrast agents based on hyaluronan. *Contrast Media Mol Imaging*. 2010.
  114. Zimmer-Brossy, M, Becht, S. *Lehrbuch der röntgendiagnostischen Einstelltechnik*. 6., neubearb. Aufl: Springer: Berlin, 2008.

## 6.5 Abbildungsverzeichnis

- Abb.1 Kernspin (durchgezogener Kreis) und Präzession des Protons (gepunkteter Kreis)
- Abb.2  $T_1$ -Relaxation des Magnetisierungsvektors ( Longitudinal-Relaxation )
- Abb.3  $T_2$ -Relaxation mit Dephasierung der Magnetisierungsvektoren und Rephasierung durch einen  $180^\circ$ -Refokussierpuls
- Abb.4 Free Induction Decay ( FID ) mit der Signalintensität SI (y-Achse) als einer Funktion der Zeit in [msec] (x-Achse)
- Abb.5 Magnet-Resonanz-Tomograph (MRT) schematisch im Längsschnitt
- Abb.6 Phantom: NMR-Tube mit Zell-Agar-Suspension
- Abb.7 Flip-Winkel  $\alpha$  bei Einstrahlung eines HF-Pulses
- Abb.8  $T_1$ - und  $T_2$ -Zerfall mit  $T_1$ - und  $T_2$ -Relaxationszeit und den entsprechenden MRT-Parametern TR für  $T_1$  und TE für  $T_2$  schematisch
- Abb.9 CPMG-Sequenz  $90^\circ$ -rf-Anregungspuls  $180^\circ$ -Refokussierpulse, Signalpeaks nach  $\frac{1}{2}$  TE Gradientensysteme  $G_s$ ,  $G_p$ ,  $G_r$
- Abb.10 Single-Pulse-Sequenz, Zerfall nach einem  $90^\circ$ -Anregungspuls mit oszillierendem Signalabfall
- Abb.11 Peritoneale Mausmakro-phagen PMJ2-R (American Type Culture Collection [CRL-2458], Manassas, VA, USA) beim Blick durch das Phasenkontrastmikroskop (20x)
- Abb.12 VSOP C-200. Strukturbild mit Citrat-Mantel (gelb) und Eisenoxid-Kern (grau). Mit freundlicher Genehmigung von Ferrofarm, Teltow, Germany

- 
- Abb.13 Neugebauer-Zähl-kammer mit 3 Stegen und Deckglas ( Pfeil ). Oben rechts: Schematische Darstellung des Zählgitters mit 4 peripheren Feldern zu 4 x 4 Einzelfeldern. Unten rechts: Photographische Detailaufnahme eines peripheren Feldes
- Abb.14 Transmissions-Elektronen-Mikroskop schematisch.
- Abb.15 Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer ( ICP-MS ) schematisch
- Abb.16 Bruker 1H Quadrature Birdcage
- Abb.17 Bruker Biospec
- Abb.18 Phantomhalter Nr.1 (2 solcher Scheiben), nicht reproduzierbar einbaubar
- Abb.19 Phantomhalter Nr.2, mit Justierstäben (angedeutet im unteren Bereich, Länge 130mm)
- Abb.20 Phantomhalter mit Phantomen (beladen)
- Abb.21 Einbau des Probenhalters in die Birdcage-Coil
- Abb.22 Datatool – Software unter Matlab™ zur Ziehung von ROIs (Regions of Interest) um die NMR-Röhrchen mit Auswahl der Fit-Routine (2, links mitte) und der manuellen Anpassung Pixelerkennungs-Schwelle (3, rechts oben)
- Abb.23 Prozent defekter Zellen vor dem Labeln aufgetragen gegen die Zellpassage
- Abb.24 Mittelwerte defekter Zellen vor und nach dem Labeling
- Abb.25 Viabilitätsdifferenzen aufgetragen gegen die Passagenummer
- Abb.26 Differenz der Non-Viabilität zwischen vor/nach Labelvorgang aufgetragen gegen die Labelstärken
- Abb.27 Vergleich von Hydrogel- und Agar-Phantomen (MSME)
- Abb.28 T2-Relaxation bei unterschiedlichen Gelzusammensetzungen. Infos über die einzelnen Tubes in Tab.3
- Abb.29 In Agar eingebetteter Makrophage. Intakte Zellwand, Zelle nicht entrundet
- Abb.30 Nach Einbetten des Agarphantoms in Paraffin und anschließendem 0,5-1 µm dickem Mikrotom-Schnitt ist das Agar-Gel mit den diffus verteilten Makrophagen noch gut von der zelloser Umgebung (a) abgrenzbar (großer Pfeil). Es ist keine Makrophagen-Aggregation sichtbar. Die wabenförmige Auflockerung im Agar (kleine Pfeile im oberen Bildabschnitt) ergibt sich aus Schrumpfungartefakten durch die Einbettung ( 50fach | Zeiss Axioskop | Berliner-Blau-Färbung )
- Abb.31 Agar-Leerprobe zeigt Luftblasen im HR-3D FLASH, 38x38µm, TE:4[ms]
- Abb.32 mit Tab.4 Agar- und Hydrogel-Phantome und deren T2-Zeiten. T2 von Agarphantomen mit Kontrastmittel und absteigenden Zelldichten (erster blauer Kasten), ohne Kontrastmittel und absteigender Zelldichte (zweiter blauer Kasten), ohne Kontrastmittel und ohne Zellen (dritter blauer Kasten). T2 von Hydrogelphantomen mit Kontrastmittel und absteigender Zelldichte (Kasten H1) und ohne Kontrastmittel und absteigender Zelldichte (Kasten H2). Balken 18 zeigt die Hydrogelleerprobe ohne Kontrastmittel und ohne Zellen. Die unterschiedlichen Farben jedes Balkens stellen unterschiedliche Messzeitpunkte an den gleichen Proben dar.
- Abb.33 Eisenbeladung, Labelstärke und Ausgleichsgerade.
- Abb.34 Variationskoeffizienten der Eisenbeladung bezogen auf die einzelnen Labelstärken [µgFe/ml]
- Abb.35 Gesamteisenmenge pro ml Medium
- Abb.36 prozentuale Eisenaufnahme [%] bei 100% Angebot als Grad für den Aktivierungslevel der Makrophagen bezogen auf die Labelstärke [µgFe/ml]
- Abb.37 Prozentuale Eisenaufnahme [%] bei 100% Angebot als Grad für den Aktivierungslevel der Makrophagen bezogen auf die Eisenbeladung [pgFe/Zelle]
- Abb.38 Fläche aus Eisenbeladung, Zelldichte und R<sub>2</sub>

- 
- Abb.39 Messpunkte und Ausgleichsgeraden bei konstanten Eisenbeladungsstärken (verschiedene Farben entsprechen unterschiedlichen Eisenbeladungsstärken). Der Übersichtlichkeit halber sind von 22 Eisenbeladungsstärken nur 5 dargestellt.
- Abb.40  $r_{2n}$  bezogen auf die Eisenbeladung pgFe/Zelle
- Abb.41 Messpunkte und Ausgleichsgeraden bei konstanter Zelldichte (verschiedene Farben entsprechen unterschiedlichen Zelldichten). Der Übersichtlichkeit halber sind von den 10 Zelldichten nur 5 dargestellt.
- Abb.42  $r_{2z}$  bezogen auf die Zelldichte [ $10^6$  Zellen/ml]
- Abb.43 Intrazelluläres VSOP:  $\Delta R_2$  -Werte aufgetragen gegen Gesamteisenmenge der Probe
- Abb.44 Extrazelluläres VSOP:  $\Delta R_2$ -Werte aufgetragen gegen Gesamteisenmenge der Probe
- Abb.45 Fläche aus Eisenbeladung, Zelldichte und  $R_2^*$
- Abb.46 Messpunkte und Ausgleichsgeraden bei konstanten Eisenbeladungsstärken (verschiedene Farben entsprechen unterschiedlichen Eisenbeladungsstärken). Der Übersichtlichkeit halber sind von 22 Eisenbeladungsstärken nur 5 dargestellt.
- Abb.47  $r_{2n}^*$  (normiert) bezogen auf die Eisenbeladung pgFe/Zelle
- Abb.48 Messpunkte und Ausgleichsgeraden bei konstanter Zelldichte (verschiedene Farben entsprechen unterschiedlichen Zelldichten). Der Übersichtlichkeit halber sind von den 10 Zelldichten nur 5 dargestellt.
- Abb.49  $r_{2z}^*$  bezogen auf die Zelldichte [ $10^6$  Zellen/ml]
- Abb.50 Zusammenhang der  $\Delta R_2^*$  -Werte und der Gesamteisenmenge in mM (mmol/l)
- Abb.51 Lineare Korrelation zwischen  $\Delta R_2^*$  und  $\Delta R_2$
- Abb.52  $\Delta R_2$ -Fläche mit  $\Delta R_2$ , Zelldichte und Gesamteisenmenge
- Abb.53  $\Delta R_2^*$ -Fläche mit  $\Delta R_2$ , Zelldichte und Gesamteisenmenge
- Abb.54 Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (TEM) von peritonealen Mausmakrophagen (200'000fache Vergrößerung) bei niedriger (**A**) und hoher (**B**) Zellbeladung
- Abb.55 Preußisch-Blau-Färbung (PB), Diaminobenzidin-Verstärkung (+ DAB) und Silber-Gold-Verstärkung (+ Ag/Au) bei 3 verschiedenen zellulären Eisenbeladungen. Bei einer Eisenbeladung von 0 pg/Zelle keine Färbung der Zellen sichtbar. Bei 0,42 pg/Zelle sind vereinzelt eisen-positive Zellen zu erkennen, während bei einer hohen Eisenbeladung von 8,32 pg/Zellen deutlich eisenpositive Zellen in allen 3 Färbungen zu sehen sind.
- Abb.56 Preußisch-Blau-Färbung: Mittlerer Prozentsatz an gelabelten Zellen in [%] bezogen auf die Eisenbeladung in [pg/Zelle]
- Abb.57 DAB-verstärkte Preußisch-Blau-Färbung: Mittlerer Prozentsatz an gelabelten Zellen in [%] bezogen auf die Eisenbeladung in [pg/Zelle]
- Abb.58 Ag-Au-verstärkte Preußisch-Blau-Färbung: Mittlerer Prozentsatz an gelabelten Zellen in [%] bezogen auf die Eisenbeladung in [pg/Zelle]
- Abb.59 Änderung der Relaxationsrate  $\Delta R_2$  und  $\Delta R_2^*$  mit zunehmender Eisenbeladung.
- Abb.60 Fläche aus Eisenbeladung, Zelldichte und  $\Delta R_2$
- Abb.61 Fläche aus Eisenbeladung, Zelldichte und  $\Delta R_2^*$
- Abb.62 Normalverteilungen der errechneten Ergebnisse aus Formel (1). Die mittlere senkrechte Linie markiert den tatsächlichen Zelldichte-Zielwert (jeweils unter dem Schaubild angegeben). Die flankierenden senkrechten Linien links und rechts sind die Standardabweichungen -1SD und +1SD aus den errechneten Zelldichten über alle Eisenbeladungen.
- Abb.63 Prozentuale Abweichung der errechneten Zelldichte vom Zelldichten-Zielwert. Dargestellt für die 3 Zelldichten 0,4 / 2 / 16 \* $10^6$  Zellen/ml

## Danksagung

Für die Unterstützung meiner Arbeit geht mein Dank an meinen Doktorvater **Prof. Dr. Dr. Wolfgang Bauer** (Medizinische Klinik und Poliklinik I, Universitätsklinikum Würzburg) und **Prof. Dr. Peter Jakob** (Lehrstuhl für Experimentelle Physik V, Universität Würzburg), welche mir dieses hochinteressante Thema überlassen haben und in deren Arbeitsgruppe des SFB-688 ich von Anfang an willkommen war, wo ich stets Antwort auf meine Fragen bekam und Hilfe, wo sie mehr als einmal nötig war.

Besonderen Dank geht an meinen grossartigen Betreuer **Dr. med. Gert Klug** (Klinik für Innere Medizin III Kardiologie, Universitätsklinikum Innsbruck), mit welchem ich sehr gerne zusammenarbeitete, der stets offen war für meine Ideen und der meine Arbeit stets unterstützte und förderte.

Für die intensive Betreuung in MR-Fragen möchte ich **Dipl. Phys. Thomas Kampf** sehr herzlich danken. Er war bei der Auswertung der MR-Daten essentiell und mit ihm verbrachte ich manche lange Nacht mit dem Messen der unzähligen Zellphantome. Er nahm sich stets geduldig Zeit, mir die physikalischen Sachverhalte der MRT zu erklären.

Mein weiterer Dank geht an **Dipl. Phys. Thomas Basse-Lüsebrink, Sabine Voll** (Lehrstuhl für Experimentelle Physik V, Universität Würzburg), **Martina Regensburger, Christa Amrehn, Dipl. biol. Meike Weber** (Osteologiezentrum, König-Ludwig-Haus, Universität Würzburg), **Dipl. biol. Elisabeth Bauer** (Medizinische Klinik I, Universitätsklinikum Würzburg), **Claudia Gehrig, Prof. Dr. Krohne** (Abteilung für Elektronenmikroskopie, Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften, Universität Würzburg) und **Dr. med. dent. Uwe Gburek** (Institut für Funktionswerkstoffe in Medizin und Zahnmedizin, Universitätsklinikum Würzburg).