

Aus der Medizinischen Klinik m. S. Kardiologie und Angiologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Magnetische Nanopartikel für die Bildgebung der
Atherosklerose - Wechselwirkung mit Strukturen der
Zelloberfläche**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Moritz Schleicher

aus Freiburg i.Br.

Datum der Promotion: 17.09.2021

Vorwort

Die im Rahmen vorliegender Arbeit entstandenen Ergebnisse wurden bereits publiziert.

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Poller WC, Löwa N, Schleicher M, Münster-Wandowski A, Taupitz M, Stangl V, Ludwig A, Wiekhorst F. Initial interaction of citrate-coated iron oxide nanoparticles with the glycocalyx of THP-1 monocytes assessed by real-time magnetic particle spectroscopy and electron microscopy. Sci Rep. 2020;10(1):3591. [1]

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis	1
Tabellenverzeichnis	2
Zusammenfassung	3
Abstract	4
1 Einleitung	6
1.1 Atherosklerose	6
1.1.1 Endotheliale Dysfunktion: Entstehung der Atherosklerose.....	6
1.1.2 Progression	8
1.1.3 Komplikationen: Plaqueruptur, Erosion und Stenose	8
1.2 Die endotheliale Glykokalyx (GCX).....	9
1.2.1 Aufbau	9
1.2.2 Funktion.....	11
1.3 Bildgebende Verfahren zur Darstellung der Atherosklerose	11
1.4 Magnetische Nanopartikel (MNP).....	14
1.4.1 Aufbau	14
1.4.2 Anwendung von MNP in der Medizin	16
1.5 Magnet-Partikel-Spektrometrie und Magnetpartikelbildgebung	17
1.5.1 MPS.....	17
1.5.2 MPI	18
1.5.3 Verwendung von MNP zur bildgebenden Darstellung atherosklerotischer Plaques	19
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	20
2 Material und Methoden.....	21
2.1 Medien und MNP.....	21
2.2 Zellkulturen	21
2.2.1 EA.hy926	22
2.2.2 HUVEC	22
2.2.3 THP-1 Monozyten.....	22
2.3 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	23
2.3.1 Inkubation mit MNP	23

2.3.2	Chemische Fixierung (Glutaraldehyd/Lanthannitrat/Alcian Blau)	23
2.3.3	Kryofixierung (Hochdruckeinfrierung/Gefriersubstitution)	24
2.3.4	Anfertigung von Ultradünnschnitten und TEM	26
2.4	MPS-Messung	26
2.4.1	Kontinuierliche MPS-Messung	26
2.4.2	MPS-Quantifizierung	28
2.5	FluidMAG-CT50-markierte Zellspots im MPI	29
2.5.1	FluidMAG-CT50-markierte Zellspots in <i>PCR-Tubes</i>	29
2.5.2	FluidMAG-CT50-markierte Zellspots im Modell eines Gefäßquerschnitts	30
2.6	Bestimmung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Prüfung der Zellviabilität	31
2.6.1	DCF-Test	31
2.6.2	Western Blot	32
2.6.3	MTT-Assay	36
2.7	Zelluläre Aufnahme von MNP nach unterschiedlicher Kultivierung (Statisch vs. laminarer Fluss)	37
2.7.1	Versuchsaufbau: Pumpsystem mit Flusseinheiten	37
2.7.2	Inkubation mit MNP unter laminarem Fluss	39
2.7.3	Berliner-Blau-Färbung und Lichtmikroskopie	39
2.8	Software	39
2.9	Statistische Analyse	40
3	Ergebnisse	41
3.1	Visualisierung der Glykokalyx (GCX) mittels TEM	41
3.1.1	Darstellung der GCX von Endothelzellen	41
3.1.2	Interaktion von VSOP mit der GCX von THP-1 Monozyten	43
3.2	Veränderung der magnetischen Eigenschaften von VSOP nach Zellkontakt	45
3.2.1	Magnetische Eigenschaften von zellgebundenen VSOP	45
3.2.2	Magnetische Eigenschaften von VSOP unmittelbar nach Zellkontakt	46
3.3	FluidMAG-CT50 als potenzieller MPI-Partikel für die Bildung der Atherosklerose	48
3.3.1	Quantifizierung zellassoziierter fluidMAG-CT50-Partikel	48
3.3.2	Aufnahme von fluidMAG-CT50 in Endothelzellen nach unterschiedlicher Kultivierung (S vs. LF)	49
3.3.3	Detektionslimit von fluidMAG-CT50-markierten Zellspots im MPI	51

3.3.4	Räumliche Auflösung und Quantifizierbarkeit von fluidMAG-CT50-markierten THP-1 Zellen im Modell eines Gefäßquerschnitts im MPI	53
3.4	Einfluss von Citrat-beschichteten MNP auf die intrazelluläre Bildung von ROS, die Ferritin-Synthese und die Zellviabilität	54
3.4.1	Einfluss von Citrat-beschichteten MNP auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)	54
3.4.2	Einfluss von Citrat-beschichteten MNP auf die Ferritin-Synthese	56
3.4.3	Einfluss von Citrat-beschichteten MNP auf die Zellviabilität.....	57
3.5	Eigenschaften der sterisch-stabilisierten MNP fluidMAG-DXS50, -Q50, -DEAE50 und Resovist	58
3.5.1	Magnetische Eigenschaften nach Zellkontakt	58
3.5.2	Aufnahme von sterisch-stabilisierten fluidMAG-Partikeln in Endothelzellen nach unterschiedlicher Kultivierung (S vs. LF)	60
3.5.3	Einfluss von sterisch-stabilisierten MNP auf die Zellviabilität	62
4	Diskussion.....	63
4.1	Visualisierung der Glykokalyx und Interaktion mit MNP	64
4.1.1	Etablierung der Fixiertechnik	64
4.1.2	Interaktion von MNP und GCX	67
4.1.3	Funktionelle Veränderungen der magnetischen Eigenschaften von MNP nach Zellkontakt	70
4.2	FluidMAG-CT50 als potenzieller MPI-Tracer für die Bildgebung der Atherosklerose	72
4.3	Sterisch-stabilisierte fluidMAG-MNP als potenzielle MPI-Tracer.....	75
4.4	Transienter oxidativer Stress und Zellviabilität nach Inkubation mit MNP.....	77
4.5	Limitationen	80
4.6	Ausblick.....	81
5	Literaturverzeichnis.....	82
6	Abkürzungsverzeichnis	98
	Eidesstattliche Versicherung.....	99
	Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen	100
	Lebenslauf	101
	Publikationsliste	102
	Danksagung	103

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der endothelialen Glykokalyx.	10
Abbildung 2: Schematischer Aufbau von magnetischen Nanopartikeln mit unterschiedlicher Beschichtung.	15
Abbildung 3: Schematische Darstellung der kontinuierlichen MPS-Messung.	27
Abbildung 4: Phantome eines Gefäßquerschnitts.	30
Abbildung 5: Reduktion des gelben Tetrazoliumsalzes (MTT) zu violetter Formazan. ...	36
Abbildung 6: Versuchsaufbau des Ibidi-Pumpsystems.	37
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Schaltsystems innerhalb der Flusseinheit des Ibidi-Pumpsystems.	38
Abbildung 8: Darstellung der GCX humaner EA.hy926 Zellen nach chemischer Fixierung vs. HPF/FS mittels TEM.	42
Abbildung 9: Darstellung der Wechselwirkung von VSOP mit der GCX von THP-1 Monozyten mittels HPF/FS-TEM.	44
Abbildung 10: MPS-Messung von zellgebundenen VSOP nach Entfernung freier MNP.	46
Abbildung 11: MPS-Messung von VSOP während des Kontaktes mit THP-1 Zellen und PBS.	47
Abbildung 12: Zellassoziierte Eisenmasse von EA.hy926 Zellen nach Inkubation mit fluidMAG-CT50.	49
Abbildung 13: Aufnahme von fluidMAG-CT50 in HUVEC nach unterschiedlicher Kultivierung (S vs. LF).	50
Abbildung 14: Detektionslimit von fluidMAG-CT50-beladenen EA.hy926 Zellen im MPI. ...	52
Abbildung 15: Darstellung und Quantifizierbarkeit von fluidMAG-CT50-markierten THP-1 Zellen im Modell eines Gefäßquerschnitts im MPI.	53
Abbildung 16: ROS-Bildung in EAhy.926 nach Inkubation mit fluidMAG-CT50 und VSOP.	55
Abbildung 17: ROS-Bildung in HUVEC nach Inkubation mit fluidMAG-CT50 und VSOP. ...	55
Abbildung 18: Ferritin-Synthese in EA.hy926 Zellen nach Inkubation mit fluidMAG-CT50 und VSOP.	56
Abbildung 19: Ferritin-Synthese in HUVEC nach Inkubation mit fluidMAG-CT50 und VSOP.	57
Abbildung 20: Zellviabilität von HUVEC nach Inkubation mit VSOP und fluidMAG-CT50.	58

Abbildung 21: **Aufnahme von fluidMAG-DXS50, -Q50 und -DEAE50 in HUVEC nach unterschiedlicher Kultivierung (S vs. LF)**..... 61

Abbildung 22: **Zellviabilität von HUVEC nach Inkubation mit sterisch-stabilisierten MNP**. 62

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: **Ergebnisse der MPS-Messungen verschiedener MNP nach Zellbindung und Quantifizierung der zellassozierten Eisenmasse**..... 59

Zusammenfassung

Einleitung

Die Entwicklung einer effektiven nicht-invasiven Bildgebung der Atherosklerose ist von Bedeutung für die Diagnostik und Prävention von akuten kardio- und zerebrovaskulären Komplikationen wie Herzinfarkt und Schlaganfall. Die Magnetpartikelbildgebung (*Magnetic Particle Imaging*: MPI) ist eine präklinische, quantitative Bildgebungsmethode, die auf der spezifischen Detektion magnetischer Nanopartikel (MNP) basiert. Eine gezielte Anreicherung von bioverträglichen und zellaffinen MNP in atherosklerotischen Läsionen könnte die Detektion von vulnerablen Plaques mittels MPI ermöglichen. MPI ist dabei abhängig von der Signalintensität der MNP, deren magnetische Eigenschaften durch Wechselwirkung mit Zellstrukturen wie der Glykokalyx (GCX) verändert werden können. Mittels Magnet-Partikel-Spektrometrie (MPS) kann das magnetische Signal der MNP erfasst und bezüglich ihrer Eignung charakterisiert werden. Im Rahmen der vorliegenden experimentellen Arbeit wurden vorrangig Citrat-beschichtete MNP (VSOP und fluidMAG-CT50) hinsichtlich ihrer magnetischen Eigenschaften, Wechselwirkung mit der GCX und biologischen Verträglichkeit für die MPI untersucht.

Methodik

Die Visualisierung der GCX erfolgte mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) in humanen in-vitro-Zellmodellen. Um dabei die Zellstrukturen optimal zu erhalten und so die Interaktion von VSOP und der GCX von nichtadhärenten THP-1 Monozyten zu visualisieren, kamen unterschiedliche Fixiertechniken zur Anwendung. Die funktionelle Veränderung der magnetischen Eigenschaften nach Zellkontakt von Citrat-beschichteten MNP sowie sterisch-stabilisierten fluidMAG-Partikeln wurde mittels MPS untersucht. Des Weiteren wurde die Darstellung und Quantifizierung von fluidMAG-CT50 markierten Monozyten mittels MPI getestet. Die Verwendung einer Flusskammer ermöglichte die Aufnahme verschiedener MNP in primäre humane Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVEC) in Abhängigkeit unterschiedlicher Kultivierungsmethoden (Statisch (S) vs. Laminarer Fluss (LF)) zu untersuchen. DCF- und MTT-Assays sowie Westernblot kamen zur Anwendung, um die Auswirkung von MNP auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die Zellviabilität und die Ferritin-Synthese im in-vitro-Zellmodell (EA.hy926, HUVEC) zu evaluieren.

Ergebnisse

Citrat-beschichtete VSOP waren nach kürzester Zeit mit der GCX von THP-1 Monozyten assoziiert. Dieser Prozess zeigte sich unmittelbar in der funktionellen Veränderung der magnetischen Eigenschaften von VSOP sowie für fluidMAG-CT50 nach Zellkontakt. FluidMAG-CT50 wurde signifikant höher in S-HUVEC ($5,8 \pm 2,0$ %) als in LF-HUVEC ($1,4 \pm 0,4$ %) aufgenommen. Oberhalb des Detektionslimits von 15.461 Zellen konnten fluidMAG-CT50 markierte Monozyten mittels MPI visualisiert und genau quantifiziert werden. Nach Inkubation mit Citrat-beschichteten MNP konnten eine transiente Erhöhung der ROS-Bildung, eine gesteigerte Ferritin-Synthese und kein signifikanter Einfluss auf die Zellviabilität in HUVEC beobachtet werden.

Schlussfolgerung

Sowohl die hohe Zellaffinität und Bioverträglichkeit als auch die Darstellung und Quantifizierung von markierten Monozyten mittels MPI indizierten die Anwendbarkeit von Citrat-beschichteten MNP für die Darstellung von atherosklerotischen Plaques und zeigten neue Möglichkeiten für eine funktionelle Bildgebung auf.

Abstract

Introduction

The development of an effective non-invasive imaging of atherosclerosis is important for diagnosis and prevention of acute cardiovascular and cerebrovascular complications such as heart attack and stroke. Magnetic particle imaging (MPI) is a preclinical, quantitative imaging method based on the specific detection of magnetic nanoparticles (MNP). A targeted accumulation of biocompatible and cell affine MNP in atherosclerotic lesions could enable the detection of vulnerable plaques using MPI. MPI is dependent on the signal intensity and magnetic properties of MNP. The magnetic characteristics of MNP are altered upon interaction with cell structures like the glycocalyx (GCX). Using magnetic particle spectrometry (MPS), the magnetic signal of MNP can be detected and characterized for its suitability. In context of the current experimental work, primarily citrate-coated MNP (VSOP and fluidMAG-CT50) were tested with regard to their magnetic properties, interaction with the GCX and biological compatibility for MPI.

Methods

The GCX was visualized using transmission electron microscopy in human in-vitro-cell-models. To best maintain cell structures and visualize the interaction of VSOP and the GCX of THP-1 monocytes, different fixation techniques were used. The functional change in magnetic properties after cell contact of citrate-coated MNP was measured using MPS. The visualization and quantification of fluidMAG-CT50 labeled monocytes were tested using MPI. A flow chamber was used to investigate the uptake of various MNP in primary human endothelial cells (HUVEC) depending on different cultivation methods (static (S) vs. laminar flow (LF)). Western Blot, DCF and MTT assays were used to evaluate the effect of MNP on ferritin synthesis, formation of reactive oxygen species (ROS) and cell viability in EA.hy926 and HUVEC.

Results

Citrate-coated VSOP were rapidly associated with the GCX of THP-1 monocytes. This process was immediately apparent in the functional change of the magnetic properties of VSOP and fluidMAG-CT50 after cell contact. The uptake of fluidMAG-CT50 was significantly higher in S-HUVEC ($5,8 \pm 2,0$ %) compared to LF-HUVEC ($1,4 \pm 0,4$ %). Above the detection limit of 15,461 cells, fluidMAG-CT50 labeled monocytes could be visualized and precisely quantified using MPI. After incubation with citrate-coated MNP, a transient increase in formation of ROS, an increased ferritin synthesis and no significant influence on cell viability in HUVEC were observed.

Conclusion

The high cell affinity and biocompatibility as well as the visualization and quantification of labeled monocytes using MPI indicated the applicability of citrate-coated MNP for the detection of atherosclerotic plaques and revealed new opportunities for functional imaging.

1 Einleitung

1.1 Atherosklerose

Atherosklerose wird heute als chronisch entzündliche Erkrankung multifaktorieller Genese definiert [2]. Charakterisiert durch Bildung arterieller Plaques und chronisch progressiver Verengung des Gefäßlumens ist die Atherosklerose von einem kontinuierlichen, sich stetig wandelnden Krankheitsbild geprägt. Im fortgeschrittenen Stadium führen kardiovaskuläre Erkrankungen zu schweren Komplikationen wie Myokardinfarkt und Schlaganfall.

1.1.1 Endotheliale Dysfunktion: Entstehung der Atherosklerose

Als innerste Schicht der Gefäßwand und somit Teil der Tunica Intima spielt das Endothel nicht nur eine entscheidende Rolle als direkte Barriere zum Gefäßlumen, sondern ist auch wichtigster Regulator der vaskulären Homöostase. Die Kontrolle des Gefäßtonus durch vasodilatierende und -konstriktive Stoffe sowie die Balance zwischen Thrombogenese und Fibrinolyse durch Sekretion von pro- und antikoagulatorischen Substanzen stellen essenzielle Aufgaben dar. Auch das Wachstum von glatten Gefäßmuskelzellen (VSMCs) und eine gezielte inflammatorische Immunantwort stehen unter der Kontrolle des funktionellen Endothels [3]. Hauptrisikofaktoren wie Hypercholesterinämie, Rauchen, Bluthochdruck, Diabetes mellitus und körperlicher Bewegungsmangel führen im Zusammenspiel mit dem Alter und genetischer Prädisposition zu einer endothelialen Dysfunktion. Auch erhöhte Homocystein-Spiegel, welche toxisch auf das Endothel wirken, und Infektionen mit Herpesviren und Chlamydia pneumoniae haben einen Einfluss auf die Ausprägung der Atherosklerose [2, 4].

Low Density Lipoprotein (LDL), welches vermehrt durch das dysfunktionale Endothel in die Gefäßwand eindringt, wird in der netzartigen Extrazellulärmatrix des subendothelialen Raumes zurückgehalten [5, 6] und kann durch reaktive Sauerstoffspezies, die Myeloperoxidase und Peroxynitrit oxidiert werden. Aktivierte Endothelzellen sezernieren das Chemokin *Monocyte Chemotactic Protein-1* (MCP-1), was eine vermehrte Einwanderung von Monozyten zur Folge hat, die über den *Macrophage-Colony Stimulating Factor* (M-CSF) zu Makrophagen heranreifen [7]. Die Aufnahme des oxidierten LDLs erfolgt über *Scavenger*-Rezeptoren der Makrophagen [8]. Durch die

Internalisierung wird die Bildung von Lipidperoxiden, die Ansammlung von Cholesterolestern und schließlich die Umwandlung von Makrophagen in Schaumzellen gefördert [5].

Der Entstehungsort von atherosklerotischen Plaques wird entscheidend durch die hämodynamischen Bedingungen im Gefäß determiniert. Über Mechanotransduktion nehmen laminare Scherkräfte Einfluss auf intrazelluläre Signalwege, die Genexpression und die Struktur des Zytoskeletts der Endothelzellen. Protektive Scherkräfte erhöhen die Synthese der endothelialen NO-Synthase (eNOS) und hemmen die Expression von MCP-1 [9, 10]. Durch nicht laminare Flussbedingungen, besonders an Bifurkationen und Kurvaturen, wirken reduzierte oder nicht gerichtete Scherkräfte auf das Endothel ein [11]: Die funktionelle Regulation ist außer Kraft gesetzt und induziert einen proatherogenen Phänotyp an diesen prädisponierten Stellen [12].

Im Zuge der Ansammlung von Lipiden und Immunzellen wird das Gleichgewicht von protektiver Regulation in Richtung einer inflammatorischen Aktivierung des Endothels verschoben. Das funktionelle Endothel bildet unter physiologischen Bedingungen vasodilatierende Substanzen wie Stickstoffmonoxid (NO), Prostacyclin und Bradykinin. NO wird von der endothelialen NO-Synthase gebildet. Zusammen mit Prostacyclin und Bradykinin wirkt es antiinflammatorisch, indem es hemmend auf die Proliferation und Migration von VSMCs wirkt, die Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Endotheloberfläche reduziert und die Plättchenaggregation verringert [13]. Ox-LDL steigert die Synthese von Caveolin-1, welches die eNOS inaktiviert und somit die NO-Produktion inhibiert. Durch erhöhten oxidativen Stress, bedingt durch Rauchen, Hypertension und Diabetes, wird die Bioverfügbarkeit von NO weiter verringert [3]. Die erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen wie *Vascular Adhesion Molecule-1* (VCAM-1) und *Intracellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1) sowie eine gesteigerte Gefäßpermeabilität führen zu einer Anheftung und Einwanderung von Monozyten und spezifischen T-Lymphozyten in die Läsion [14].

VSMCs dedifferenzieren und wandern durch Signale wie den *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) vermehrt aus der Tunica Media in die Intima ein [15]. Die Anhäufung lipidhaltiger Schaumzellen bildet einen Fettstreifen (*fatty streak*) innerhalb der Gefäßwand und klassifiziert damit die frühe atherosklerotische Läsion, die bereits im Kindesalter auftreten kann und klinisch unauffällig bleibt [16].

1.1.2 Progression

In der atherosklerotischen Läsion führt die Interaktion zwischen Makrophagen und T-Lymphozyten zur Sekretion von inflammatorischen Zytokinen wie dem *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) und Interferon- γ (IFN- γ), die wiederum die Immigration neuer Leukozyten initiieren [17]. Die Apoptose von Schaumzellen, Lymphozyten und glatten Muskelzellen resultiert in der Bildung des nekrotischen Kerns.

VSMCs bilden durch Produktion von kollagenreichem Bindegewebe eine fibröse Kappe, die entscheidend zur Stabilisierung der Plaques beiträgt [18]. Die Bildung des lipidreichen nekrotischen Kerns unterhalb der fibrösen Bedeckung stellt die vorangeschrittene atherosklerotische Läsion dar. Die Sekretion von Matrix-Metalloproteasen (MMP) durch Makrophagen und die Neovaskularisation können schließlich zu einer Reduktion und Destabilisierung der fibrösen Kappe führen [19]. Diese Umwandlung einer stabilen Plaque, dem Fibroatherom mit dicker Kappe, zu einer instabilen Plaque, dem Fibroatherom mit dünner Kappe (*TCFA: Thin cap fibroatheroma*), stellt ein großes Risiko für folgenschwere Komplikationen dar.

1.1.3 Komplikationen: Plaqueruptur, Erosion und Stenose

Unterschiedliche Mechanismen führen zu lebensbedrohlichen Komplikationen der Atherosklerose. Die Verengung des Lumens arterieller Gefäße durch kontinuierlichen Umbau der atherosklerotischen Gefäßwand kann eine Minderdurchblutung und Unterversorgung des abhängigen Gewebes zur Folge haben. Die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) und koronare Herzkrankheit (KHK) lösen besonders bei physischen Belastungen starke Schmerzen und Luftnot aus, die zusätzlich von einem erhöhten Risiko begleitet werden, einen Myokardinfarkt oder Apoplex nach Bildung eines Thrombus zu erleiden.

Am häufigsten erfolgt die Thrombusbildung über das Aufbrechen einer atherosklerotischen Läsion (Plaqueruptur) und der Freisetzung von extrazellulären Bestandteilen in das Lumen [20]. Auch die oberflächliche Erosion atherosklerotischer Plaques kann ursächlich für die Bildung eines Thrombus sein. Des Weiteren kann, wenn auch seltener, dieser Prozess durch kalzifizierte Knoten initiiert werden. Vulnerable Plaques beschreiben Läsionen, die ein hohes Risiko besitzen die Bildung eines

Thrombus zu verursachen oder durch progressives Wachstum das Lumen stark zu verengen [21].

Schwere Komplikationen der Atherosklerose, wie Herzinfarkt und Schlaganfall, sind die häufigsten Todesursachen weltweit. Im Jahr 2016 starben weltweit 9,43 Millionen an ischämischen Herzerkrankungen und 5,81 Millionen Menschen an Schlaganfällen [22].

1.2 Die endotheliale Glykokalyx (GCX)

Die GCX besteht aus einem Netzwerk membrangebundener Glykoproteine und Proteoglykane, die mit Hyaluronsäure und Plasmaproteinen verknüpft sind. Ihre Funktionen sind die Regulation des transkapillaren Flüssigkeitsaustausches, die Bildung einer protektiven Barriere zum Schutz vor der Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten und die Mechanotransduktion, durch die eine Scherstress-vermittelte Vasodilatation reguliert wird [23]. Die inflammatorische Aktivierung des Endothels führt zu einer strukturellen Degradation der GCX und dem Verlust ihrer protektiven Funktion.

1.2.1 Aufbau

Membrangebundene Proteoglykane bilden das Rückgrat der GCX, da sie die löslichen Bestandteile an der Zelloberfläche verankern. Proteoglykane bestehen aus einem Kernprotein, dessen gebundene Seitenketten sich aus polyanionischen Glykosaminoglykanen (GAGs) zusammensetzen [24]. GAGs sind aus multiplen Disaccharid-Einheiten aufgebaut, die über 1,4-glykosidische Bindungen verknüpft sind und über ihre Sulfatierung und (De-)Acetylierung modifiziert werden können. Ihre Eigenschaften machen sie auch zu grundlegenden Bestandteilen der Extrazellulärmatrix (EZM) im Gewebe [25].

Vertreter der GAGs sind Hyaluronsäure (*HA: Hyaluronic Acid*), Heparansulfat (HS), Chondroitinsulfat/Dermatansulfat (CS/DS) und Keratansulfat (KS) [24]. Proteoglykane wie Syndecan und Glypican besitzen eine feste Verankerung in der Zellmembran über eine Transmembrandomäne (Syndecan) oder einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker (Glypican). Proteoglykane wie Mimecan, Perlecan und Biglycan werden nach Modifizierung ihrer GAG-Seitenketten von Zellen sezerniert und bilden einen löslichen Teil der GCX [23].

Die dynamische Komposition der endothelialen GCX befindet sich in einem Equilibrium zwischen stetigem Auf- und Abbau ihrer Bestandteile und wird in Reaktion auf einwirkende Scherkräfte reguliert. An fest verankerte Proteoglykane und Glykoproteine binden lösliche GAGs wie Hyaluronsäure, welche selbst über keine kovalente Bindung zu einem Kernprotein verfügen, und Plasmaproteine wie Albumin, die zusätzlich untereinander verknüpft sind. Enzymatischer- und Scherstress-bedingter Abbau führen zu einer ständig wechselnden Struktur sowohl membranverankerter Proteoglykane als auch löslicher Bestandteile der GCX, die nach der Biosynthese in den Zellen ausgetauscht werden [23].

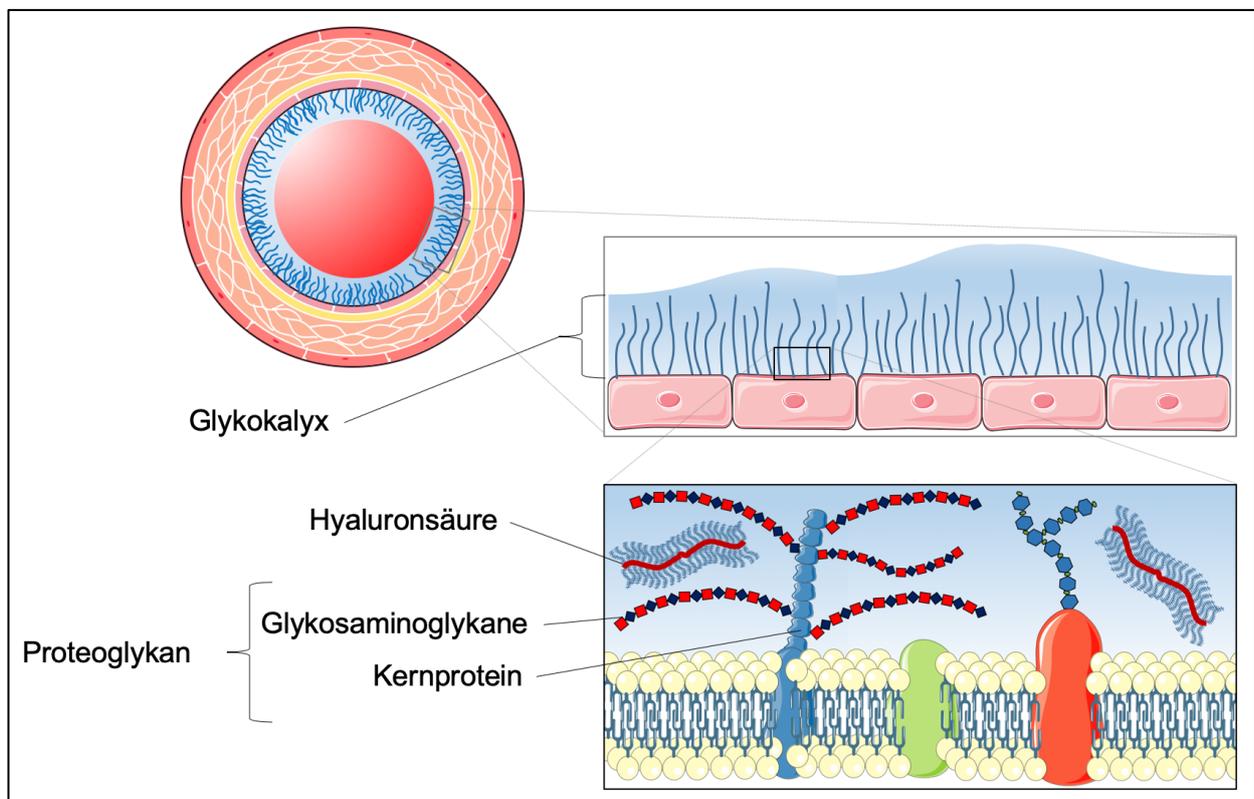


Abbildung 1: **Schematische Darstellung der endothelialen Glykokalyx.** Proteoglykane wie Syndecan und Glypican sowie die gebundenen GAGs Chondroitinsulfat (CS) und Heparansulfat (HS) sind über Kernproteine fest in der Zellmembran verankert. Lösliche Bestandteile der GCX wie die polyanionische Hyaluronsäure (HA) sind durch ihre negativen Ladungen lose mit den festen Bestandteilen assoziiert. Teile der Abbildung wurden aus den Präsentationen „Cell Membrane“, „Intracellular Components“ und „Arteries Physiology“ von „Servier Medical Art“ (<https://smart.servier.com/>) entnommen und modifiziert. Der Gebrauch fällt unter folgende *Creative Commons* Lizenz: <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>.

1.2.2 Funktion

Die GCX fungiert als Barriere und molekulares Sieb zwischen Endothel und Blutstrom und reguliert den transkapillaren Flüssigkeitsaustausch [26]. Carboxylgruppen erlauben der frei löslichen Hyaluronsäure eine große Menge an Wassermolekülen innerhalb der GCX zu binden. Dies resultiert in einer gelartigen Struktur, die von kleinen Molekülen wie Elektrolyten leicht passiert werden kann, jedoch eine Barriere für größere Moleküle bildet.

Die GCX ist für die Scherkraft-vermittelte Mechanotransduktion von Bedeutung. In-vitro-Flusseexperimente mit Endothelzellen zeigten, dass eine partielle Entfernung von Heparansulfat und Hyaluronsäure die durch Scherkräfte induzierte NO-Produktion inhibiert [27, 28]. Über verankerte Proteoglykane wie Syndecan-1 werden von der GCX Scherkraft-vermittelte Signale übertragen, die zu einer Umstrukturierung des Zytoskeletts führen [29].

Proatherogene Flussbedingungen könnten maßgeblich an der Degradation und strukturellen Veränderung der GCX beteiligt sein. Experimentelle Arbeiten belegen den Einfluss von Scherkräften auf die Struktur und Größe der GCX [30, 31]. Untersuchungen im Tiermodell zeigen, dass oxidierte Lipoproteine die endotheliale GCX zerstören und die Thrombozyten-Adhäsion an der Gefäßwand verstärken [32]. Zudem induzierten Entzündungsmediatoren wie TNF- α eine erhöhte Permeabilität der GCX [33].

1.3 Bildgebende Verfahren zur Darstellung der Atherosklerose

Die Darstellung instabiler Plaques ist von Bedeutung, um dem Auftreten folgenschwerer Komplikationen präventiv entgegenwirken zu können. Die Detektion vulnerabler Plaques stellt jedoch eine Herausforderung dar, weil ein überwiegender Teil der Läsionen, die Komplikationen verursachen, nicht aus einem stark verengten Gefäßabschnitt hervorgehen [34]. Die invasive Bildgebung ist gegenüber der nicht-invasiven Bildgebung deutlich weiterentwickelt und wird nach Auftreten eines kardiovaskulären Ereignisses verwendet, ist jedoch für Hoch-Risiko-Patienten, die noch keine Symptomatik zeigen, weniger geeignet.

Invasive Methoden wie intravasaler Ultraschall (IVUS) und Optische Kohärenztomographie (OCT) werden im klinischen Alltag eingesetzt und lassen eine Einschätzung vulnerabler Plaques zu [35]. IVUS wurde verwendet, um vulnerable

Plaques zu detektieren und die anatomische Struktur sowie in Ansätzen auch die morphologische Komposition zu untersuchen [36]. Limitiert durch die räumliche Auflösung können jedoch wichtige Merkmale, wie die dünne Kappe eines TCFA, nicht mehr aufgelöst werden [35].

Intravasaler Ultraschall mit Radiofrequenz-Analyse (IVUS-RF) verwertet das akustische Signal vor Demodulation und Scan-Konvertierung. Auf diese Weise kann eine bessere Darstellung der Plaque-Komposition erzielt werden [37]. In einer Patientenstudie, die IVUS-RF mit *Virtual Histology (VH)* verwendete, konnten 595 TCFA detektiert werden, von denen 26 für ein kardiovaskuläres Ereignis verantwortlich waren. Mithilfe dieser Methode wurden vulnerable Läsionen detektiert, jedoch ließ sich keine verlässliche Aussage über die Progression einer Plaque treffen, die zur Umwandlung von zuvor nicht evaluierten stabilen Plaques in vulnerable Plaques führen kann [38]. Als weitere Analyse der IVUS-RF wurde auch *Integrated Backscatter* verwendet, um besondere Gewebeeigenschaften vulnerabler Plaques zu untersuchen [39].

OCT ist im Vergleich zu IVUS durch seine deutlich bessere räumliche Auflösung gekennzeichnet, die eine differenzierte Darstellung der morphologischen Plaque-Komposition ermöglicht [40]. Limitierend ist hier jedoch die Eindringtiefe (2-3 mm) durch eine Bildgenerierung mittels Infrarotlicht. Für optimale Bilder muss das Gefäß zudem mit einem Kontrastmittel gespült oder mit einem Ballon geblockt werden, da das Blut einen störenden Einfluss auf die Bildgebung hat [41]. Dennoch können durch die hohe räumliche Auflösung TCFA detektiert werden [35, 42]. Aufgrund möglicher Komplikationen sind invasive Modalitäten in vielen Fällen sowohl für Patienten, die keine klinischen Symptome aufweisen, als auch für eine Verlaufskontrolle ungeeignet.

Nichtinvasive Bildgebungsverfahren wie die Multi-Detektor-Computertomographie (MDCT) der Gefäße (Angiographie) mit iodhaltigen Kontrastmitteln konnten durch die kontinuierliche Weiterentwicklung der zeitlichen und räumlichen Auflösung vulnerable Plaques bereits sensitiv detektieren [43]. Positives *Remodelling*, punktuelle Kalzifizierungen und eine verringerte Plaque-Dichte als Hinweise auf eine vulnerable Läsion lassen sich darstellen. Eine präzisierte Aussage über einzelne Plaques als Verursacher eines kardiovaskulären Ereignisses zu treffen ist jedoch noch schwierig [44, 45]. Eine weitere Limitation bleibt die Strahlenbelastung, die eine Verlaufskontrolle in kürzeren Zeitabständen verhindert [46]. Trotzdem ist die CT-

Angiographie die bevorzugte nicht-invasive Methode auf der Suche nach vulnerablen Plaques [35].

Auch die nicht-invasive Magnetresonanztomographie (MRT) kann verwendet werden, um atherosklerotische Plaques zu klassifizieren. Morphologische Kriterien wie die Dicke der fibrösen Kappe, der lipidreiche und/oder nekrotische Kern und Hämorrhagie innerhalb der Plaque wurden bereits dargestellt, um das Stadium einer atherosklerotischen Plaque zu charakterisieren [47, 48]. Technische Herausforderungen bestehen vor allem in der Visualisierung vulnerabler Plaques in den Koronararterien, da ihre kontinuierliche Bewegung und die Größe der Gefäße die Detektion erschweren [35]. Die Weiterentwicklung einer kardiovaskulären Magnetresonanztomographie (CMR) bietet jedoch vielversprechende Möglichkeiten für eine nicht-invasive Bildgebung zum Risiko-Assessment von Patienten mit Atherosklerose [49].

Auch die Positronen-Emissions-Tomographie-(PET)-CT wird für die Detektion vulnerabler Plaques bereits eingesetzt, muss jedoch hinsichtlich ihrer Strahlenbelastung auf das Nutzen/Risiko-Verhältnis bei breiter Anwendung eingehend geprüft werden [35]. Nicht-invasiver Ultraschall mit akustischen Kontrastmitteln wurde verwendet, um die Neovaskularisation in atherosklerotischen Plaques semiquantitativ zu bestimmen, befindet sich aber noch in klinisch experimentellen Stadien [50].

Die Anwendung von magnetischen Nanopartikeln (MNP) bietet einen neuen präklinischen Ansatz zur Darstellung spezifischer Plaque-Komponenten. Als präzises Target lässt sich die Plaque-Inflammation über die Anreicherung von Superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikeln (SPIONs) in Makrophagen innerhalb der Läsion darstellen. Die Verwendung von MNP zeigt neue Möglichkeiten auf, um vulnerable Plaques zu detektieren und gleichzeitig den Verlauf der Therapie zu überwachen [51-53]. Citrat-beschichtete VSOP (*Very Small Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles*) wurden erfolgreich verwendet, um instabile Plaques bereits eine Stunde nach intravenöser Applikation in atherosklerotischen Gefäßabschnitten von Kaninchen darzustellen [54].

VSOP sind elektrostatisch-stabilisierte MNP, die eine klinische Prüfung bis zur Phase II absolviert haben [55, 56]. Ein Vorteil dieser gegenüber anderen Kontrastmitteln, wie Gadolinium, könnte die gute Bioverträglichkeit sein, die in vorangegangenen Studien

bestätigt wurde [55, 56]. VSOP werden nach Aufnahme in den Zellen zu Eisen abgebaut und in Form von Ferritin in der Leber gespeichert [57].

Die Entwicklung spezieller MNP ist auch für die Anwendung in der Magnetpartikelbildung (MPI) von Bedeutung. MPI ist eine neue, nicht-invasive und quantitative Bildgebungsmethode zur spezifischen Darstellung von MNP, die sich in der vorklinischen Entwicklung befindet [58]. Ein Vorteil bei MRT und MPI liegt im Wegfall der ionisierenden Strahlenbelastung. Bis zur klinischen Anwendbarkeit von MPI bedarf es jedoch noch der präklinischen Weiterentwicklung dieses MNP-basierten Bildgebungsverfahrens [59].

1.4 Magnetische Nanopartikel (MNP)

MNP finden bereits vielseitige Verwendung in der biomedizinischen Forschung und der klinischen Praxis, z.B. um den Kontrast bestimmter Organe wie Leber, Milz und Lymphknoten im MRT zu verstärken. Für die Eignung als MPI-Tracer sind die magnetischen Eigenschaften der MNP und ihr Verhalten im biologischen System von großer Bedeutung, da sie die Entwicklung der neuen nicht-invasiven Bildgebung für eine Vielzahl potenzieller Anwendungsfelder erst ermöglichen.

1.4.1 Aufbau

MNP setzen sich aus einem magnetischen Kern und einer stabilisierenden, nicht magnetischen Hülle zusammen. Ein Großteil in der Biomedizin verwendeter MNP besitzen einen magnetischen Kern aus Eisenoxid. SPIONs sind als kleine Eisenoxid-Partikel definiert, die sich in einem Magnetfeld stark magnetisieren lassen, jedoch nach Abschalten des Magnetfeldes in ihren nicht magnetisierten Zustand zurückkehren. Der eisenhaltige Kern, dessen Durchmesser zwischen 1-100 nm variiert, besteht aus Magnetit oder Maghemit. Magnetit (Fe_3O_4) setzt sich aus einer Mischung aus Eisen(II)- und Eisen(III)-oxid zusammen, Maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) hingegen ausschließlich aus Eisen(II)-oxid.

Die Stabilisierung durch eine Hülle um den Eisenkern verhindert die Aggregation der einzelnen Partikel innerhalb einer homogenen Suspension [60]. Eine sterische Stabilisierung der Eisenoxid-Partikel erfolgt durch große Moleküle wie Dextran oder Polyethylenglycol (PEG). Die Zusammensetzung der Polymere kann zusätzlich durch

das Anfügen funktioneller Gruppen (z.B. Carboxyl-Gruppen bei Resovist: Carboxydextran) erweitert werden. Eine weitere Form ist die elektrostatische Stabilisierung. Die Beschichtung mit organischen Säuren (wie z.B. Citrat bei VSOP) erzeugt eine negative Ladung an der Oberfläche der Partikel, die zu einer gegenseitigen Repulsion führt [61]. In Abbildung 2 sind Möglichkeiten der Stabilisierung dargestellt.

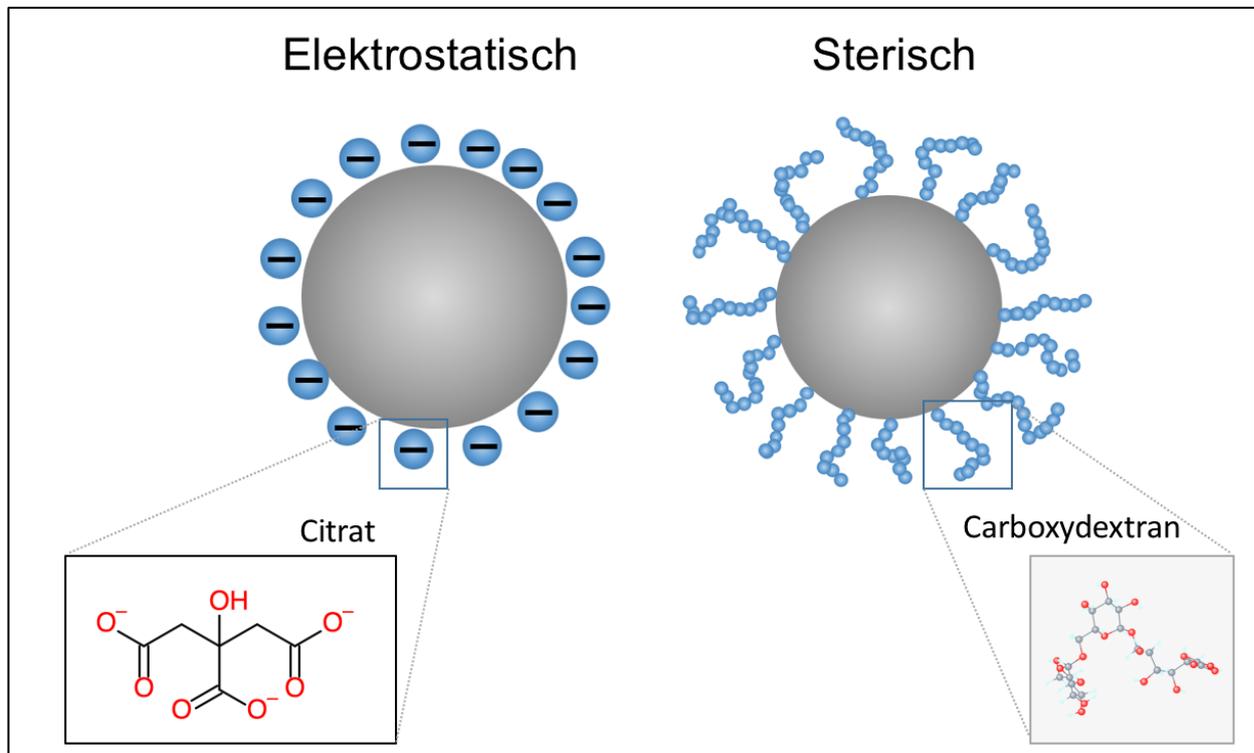


Abbildung 2: **Schematischer Aufbau von magnetischen Nanopartikeln mit unterschiedlicher Beschichtung.** Superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel (SPIONs) besitzen einen Eisenkern und eine stabilisierende Hülle. Citrat-beschichtete MNP (z.B. VSOP) werden durch ihre Hülle elektrostatisch stabilisiert. Große Moleküle wie Carboxydextran bewirken eine sterische Stabilisierung der MNP (z.B. Resovist). Die Strukturformel von Carboxydextran wurde von PubChem erstellt (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

Der hydrodynamische Durchmesser eines Partikels ergibt sich aus der gemeinsamen Größe des Durchmessers des Eisenkerns und der Hülle in einer wässrigen Lösung. Für die Charakterisierung der MPI-Tracer ist die Größe des Kerns jedoch ein entscheidendes Kriterium, da die Signalintensität in der MPI vor allem von der Zusammensetzung und Größe des Eisenoxidkerns abhängig ist [62].

1.4.2 Anwendung von MNP in der Medizin

Die vielfältigen Möglichkeiten zur Synthese von MNP erlauben eine hohe Variabilität in der Beschichtung, Größe und Struktur der Partikel, sodass sie ihrer Funktion entsprechend angepasst werden können.

Nach intravenöser Applikation werden MNP vor allem durch das retikuloendotheliale System (RES) aufgenommen, das durch phagozytierende Zellen in Leber, Milz, Lymphknoten und Knochenmark gebildet wird [57]. Im MRT bewirken MNP durch eine kürzere Relaxationszeit eine Abschwächung des Signals und führen somit zu einer negativen Kontrastverstärkung. Dies kann genutzt werden, um gesundes Gewebe von malignen Entartungen in Organen des RES abzugrenzen [63-65]. Durch die Modifizierung der Größe und Oberflächenbeschichtung der Partikel kamen weitere Anwendungen hinzu. Diese umfassen die präklinische Testung als T1-Kontrastmittel für die Magnetresonanz-Angiografie [66], die experimentelle Prüfung als Kontrastmittel zur Detektion atherosklerotischer Plaques und vaskulärer Blutgerinnsel [67] und die Perfusionsdiagnostik verschiedener Organe [68] und Lebertumoren [69]. Die Aufnahme der MNP in entartetes Gewebe ermöglicht zudem die Thermoablation von Tumoren durch Hyperthermie [70].

MNP werden von spezialisierten Makrophagen (Kupffer-Zellen) und sinusoidalen Endothelzellen der Leber internalisiert, in Lysosomen degradiert und das frei werdende Eisen dem körpereigenen Eisenspeicher in Form von Ferritin und Hämosiderin hinzugefügt [71, 72]. Der MNP Ferumoxytol wurde zur Behandlung einer Eisenmangelanämie bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz verwendet [73]. Kleine MNP wie AMI-227 mit deutlich längeren Halbwertszeiten (200 min) ermöglichen eine Anwendung als Blutpool-Kontrastmittel [57].

Die molekulare Bildgebung und die Markierung spezifischer Zellen im MRT sowie MPI-Scanner sind ein vielversprechendes Einsatzgebiet der MNP. Die Markierung von Makrophagen, Lymphozyten oder Stammzellen mit MNP und die anschließende Injektion erlauben die Verfolgung und Visualisierung dieser Zellen im Körper (Zelltracking) [57, 74]. Über die zusätzliche Kopplung von Liganden und Antikörpern können spezifische molekulare Targets wie Zellrezeptoren und Antigene präzise angesteuert werden, um diese zu markieren und Medikamente an ihren Wirkungsort zu transportieren, sodass die diagnostische und therapeutische Funktion der MNP vereint wird (Theranostik) [75].

1.5 Magnet-Partikel-Spektrometrie und Magnetpartikelbildung

Die Magnetpartikelbildung (MPI) ist eine neu entwickelte Bildgebungsmethode, die auf der spezifischen Detektion magnetischer Nanopartikel (MNP) basiert [58]. Das MPI-Verfahren ermöglicht die quantitative Bildgebung von MNP bei einer räumlichen Auflösung im Submillimeterbereich [76]. Durch die zeitliche Auflösung von wenigen Millisekunden können Prozesse nahezu in Echtzeit verfolgt werden. Die Magnet-Partikel-Spektrometrie (MPS) wurde zur Charakterisierung von MNP entwickelt, um geeignete Nanopartikel für die MPI zu finden und zu charakterisieren. Dabei zeigte sich die MPS als effektive Methode, um magnetische Tracer in Zellen oder Gewebe ohne deren Zerstörung zu quantifizieren und die Veränderung physikalischer Eigenschaften nach Kontakt mit biologischem Material zu erfassen [77, 78].

1.5.1 MPS

Bei der MPS werden MNP mithilfe eines sinusförmigen magnetischen Wechselfeldes der Frequenz f_0 angeregt. Die zeitliche Änderung der Magnetisierung der MNP wird durch eine Detektionsspule aufgezeichnet. Aufgrund des Magnetisierungsverhaltens der MNP enthält das detektierte Signal neben der Anregungsfrequenz f_0 auch höhere (ungerade) Harmonische $n \cdot f_0$. Diese werden mithilfe einer Fourier-Transformation des detektierten Zeitsignals sichtbar.

Die gemessene Signalintensität der dritten Harmonischen der Anregungsfrequenz (A_3) in Am^2 pro kg Eisen (Fe) stellt einen wichtigen Parameter für den Vergleich und die Eignung potenzieller MPI-Tracer dar. Mithilfe der Referenzmessung einer definierten Menge MNP kann die Eisenmasse in Zellen oder Gewebe nach Aufnahme der Partikel quantifiziert werden [78]. Ein stärkeres Signal (A_3 pro kg Fe) ermöglicht eine bessere Quantifizierung und ein geringeres Detektionslimit von MNP in biologischem Material und ist gleichbedeutend für die Signalintensität in der MPI.

Das Verhältnis der gemessenen Signalintensität der dritten und fünften Harmonischen der Anregungsfrequenz (A_5/A_3 -Verhältnis) gibt Auskunft über die Abflachung des Spektrums der ungeraden Harmonischen und gilt als grobe Abschätzung für die mögliche räumliche Auflösung der MNP im MPI [79]. Je flacher der Abfall des Spektrums ist, desto mehr Informationen stehen zur Bildrekonstruktion zur Verfügung [80]. Das A_5/A_3 -

Verhältnis ist demnach ein wichtiger Messparameter der MNP, mit dem sich Rückschlüsse über die Eignung als MPI-Tracer ziehen lassen. Das A_5/A_3 -Verhältnis beinhaltet zudem Informationen über den funktionellen Zustand von MNP, da es sich durch strukturelle Veränderungen wie der Aggregation und Wechselwirkung mit biologischem Material oder in Abhängigkeit der Temperatur verändert [77, 79, 81].

1.5.2 MPI

Die MPI basiert auf demselben physikalischen Prinzip wie die MPS. Im Gegensatz zur MPS wird jedoch eine Ortskodierung mithilfe von Offsetfeldern und einem feldfreien Punkt (*Field Free Point*: FFP) erzeugt [58]. Das Abfahren des Sichtfeldes mit dem FFP durch zusätzliche dynamische Magnetfelder ermöglicht die Aufnahme des räumlich codierten Signals in wenigen Millisekunden. Mittels einer zuvor durchgeführten Kalibrierungsmessung (Aufzeichnung einer sog. Systemfunktion) können die Messdaten zu einer dreidimensionalen bildlichen Darstellung rekonstruiert werden [80]. Nach Injektion von MNP konnte das schlagende Herz einer Maus mit einer Wiederholungsrate von 46 Bildern pro Sekunde in vivo in 3D dargestellt werden [82].

MNP sind im biologischen Gewebe einzigartig hinsichtlich ihrer superparamagnetischen Eigenschaften. Biologisches Gewebe absorbiert weder Teile des MPI-Signals, noch liefert es selbst einen Beitrag dazu. Zudem trägt das organeigene Eisen nicht zum MPI-Signal bei. Dies ermöglicht die spezifische Darstellung von MNP in biologischen Systemen mit hoher Sensitivität [58, 80, 83].

MPI ist zudem eine quantitative Bildgebungsmethode. Die Signalintensität eines MNP korrespondiert mit der Eisenmasse und ermöglicht die Quantifizierung der Tracer in einem biologischen System. Die Aufnahme und Interaktion von Tracern mit zellulärem Gewebe kann auf diese Weise in biologischen Systemen quantifiziert werden. MPI wurde bereits erfolgreich eingesetzt, um humane mesenchymale Stammzellen mit MNP in Ratten dynamisch zu verfolgen und zu quantifizieren [84]. Eine essentielle Aufgabe für die weitere Entwicklung von MPI stellt die Suche nach potenziellen Tracern mit idealem Signalverhalten dar, um die Auflösung der Bildgebungsmethode weiter zu verbessern.

1.5.3 Verwendung von MNP zur bildgebenden Darstellung atherosklerotischer Plaques

Die Darstellung vulnerabler Plaques mittels nicht-invasiver Bildgebungsverfahren (MRT und MPI), die MNP als molekulare Tracer verwenden, befindet sich in präklinischen und experimentellen Stadien. Die Detektion des sterisch-stabilisierten MNP Sinerem® in Abschnitten arterieller Gefäßwände, die später als atherosklerotische Plaques erkannt wurden, erfolgte zufällig in einer MRT-Studie zur Darstellung von Lymphknotenmetastasen [85]. In weiteren in-vivo-Studien konnte die Anreicherung von Sinerem® in Makrophagen in atherosklerotischen Plaques bestätigt werden [51]. Die Entwicklung von MNP-Konjugaten ermöglichte zudem die spezifische Bindung an Adhäsionsmoleküle (P-Selectin und VCAM-1) des Endothels und *Scavenger*-Rezeptoren von Schaumzellen in atherosklerotischen Plaques [86, 87]. Inflammatorische Prozesse innerhalb der Läsion, die von einer Akkumulation eingewanderter Makrophagen geprägt sind, könnten auf diese Weise detektiert werden und Rückschlüsse auf die Vulnerabilität zulassen.

Citrat-beschichtete MNP wie VSOP weisen vorteilhafte Eigenschaften in der Darstellung atherosklerotischer Läsionen auf. In MRT-Studien konnten im Mausmodell mit zunehmender Progression der Atherosklerose eine gesteigerte Aufnahme von VSOP in atherosklerotische Plaques beobachtet und Plaque-Makrophagen als Targets identifiziert werden [53, 88]. VSOP wurden innerhalb weniger Minuten schnell und effizient von Plaque-Endothelzellen über eine gesteigerte Transzytose-Rate in die Läsionen aufgenommen, sodass zusätzlich eine erhöhte endotheliale Permeabilität als pathologischer Marker im MRT beobachtet werden konnte [89, 90].

In-vitro-Untersuchungen zeigten eine hohe Bindungsaffinität von VSOP zu GAGs von THP-1 Monozyten [91]. Eine Akkumulation von VSOP in GAG-reichen Mikrovesikeln innerhalb atherosklerotischer Plaques eine Stunde nach intravenöser Applikation konnte in atherosklerotischen Kaninchen beobachtet werden [53, 54]. Mittels koronarer MR-Angiographie wurden VSOP auch zur Detektion von koronaren Stenosen eingesetzt [56]. In-vitro-Daten zeigten zudem eine Zellaufnahme von VSOP in Abhängigkeit der vorangegangenen Kultivierung, die in Endothelzellen unter gestörten Flussbedingungen deutlich höher war als in Zellen, welche zuvor unter laminarem Fluss kultiviert wurden [89, 90].

Eine strukturelle Veränderung der GCX durch gestörte Flussbedingungen könnte ein potenzielles Ziel von MNP wie VSOP darstellen, um atherosklerotische Läsionen, die an diesen prädisponierten Stellen auftreten, in einer nicht-invasiven Bildgebung zu detektieren. Im Hinblick auf die Darstellung atherosklerotischer Läsionen mittels MPI steht die Suche nach einem MPI-Tracer im Fokus, dessen Verhalten im biologischen System die gezielte Aufnahme in atherosklerotische Läsionen zulässt und gleichzeitig ein ausreichendes Signal im MPI erzeugt. VSOP sind aufgrund ihrer magnetischen Eigenschaften nicht als MPI-Tracer geeignet.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollen MNP im Hinblick auf ihre Eigenschaften nach Zellinteraktion und ihre Eignung als spezifische Tracer für die MPI untersucht und charakterisiert werden.

Die Hypothese, dass Citrat-beschichtete MNP (VSOP) mit extrazellulären Bestandteilen der Zelloberfläche (GAGs der GCX) wechselwirken, soll durch die Visualisierung mittels TEM getestet werden.

Folgende Ziele wurden sich in dieser Arbeit gesetzt:

- Die Etablierung einer geeigneten Fixiertechnik, um die GCX in ihrer hydratisierten Struktur für die histologische Analyse mittels TEM zu erhalten.
- Die Untersuchung der physikochemischen Eigenschaften von Citrat-beschichteten MNP unmittelbar nach Zellkontakt.
- Die Prüfung des elektrostatisch-stabilisierten MNP fluidMAG-CT50 auf seine Eignung als potenziellen MPI-Tracer für die Bildgebung der Atherosklerose.
- Weitere Untersuchungen einer potenziellen Aufnahme sterisch-stabilisierter MNP in Endothelzellen in Abhängigkeit der Kultivierungsbedingungen (statisch vs. laminarer Fluss).
- Die Testung ausgewählter MNP für den Einsatz in der Bildgebung mittels MPI/MRT in Hinblick auf ihre biologische Kompatibilität und eine mögliche Zelltoxizität.

2 Material und Methoden

2.1 Medien und MNP

Medium	Zusammensetzung	Volumen	Hersteller
EC-Vollmedium	MCDB 131 Medium	500 ml	Gibco
	<i>Fetal Calf Serum</i> (FCS)	10 ml	Biochrom
	L-Glutamin 200 mmol/l	5 ml	Gibco
	Penicillin 100 U/ml /	5 ml	Biochrom
	Streptomycin 100 mg/ml		
	EGCS	2 ml	PromoCell
	Hydrocortison 0,5 mg/ml	1 ml	Sigma Aldrich
	Heparin 5000 U/ml /	525 µl	Sigma Aldrich/ Biomol
	EGF 0,1 ng/ml		
bFGF 0,1 µg/µl / PBS	5/245 µl	Biomol/Gibco	
DMEM-Vollmedium	DMEM Medium	500 ml	Gibco
	<i>Fetal Calf Serum</i> (FCS)	50 ml	Biochrom
	Penicillin 100 U/ml /	5 ml	Biochrom
	Streptomycin 100 mg/ml		
RPMI-Vollmedium	RPMI 1640 Medium	500 ml	Gibco
	<i>Fetal Calf Serum</i> (FCS)	50 ml	Biochrom
	Penicillin 100 U/ml /	5 ml	Biochrom
	Streptomycin 100 mg/ml		

MNP	Hydrodynamischer Durchmesser	Beschichtung	Hersteller
VSOP (RH-170712)	9-11 nm	Citrat	Radiologie Charité
fluidMAG-CT50	50 nm	Citrat	Chemicell
fluidMAG-DXS50	50 nm	Dextransulfat	Chemicell
fluidMAG-Q50	50 nm	Polydiallyldimethylamin	Chemicell
fluidMAG-DEAE50	50 nm	Diethylaminethylstärke	Chemicell
Resovist	50-100 nm	Carboxydextran	Bayer

2.2 Zellkulturen

Material/Geräte	Hersteller
75-cm ² -Zellkulturflasche	Falcon
Brutschrank (CO ₂ -Inkubator)	Sanyo
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	Hirschmann
Kollagenase IV	Sigma Aldrich
PBS (<i>Dulbeccos' Phosphate Buffered Saline</i>)	Gibco
Trypsin-EDTA	Gibco

2.2.1 EA.hy926

Die immortalisierte Hybrid-Zelllinie ist durch die Fusion aus adhärennten *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (HUVEC) und der permanenten humanen Lungenkarzinomzelllinie A549 entstanden [92]. Die Zellen wurden von Cora-Jean S. Edgell von der *University of North Carolina* bereitgestellt. Die EA.hy926 Zellen wurden in 75-cm²-Kulturflaschen bei 37°C mit 5 % CO₂ in feuchter Atmosphäre inkubiert. Die Hybridzellen erhielten 20 ml DMEM-Vollmedium pro Flasche, ein Wechsel erfolgte alle 3-5 Tage. Bei Konfluenz wurden die Zellen mit PBS (10 ml) gespült und anschließend mit 2 ml Trypsin von der Oberfläche der Kulturflasche gelöst. Nach erneuter Zugabe von Medium wurden die Zellen im Verhältnis von 1:5 ausgesät.

2.2.2 HUVEC

Humane Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVEC) wurden durch das Enzym Kollagenase IV aus Nabelschnüren unbekannter Spender gelöst, eingefroren und bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert. Für die Flussversuche wurden die Endothelzellen aufgetaut und in einer 75-cm²-Kulturflasche mit 37°C warmem EC-Vollmedium ausgesät. Nach einem Zeitraum von 2-4 h, in dem sich die Zellen angeheftet hatten, wurde das Medium gewechselt, um das toxische Einfriermedium DMSO vollständig zu entfernen. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C mit 5 % CO₂ in feuchter Atmosphäre im Brutschrank, ein Mediumwechsel fand alle 2-3 Tage statt. Bei Konfluenz wurden die Zellen im Verhältnis von 1:3 erneut ausgesät. Die Präparation von HUVEC aus Nabelschnurvenen wurde freundlicherweise von Angelika Vietze aus dem Center for Cardiovascular Research (CCR), Campus Charité Mitte, durchgeführt.

2.2.3 THP-1 Monozyten

THP-1 Monozyten sind humane Tumorzellen, die aus einem Patienten mit akuter monozytärer Leukämie isoliert wurden [93]. Die Zellen wurden kommerziell von ATCC[®] erworben. Die Kultivierung erfolgte in einer 75-cm²-Zellkulturflasche in RPMI-Vollmedium im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂). Ein Wechsel des Mediums fand alle 2-3 Tage statt. Nach Erreichen einer Dichte von 5 x 10⁵ Zellen/ml wurden die Suspensionszellen mit neuem Medium in einem Verhältnis von 1:3 passagiert.

2.3 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Material/Geräte	Hersteller
300er-Nickelgrids	Plano
Diamantmesser	Diatome
EM AFS (<i>Freeze Substitution Unit</i>)	Leica
EM ICE (<i>High Pressure Freezer</i>)	Leica
EM Zeiss 912 (Transmissionselektronenmikroskop)	Carl Zeiss
Epoxy-Kleber	Uhu
<i>Flat Specimen 3 and 6 mm System Kit</i>	Leica
Gelatine (0,2 %)	Sigma Aldrich
Heizplatte MR 3001	Heidolph
2-Hydroxypropylmethacrylamid (HPMA)	Sigma Aldrich
Phasenkontrastmikroskop (DM IL)	Leica
<i>Sapphire Discs</i> (6 x 0.10 mm)	Wohwend
Sekundenkleber	Uhu
Sterilbank (Clean Air)	Haan
<i>Sticky-Slides I</i> ^{0.8} Luer	Ibidi
Ultramikrotom (Ultracut)	Leica
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf
Zentrifugenröhrchen (1,5 ml)	Falcon

2.3.1 Inkubation mit MNP

Die Inkubation der THP-1 Monozyten erfolgte mit VSOP ($c(\text{Fe}) = 1 \text{ mmol/l}$) für unterschiedliche Zeiten (3 min, 30 min, 180 min) in RPMI-Vollmedium. Anschließend wurde 1 ml der Suspension mit 10^6 Zellen in einem Zentrifugenröhrchen bei 1000 rpm für 3 min zentrifugiert und das überständige Medium entfernt. Das Zellpellet wurde in 10-20 μl Medium resuspendiert und die entstandene Zellsuspension für die Kryofixierung verwendet.

2.3.2 Chemische Fixierung (Glutaraldehyd/Lanthannitrat/Alcian Blau)

Lösung/Chemikalien	Zusammensetzung	Konzentration	Hersteller
Aceton		30 %, 60 %, 100 %	Sigma Aldrich
Fixierlösung 1	Glutaraldehyd	2 %	Sigma Aldrich
	Paraformaldehyd	4 %	Carl Roth
	MgCl_2	30 mmol/l	Carl Roth
Färbelösung	Glutaraldehyd	2 %	Sigma Aldrich
	Paraformaldehyd	4 %	Carl Roth
	MgCl_2	30 mmol/l	Carl Roth
	Alcian Blau	0,05 %	Carl Roth

Lösung/Chemikalien	Zusammensetzung	Konzentration	Hersteller
Fixierlösung 2	Osmiumtetroxid	1 %	Sigma Aldrich
	Lanthannitrat	1 %	Sigma Aldrich
Epoxy- Einbettungsmedium	Epon 812	10,7 g	Sigma Aldrich
	DDSA	7,8 g	Sigma Aldrich
	MNA	6,5 g	Sigma Aldrich
	DMP-30	0,5 g	Sigma Aldrich
Osmium-Aceton- Lösung	Osmiumtetroxid	1 %	Sigma Aldrich

EA.hy926 Zellen wurden in *Sticky-Slides* ausgesät und bis zu voller Konfluenz unter statischen Bedingungen kultiviert. Nach Spülung der *Slides* mit PBS erfolgte die Füllung mit Fixierlösung 1 für 10 min. In diesem Schritt polymerisierten Glutaraldehyd und Paraformaldehyd und fixierten über die Verkettung von Proteinen die Zellstruktur. Es folgte die Befüllung mit der Färbelösung bis zur vollständigen Verdrängung der Fixierlösung 1 für 30 min. Das nun zusätzlich enthaltene Alcian Blau sorgte für eine Stabilisierung sulfatierter GAGs. Danach wurden die *Slides* mit H₂O_{bideest.} gespült und mit der Fixierlösung 2 für 60 min befüllt. Das gelöste Osmiumtetroxid und Lanthannitrat dienten zur Kontrastverstärkung in der TEM.

Die Fixierlösung 2 wurde mit Aceton (30 %) verdrängt und für 10 min fixiert. Es folgte die Fixierung mit Aceton (60 %) für 10 min. Für die vollständige Dehydrierung wurde unverdünntes Aceton 3-mal für jeweils 10 min hineingefüllt. Das Anrühren des Epoxy-Mediums erfolgte nach Herstellerangaben (Sigma Aldrich). Es wurden vorsichtig kleine Stücke aus den Flusskanälen herausgetrennt und in einem 1:1 Aceton/Epoxy-Gemisch für 30 min deponiert. Nach Befüllen von Zentrifugenröhrchen-Deckeln mit einem 1:2-Epoxy-Gemisch, wurden die ausgeschnittenen Stücke auf die Deckel platziert, sodass die Zelloberseite eingebettet war. Die Polymerisierung erfolgte über Nacht bei 60°C in einem Ofen.

2.3.3 Kryofixierung (Hochdruckeinfrierung/Gefriersubstitution)

Die Kryofixierung bestehend aus der Hochdruckeinfrierung und anschließender Gefriersubstitution (*High Pressure Freezing: HPFI/Freeze Substitution: FS*) wurde verwendet, um hydratisierte Strukturen der GCX zu erhalten. Bei diesem Verfahren werden Proben mit flüssigem Stickstoff (-196°C) unter extrem hohem Druck (2100 bar) ohne Bildung von Eiskristallen blitzschnell eingefroren. In anschließender

Gefriersubstitution werden die Proben langsam auf Raumtemperatur erwärmt und gleichzeitig mit einer Osmium-Aceton-Lösung entwässert.

2.3.3.1 Fixierung von EA.hy926 Zellen

Die Endothelzellen wurden auf zuvor mit Gelatine (0,2 %) beschichtete *Sapphire Discs* in einer 12-Well-Platte ausgesät. Nach konfluentem Wachstum auf den *Discs* erfolgte die Fixierung der Zellen. Die *Discs* wurden im Probenhalter des *High Pressure Freezer* zwischen zwei Spacerringen und einem zusätzlichen *Sapphire Disc* in der Mittelplatte platziert. Nach Platzierung der Mittelplatte zwischen unterer und oberer Halbzylinder-Platte wurde die Hochdruckeinfrierung gestartet. Die Proben wurden aus flüssigem Stickstoff in Kryogefäße überführt, die zuvor mit 1 ml Osmium-Aceton-Lösung befüllt und in der *Freeze Substitution Unit* platziert worden waren. Nach Lagerung bei -90°C für 12-14 h wurde die Temperatur langsam (5°C/1 h) bis 20°C erhöht und für 2-3 h bei Raumtemperatur belassen. Durch langsame Dehydrierung wurden extrazelluläre Strukturen stabilisiert und der Kontrast mit Osmiumtetroxid für die TEM verstärkt.

2.3.3.2 Fixierung von THP-1 Monozyten

Die hochkonzentrierte Zellsuspension aus 2.3.1 wurde in einen *Copper Gold-plated Specimen-Carrier* (3 mm Durchmesser, 200 µm Tiefe) pipettiert, der durch einen weiteren *Specimen-Carrier* verschlossen und darauf in der Mittelplatte platziert wurde. Nach Zusammenfügen des Zylinders im Probenhalter wurde die Hochdruckeinfrierung gestartet. Die Gefriersubstitution erfolgte analog zur Entwässerung von EA.hy926 Zellen in 2.3.3.1.

Die THP-1 Zellen wurden aus dem Carrier entfernt, zentrifugiert (1000 rpm, 3 min), in Aceton gewaschen und wieder gleichermaßen zentrifugiert. Nach erneutem vielfachem Waschen mit Aceton wurden die Proben in ein Zentrifugenröhrchen mit HPMA überführt, bei 3000 rpm für 5 min zentrifugiert und über Nacht in einem HPMA-Epoxy-Medium-Gemisch (1:1) inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (3000 rpm, 5 min) wurden die Zellen in frisch angesetztes Epoxy-Medium für mehrere Stunden eingebettet. Die Polymerisierung erfolgte über Nacht bei 60°C im Ofen.

Die komplette Kryofixierung und Einbettung der Proben wurde in Kooperation mit Dr. Agnieszka Münster-Wandowski aus dem Institut für Integrative Neuroanatomie, Campus Charité Mitte (CCM), durchgeführt.

2.3.4 Anfertigung von Ultradünnschnitten und TEM

Die ausgehärteten Epoxy-Blöcke wurden aus den Zentrifugenröhrchen entfernt und mit Rasierklingen auf einer 150°C warmen Heizplatte in kleinere Blöcke geschnitten, die nur noch die Zellen enthielten. Diese Blöcke wurden mit Sekundenkleber auf kleine Plexiglasblöcke geklebt, mit Epoxy-Kleber am Rand verleimt und waren nach 12 h Aushärtung endgültig fixiert. Ultradünne Schnitte (60-100 nm) wurden in einem Ultramikrotom mit einem Diamantmesser angefertigt. Die Schnitte wurden auf Nickelgrids platziert und mittels TEM ausgewertet.

2.4 MPS-Messung

Material/Geräte	Hersteller
96-Well-Platte	Falcon
Magnet-Partikel-Spektrometer (MPS)	Bruker
PBS (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)	Gibco
PCR-Tube	Applied Biosystems
Rotilabo-FEP-Schlauch	Carl Roth
TD-NMR Glasröhre (7,5 mm)	Bruker
Zentrifuge (mini Spin plus)	Eppendorf
Zentrifugenröhrchen (1,5 ml)	Eppendorf

2.4.1 Kontinuierliche MPS-Messung

Im MPS-Spektrum werden sowohl zellgebundene als auch freie MNP erfasst. Das A_5/A_3 -Verhältnis spiegelt demzufolge die Superposition beider funktioneller MNP-Zustände wider. Um vor allem den Anteil zellgebundener Partikel in der Messung zu erfassen und den Anteil freier Partikel in der Suspension zu verringern, wurde innerhalb der Zell-Partikel-Suspension eine Gesamteisenkonzentration von 0,5 mmol/l gewählt. Das MPS-Signal wurde gemittelt, um das Verhältnis von Signal zu Hintergrundrauschen zu verbessern, sodass insgesamt eine zeitliche Auflösung von 4 s erreicht wurde. Nach einer Zeit von 155 s wurden die Messintervalle erhöht, um die Messunsicherheit der einzelnen Messungen zu verringern.

In einer nicht kontinuierlichen Messreihe wurde zunächst das A_5/A_3 -Verhältnis von zellgebundenen VSOP bestimmt. 5×10^6 THP-1 Zellen wurden für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 750 μ l PBS aufgenommen. Es erfolgte die Zugabe von VSOP ($c(\text{Fe}) = 0,5 \text{ mmol/l}$). Daraufhin wurden drei Ansätze mit je 150 μ l und 10^6 Zellen in PCR-Tubes pipettiert und im Brutschrank inkubiert. Nach 300 s, 600 s, 900 s

wurden die Proben jeweils für 90 s bei 5000 rpm zentrifugiert. Um ausschließlich gebundene MNP zu analysieren, wurde der Überstand verworfen. Die MPS-Messung erfolgte bei Anregungsamplituden von $\hat{B} = 25$ mT.

Für jeden Ansatz der kontinuierlichen Messreihe wurden 10^6 THP-1 Zellen verwendet. Nach kurzer Zentrifugation (1 min) wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 100 μ l vorgewärmtes PBS (37°C) aufgenommen, die Suspension in ein Glasröhrchen pipettiert und in der MPS-Messkammer platziert. Nach Start der MPS-Messung wurden VSOP (Endkonzentration: $c(\text{Fe}) = 0,5$ mmol/l) in 100 μ l PBS über ein Schlauchsystem in das Glasröhrchen injiziert (Abbildung 3). Durch kurzes Resuspendieren wurden die Lösungen vermischt. Die MPS-Messung erfolgte kontinuierlich im Sekundenabstand (4-30 s) für 884 s bei Anregungsamplituden von $\hat{B} = 25$ mT. Die MNP wurden in PBS gelöst und die Monozyten in PBS suspendiert, um einen potenziellen Einfluss der Biomoleküle im Zellkulturmedium auf die Zell-MNP-Interaktion zu verringern. Als Kontrolle erfolgte die kontinuierliche Messung von VSOP in PBS ($c(\text{Fe}) = 0,6$ mmol/l).

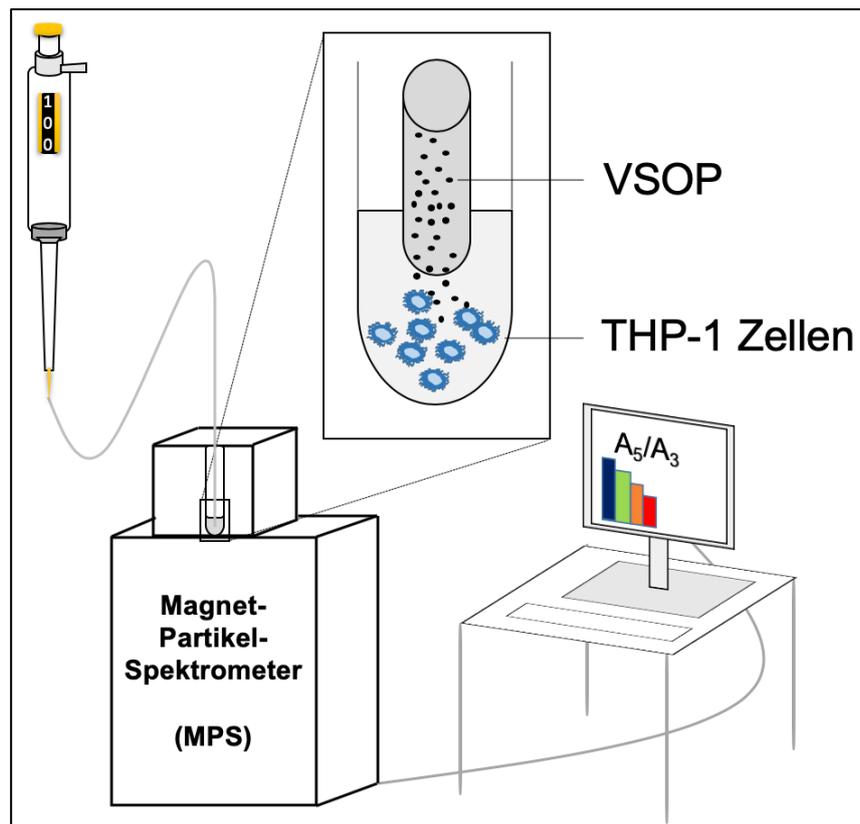


Abbildung 3: **Schematische Darstellung der kontinuierlichen MPS-Messung.** VSOP werden über einen Schlauch direkt zu den THP-1 Monozyten in das Glasröhrchen pipettiert, welches sich in der Messkammer des Magnet-Partikel-Spektrometers befindet. Die MPS-Messung erfolgt dabei kontinuierlich im Abstand von 4-30 s bei Anregungsamplituden von $\hat{B} = 25$ mT.

2.4.2 MPS-Quantifizierung

Um die zelluläre Aufnahme von fluidMAG-CT50 zu untersuchen, wurden $2,5 \times 10^5$ EA.hy926 Zellen über Nacht in ein 6-Well ausgesät und zwei 6-Well für eine Probe verwendet. Die Zellen wurden für 1 h mit fluidMAG-CT50 ($c(\text{Fe}) = 0,5 \text{ mmol/l}$) beladen (pro Well 1,5 ml) und für angegebene Zeiten inkubiert (1 h, 3 h, 6 h, 24 h). Nach 1 h wurde das Medium entfernt, die Zellen 2-mal mit PBS gewaschen und neues DMEM-Vollmedium ohne MNP hinzugefügt. Nach erfolgter Inkubation wurden die Endothelzellen mit PBS gewaschen, trypsinisiert, in Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (5000 rpm, 90 s). Nach Absaugen des Überstandes und erneutem Waschen wurde die Zellsuspension in *PCR-Tubes* transferiert und auf gleiche Weise zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals verworfen, die Proben bei 4°C im Kühlschrank deponiert.

Die zelluläre Aufnahme von elektrostatisch- und sterisch-stabilisierten MNP wurde untersucht, indem 6×10^5 EA.hy926 Zellen für 3 h mit VSOP, fluidMAG-CT50, fluidMAG-DXS50, fluidMAG-Q50 oder fluidMAG-DEAE50 ($c(\text{Fe}) = 0,5 \text{ mmol/l}$) inkubiert wurden, die zuvor in 1,5 ml DMEM (ohne Zusätze) gelöst wurden. Nach 3 h wurde das Medium entfernt, die Zellen 2-mal mit PBS gewaschen, trypsinisiert, in Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (5000 rpm, 90 s). Die Anfertigung und Lagerung der Proben erfolgten wie im vorangegangenen Absatz beschrieben.

Mithilfe einer Referenzmessung konnte die zellassozierte $m(\text{Fe})$ quantifiziert werden. In der Referenzmessung wurde die dritte Harmonische der Anregungsfrequenz (A_3) pro g Fe bei Anregungsamplituden von $\hat{B} = 25 \text{ mT}$ und 37°C bestimmt. Mittels einer Kalibrierfunktion wurden die Veränderungen der magnetischen Eigenschaften der MNP nach Zellkontakt bei der Quantifizierung berücksichtigt [94].

Alle MPS-Messungen wurden von Dr.-Ing. Norbert Löwa in der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt (PTB) durchgeführt.

2.5 FluidMAG-CT50-markierte Zellspots im MPI

Material/Geräte	Hersteller
3D-Drucker	EnvisionTEC
Agarose (<i>low melting</i> – 35°C)	Sigma Aldrich
MPI-Scanner	Bruker
<i>PCR-Tube</i>	Applied Biosystems
Zentrifuge (mini Spin plus)	Eppendorf
Zentrifugenröhrchen (1,5 ml)	Eppendorf

2.5.1 FluidMAG-CT50-markierte Zellspots in *PCR-Tubes*

In diesem Versuch sollte die Darstellung von fluidMAG-CT50-markierten Endothelzellen und die Quantifizierung der zellassoziierten $m(\text{Fe})$ mittels MPI getestet werden. Dazu wurden 3×10^5 EA.hy926 Zellen pro Well über Nacht in Six-Wells ausgesät. Es folgte die Inkubation der Zellen mit fluidMAG-CT50 ($c(\text{Fe}) = 0,5 \text{ mmol/l}$) für 24 h (gelöst in 1,5 ml DMEM-Medium). Die Zellen wurden 2-mal mit PBS gewaschen, trypsiniert, in DMEM-Vollmedium aufgenommen und bei 3000 rpm für 90 s zentrifugiert. Das Pellet wurde erneut in PBS aufgenommen und eine Zellsuspension von 10^6 Zellen/ml für die Verdünnungsreihe angesetzt. Folgende Verdünnungsreihe (500000, 250000, 125000, 60000, 30000, 15000, 7500, 3000, 1500, 500, 300 Zellen) wurde in *PCR-Tubes* pipettiert. Die *PCR-Tubes* wurden erneut bei 5000 rpm für 3 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Proben (Zellspots) bei 4°C deponiert.

Die Proben wurden im MPI-Scanner vermessen. Die MPI-Messung erfolgte bei Anregungsamplituden von $\hat{B} = 12 \text{ mT}$ in allen Raumachsen und einem Feldgradienten von 1,25/1,25/2,5 T/m (in x/y/z-Richtung). Mit Hilfe einer Kalibrierungsmessung einer entsprechenden Referenzprobe wurde eine Systemfunktion aufgezeichnet, die eine bildliche Rekonstruktion der Zellspots ermöglichte. Für jede bildliche Rekonstruktion wurden die Daten einer Messzeit von 2 s gemittelt (*Field of View* (FOV) von $28 \times 28 \times 14 \text{ mm}^3$) und die gleichen Rekonstruktionsparameter verwendet. Die $m(\text{Fe})$ einer Probe wurde anhand der aufsummierten Signalintensität innerhalb des gesamten FOV quantifiziert.

2.5.2 FluidMAG-CT50-markierte Zellspots im Modell eines Gefäßquerschnitts

In diesem Versuch sollten die mögliche Darstellung und Differenzierung atherosklerotischer Plaques im MPI-Scanner modellhaft untersucht werden. Für die künstliche Darstellung eines Gefäßquerschnitts wurden in Abbildung 4 gezeigte Phantome mit einem 3D-Drucker erstellt. Um eine Ansammlung von MNP in atherosklerotischen Plaques zu simulieren, wurden kleine Agaroseblöckchen aus fluidMAG-CT50-beladenen THP-1 Monozyten angefertigt.

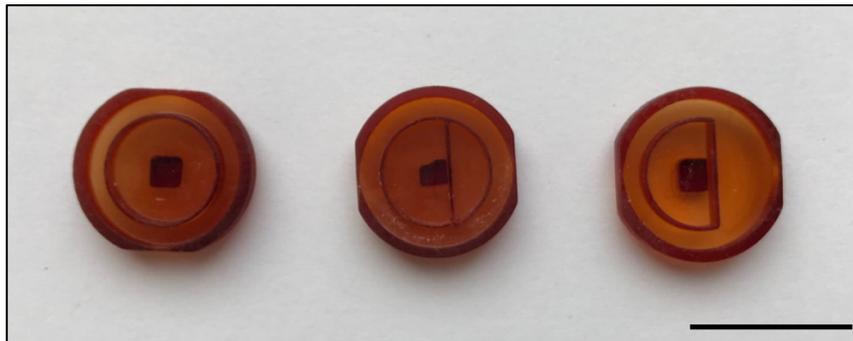


Abbildung 4: **Phantome eines Gefäßquerschnitts.** Die Phantome stellen einen künstlichen Querschnitt großer arterieller Gefäße mit oder ohne Stenose dar (Höhe: 2 mm, $D_{\text{außen}}$: 15 mm, D_{innen} : 10 mm). Maßstabsbalken: 15 mm

THP-1 Zellen mit einer Konzentration von $10^6/\text{ml}$ wurden für 24 h in RPMI-Medium mit fluidMAG-CT50 ($c(\text{Fe}) = 1 \text{ mmol/l}$) inkubiert. Nach Anfertigung eines Zellpellets wurde die Probe in 1,5%ige-*low-melting*-Agarose aufgenommen und resuspendiert. Mit einer 200- μl -Spitze wurden achtsam Tropfen der Agarose-Zell-MNP-Suspension auf ein Stück Paraffin pipettiert und bei 4°C belassen bis die Tropfen fest waren. Die Gefäßmodelle wurden mit flüssiger Agarose befüllt und die fest gewordenen Agaroseblöckchen vorsichtig zwischen innerem und äußerem Kreis der Gefäßmodelle platziert. Die Phantome wurden bei feuchter Atmosphäre im Kühlschrank gelagert, um das Austrocknen und Zusammenziehen der Agarose zu verhindern. Die Vermessung der Proben erfolgte bei Anregungsamplituden von $\hat{B} = 12 \text{ mT}$ im MPI-Scanner. Aus den Messdaten wurden bildliche Darstellungen der Zellspots mittels einer Systemfunktion rekonstruiert.

Alle MPI-Messungen und bildlichen Rekonstruktionen wurden von Hendrik Paysen aus der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt (PTB) durchgeführt. Die Herstellung der Phantome im 3D-Drucker erfolgte ebenfalls durch Mitarbeiter der PTB.

2.6 Bestimmung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Prüfung der Zellviabilität

2.6.1 DCF-Test

Material/Geräte	Hersteller
6-Well-Platte	Falcon
CyAN-ADP Durchflusszytometer	Beckman Coulter
Durchflusszytometer-Röhrchen	Falcon
H ₂ DCFDA	Promo Kine
Zentrifuge (Labofuge 400 R)	Heraeus Instruments

Um einen möglichen Anstieg von oxidativem Stress nach Aufnahme von MNP in Zellen zu untersuchen, wurde ein DCF-Assay verwendet. H₂DCFDA wird als zellgängiger Stoff aufgenommen, von intrazellulären Esterasen deacetyliert und als nicht fluoreszierender Stoff in der Zelle festgehalten. In Anwesenheit von radikalischen Sauerstoffspezies (ROS) wird H₂DCFDA oxidiert und zu fluoreszierendem DCF umgewandelt. DCF ist ein sensitiver, aber unspezifischer Indikator für oxidativen Stress [95, 96].

Der DCF-Test wurde in den Zelllinien HUVEC und EA.hy926 durchgeführt. Über Nacht wurden pro Well 2 x 10⁵ Zellen in eine 6-Well-Platte ausgesät. Es folgte die Beladung mit VSOP oder fluidMAG-CT50 (c(Fe) = 0,5 mmol/l) für 1 h und die Inkubation für angegebene Zeiten (1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 24 h, 48 h). Die MNP wurden zuvor in EC-Vollmedium (HUVEC) oder in DMEM ohne Zusätze (EA.hy926) gelöst und pro Well 1,5 ml auf die Zellen gegeben. Zwischen Beladung und restlicher Inkubationszeit wurden die Zellen 1-mal mit PBS gewaschen und das Medium durch neues (HUVEC: EC-Vollmedium, EA.hy926: DMEM-Vollmedium) ohne MNP ersetzt. Nach beschriebenen Inkubationszeiten wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und mit 5 µg/ml H₂DCFDA in EC-Vollmedium oder DMEM ohne FCS für 30 min im Brutschrank inkubiert. Für jeden Zeitpunkt diente eine Zellprobe ohne MNP als Kontrolle. Anschließend wurden die Zellen 2-mal mit PBS gewaschen, trypsiniert und bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Pellet aus 1-2 Wells wurde in einem Durchflusszytometer-Röhrchen in 0,5-1 ml PBS resuspendiert. Die Proben wurden anschließend in einem CyAN-ADP Durchflusszytometer analysiert und mit der Summit Software ausgewertet.

2.6.2 Western Blot

Material/Geräte	Hersteller
10-cm-Schale	Falcon
96-Well-Platte	Falcon
Amidoschwarz (2X)	Sigma Aldrich
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva
Absorptionsspektrometer (Spectramax 340 PC)	Molecular Devices
<i>BCA Protein Assay Reagent Kit</i>	Pierce
Blotkammer	Peqlab Biotechnologies
BSA-Standardlösung	Pierce
Centrifuge 5415 R	Eppendorf
<i>Chemiluminescence Kit Complete</i>	Thermo Scientific
Elektrophoresekammer TV100	Roche
Fusion Solo Vilber Lourmat	Carl Roth
Marker (<i>Page Ruler</i>)	Vilber
Methanol	Thermo Fisher Scientific
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma Aldrich
<i>Pierce ECL 2 Western Blotting Substrate</i>	Merck
Rotiphorese Gel 40 (29:1)	Thermo Fisher Scientific
Taumelschüttler 3011	Carl Roth
Thermomixer 5436	GFL
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Eppendorf
Trypsin EDTA	Carl Roth
Tween 20	Gibco
Vortexer REAX 2000	Sigma Aldrich
Wärmeschrank (HB-1000 Hybridizer)	Heidolph
Whatman-Papier	Heraeus Instruments
Zentrifugenröhrchen (1,5 ml)	Sigma Aldrich
	Falcon

Lösungen	Zusammensetzung	Konzentration/Menge	Hersteller
RIPA-Puffer	NaCl	150 mM	Merck
	NP 40	1 %	Thermo Scientific
	Natriumdesoxycholat	0,5 %	Roth
	SDS	0,1 %	Merck
	Tris-HCL pH 7,5	50 mM	Carl Roth
	H ₂ O _{bidest.}	Ad 1 l	
TBS-T	Tris-Base	30 g	Carl Roth
Waschpuffer	NaCl	80 g	Merck
	KCl	2 g	Merck
	H ₂ O _{bidest.}	Ad 1 l	
	Tween 20	0,1 %	Sigma Aldrich
SDS-Laufpuffer (10:1)	Tris-Base	30,3 g	Carl Roth
	Glycin	144 g	Carl Roth
	SDS	10 g	Merck
	H ₂ O _{bidest.}	Ad 1 l	

Lösungen	Zusammensetzung	Konzentration/Menge	Hersteller
5x Probenpuffer	1 M Tris pH 6,8	655 µl	Carl Roth
	Glycerol (99 %)	2 ml	Merck
	β-Mercaptoethanol	500 µl	Sigma Aldrich
	10 % SDS	2,3 ml	Merck
	Bromphenolblau	10 mg	Sigma Aldrich
	H ₂ O _{bidest.}	10 ml	
Blotpuffer	Tris-Base	5,82 g/l	Carl Roth
	Glycin	2,93 g/l	Carl Roth
	Methanol	20 %	Sigma Aldrich
Block-Lösung	10x Roti Block	10 %	Carl Roth
	H ₂ O _{bidest.}	50 ml	
Entfärber-Lösung	Isopropanol	25 %	Baker
	Essigsäure	10 %	Sigma Aldrich

2.6.2.1 Inkubation mit MNP und Proteinisolierung

Für die Untersuchung des Eisenstoffwechsels wurden HUVEC und EA.hy926 verwendet. Die Hälfte der Zellen einer vollständig konfluenten 75-cm²-Zellkulturflasche wurde über Nacht in eine 10-cm-Schale ausgesät. Es folgte die Beladung der Zellen für 1 h mit VSOP oder fluidMAG-CT50 ($c(\text{Fe}) = 0,5 \text{ mmol/l}$) und die Inkubation für 3 h, 6 h, 24 h, 48h. Die MNP wurden in EC-Vollmedium (HUVEC) oder in DMEM ohne Zusätze (EA.hy926) gelöst. 7 ml der MNP-Lösung wurden für eine 10-cm-Schale verwendet. Nach 1 h Beladung der Zellen wurde das Medium entfernt, die Schale mit PBS gewaschen und durch neues Medium (HUVEC: EC-Vollmedium, EA.hy926: DMEM-Vollmedium) ersetzt. Nach oben genannten Inkubationszeiten wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen, trypsinisiert und bei 5000 rpm für 5 min zentrifugiert. Deponierung der Zellpellets erfolgte bei -80°C.

Zellpellets wurden in 100 µl RIPA-Puffer + 4 µl *Complete* resuspendiert und für 10 min auf Eis lysiert. Danach wurden die Zelllysate für 15 min bei 13200 rpm und 4°C zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde entnommen und in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.6.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Messung der Proteinkonzentration wurde der Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay) verwendet. Der Assay beruht auf der Reduktion von Cu²⁺- zu Cu⁺-Ionen in alkalischem Milieu. Die Reaktion von Cu⁺ mit Bicinchoninsäure führt zur Bildung eines

violetten Farbkomplexes [97]. Die Farbintensität ist dabei proportional zur Proteinkonzentration.

Aus jeder Probe wurden 3 µl zu 27 µl H₂O_{bidest.} pipettiert. Jeweils 10 µl wurden in zwei Wells einer 96-Well-Platte gegeben, um Doppelwerte zu bestimmen. Als Standard wurde bovines Serumalbumin (BSA) in einer Konzentrationsreihe von 0,1-1,0 µg/µl verwendet. Als Blank dienten zwei Wells mit H₂O_{bidest.} Die Wells wurden mit 200 µl Reaktionssubstanz aus Reagenz A (Bicinchoninsäure) und Reagenz B (Kupfersulfat) aufgefüllt. Nach 30 min Inkubation im Wärmeschrank bei 37°C erfolgte die Messung in einem Absorptionsspektrometer bei 562 nm. Die Proteinkonzentration wurde anhand der erstellten Standardkurve bestimmt.

2.6.2.3 Gelzusammensetzung

Für die Gelelektrophorese wurden Polyacrylamidgele verwendet. Das Gel wird durch Polymerisation von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid im Verhältnis 29:1 hergestellt. Durch Quervernetzung der Acrylamidketten entsteht ein Gel aus engmaschigen Poren. Für den Nachweis von Ferritin (Leichte Kette: 19 kDa, Schwere Kette: 21 kDa) wurde ein 12%-Gel verwendet. Für vier Gele wurde folgende Zusammensetzung gewählt:

Bestandteil	Sammelgel	12%-Trenngel
H ₂ O _{bidest.}	7,3 ml	10,74 ml
1,5 M Tris Base (pH 8,8)	-	6,24 ml
1 M Tris Base (pH 6,8)	1,25 ml	-
Acrylamid, N,N'-Methylenbisacrylamid (29:1) 40 %	1,25 ml	7,5 ml
SDS 10 %	125 µl	250 µl
APS 10 %	100 µl	200 µl
TEMED	9 µl	18 µl

2.6.2.4 Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Es wurden 20 µg Protein mit 5 µl 5X-Lämmli-Puffer gemischt. Die Proben wurden für 10 min bei 95°C erhitzt und danach kurz zentrifugiert. 5 µl Proteinmarker und 20 µg Protein wurden in die Taschen des Gels pipettiert. Bei einer Stromstärke von 10 mA/Gel liefen die Proben für 15 min ein, danach wurden die Proben bei 15 mA/Gel für 60-80 min aufgetrennt (max. 20 W, 180 V).

2.6.2.5 Übertragung

In einer Blotkammer wurden die aufgetrennten Proteine aus dem Gel durch Anlegung einer Spannung auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Transfer funktioniert über die Wanderung der negativ geladenen Proteine in Richtung der bodenseitigen Anode. Dazu wurden 8 Whatman-Papiere pro Gel für 10 min in Blotpuffer inkubiert. Die PVDF-Membran wurde für 1 min in Methanol aktiviert, anschließend für 5 min in H₂O_{bidest.} gewaschen und folglich für 5-10 min in Blotpuffer inkubiert. Das Gel wurde vorsichtig und luftblasenfrei zwischen jeweils 4 Whatman-Papiere auf die Membran gesetzt und für 60-90 min bei 250 mA geblottet.

2.6.2.6 Antikörperbindung, Immundetektion und Ladekontrolle

Die Membran wurde für 1-2 h bei Raumtemperatur in Blockpuffer langsam geschwenkt, um freie Bindungsstellen auf der Membran mit nicht erkennbaren Molekülen aus dem Blockpuffer zu besetzen und unspezifische Antikörperbindung zu verhindern. Darauf wurde die Membran langsam schwenkend mit dem 1. AK in 10 ml Roti-Block über Nacht inkubiert.

Antikörper	Hersteller	Dilution
1. AK: Ferritin Monoklonaler AK (<i>Rabbit</i>)	Abcam	1:1000
2. AK: anti-Rabbit IgG <i>Goat</i> (200 µg/0,5 ml)	Santa Cruz	1:10000

Die Membran wurde in TBST-Waschpuffer 3-mal für 15 min gewaschen und für 1-2 h mit dem 2. AK in 10 ml Roti-Block langsam geschwenkt und erneut 3-mal für 15 min mit TBST-Waschpuffer gewaschen.

Für die Immundetektion wurden 2 ml ECL-Substrat auf die Membran pipettiert und für 5 min in einer dunklen Box inkubiert. Das Chemilumineszenz-Substrat wurde durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase umgesetzt und die Chemilumineszenz mit einem Fusion Solo Vilber Lourmat detektiert.

Die Amidoschwarzfärbung wurde angewandt, um aufgetragene Proteinmengen auf ihre Gleichmäßigkeit zu prüfen. Durch unspezifische Bindung an Proteine werden alle Banden auf der Membran visualisiert. Die Membran wurde dazu für 1 h mit Amidoschwarz langsam schwenkend gefärbt und anschließend in einer Entfärber-Lösung für 15 min inkubiert.

2.6.3 MTT-Assay

Material/Geräte	Hersteller
96-Well-Platte	Falcon
Absorptionsspektrometer (Spectramax 340 PC)	Molecular Devices
Isopropanol	Baker
MTT	Sigma Aldrich

Der MTT-Test wird zur Überprüfung der metabolischen Aktivität als Maß für die Viabilität von Zellen verwendet. Das gelbe Tetrazoliumsalz wird von mitochondrialen und cytosolischen NADP(H)-abhängigen Oxidoreduktasen zu violetter Formazan umgesetzt [98]. Die Anzahl der metabolisch aktiven Zellen korreliert dabei mit der Stärke der violetten Farbreaktion [99].

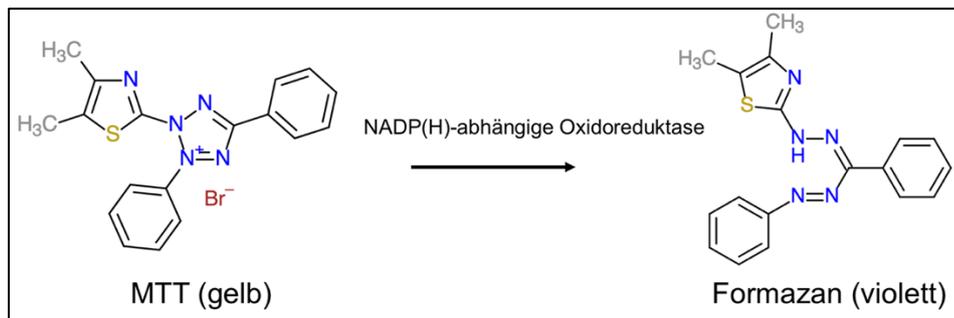


Abbildung 5: **Reduktion des gelben Tetrazoliumsalzes (MTT) zu violetter Formazan.** Die Abbildung wurde mit ChemDoodle® erstellt.

HUVEC wurden trypsiniert, gezählt und in eine 96-Well-Platte pro Well 10^4 Zellen ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Endothelzellen 3 h mit einer der folgenden MNP (VSOP; fluidMAG-CT50, -DXS50, -Q50 oder -DEAE50; Resovist) ($c(\text{Fe}) = 0,5 \text{ mmol/l}$) beladen. Die MNP wurden zuvor in EC-Vollmedium gelöst. Als Kontrolle dienten Zellen mit EC-Vollmedium. Nach 3 h wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und durch neues EC-Vollmedium ersetzt. Nach 24 h, 48 h, 72 h wurden pro Well $10 \mu\text{l}$ 5 mg/ml MTT-Testsubstanz hinzugegeben und die Zellen für 1 h inkubiert. Das Medium wurde entfernt und $150 \mu\text{l}$ Isopropanol pro Well hinzugegeben. Die Platte wurde vorsichtig im Dunkeln für 15 min geschüttelt. Es erfolgte die kolorimetrische Messung im Absorptionsspektrometer bei 570 nm. Für jede Inkubationszeit und MNP wurden Fünffachwerte bestimmt. In Vorversuchen wurde die Absorption verwendeter MNP in PBS mit MTT-Testsubstanz gemessen, um eine MNP-bedingte Erhöhung des Signals von den Messungen zu subtrahieren.

2.7 Zelluläre Aufnahme von MNP nach unterschiedlicher Kultivierung (Statisch vs. laminarer Fluss)

Material/Geräte	Hersteller
Flusseinheit (10 ml)	Ibidi
HCl	Merck
Immomount	Dako
Kaliumhexacyanoferrat II	Merck
Kernechtrot	Carl Roth
Paraformaldehyd (Roti-Histofix 4%)	Carl Roth
Perfusionsset (rot)	Ibidi
Pumpsystem	Ibidi
<i>Serial Connector</i>	Ibidi
<i>μ-Slides I^{0.8} Luer</i>	Ibidi

2.7.1 Versuchsaufbau: Pumpsystem mit Flusseinheiten

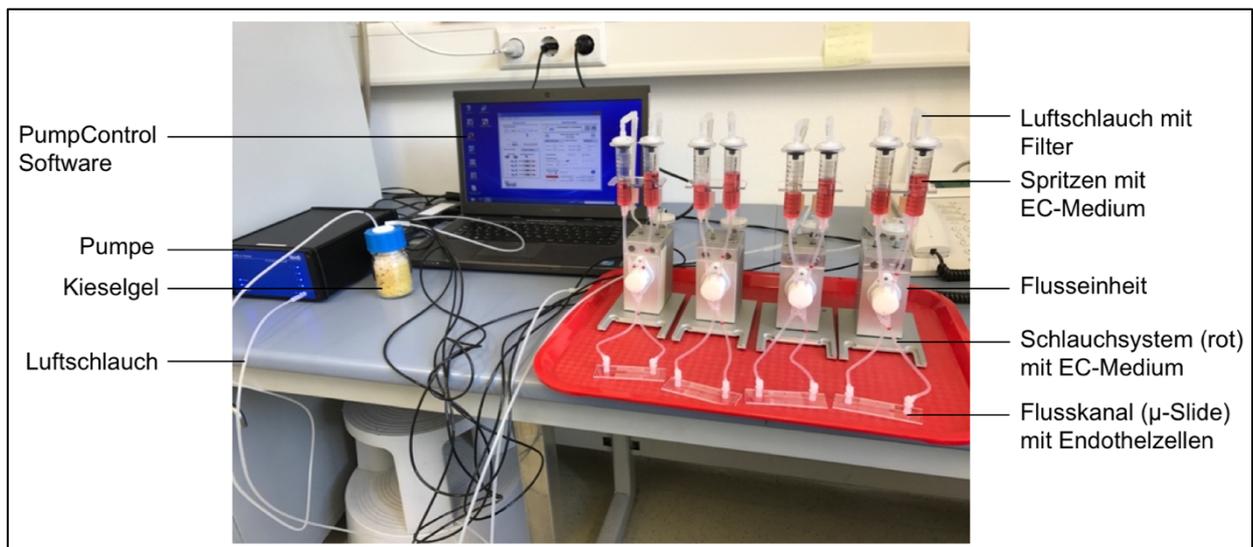


Abbildung 6: **Versuchsaufbau des Ibidi-Pumpsystems.** Das EC-Medium innerhalb des Schlauchsystems wird durch die Pumpe und das Schaltsystem der Flusseinheiten kontinuierlich in eine Richtung bewegt. Auf diese Weise werden die Endothelzellen im Kanal unter einem gleichförmigen Fluss kultiviert. Die Flusseinheiten wurden in feuchter Atmosphäre bei 37°C und 5 % CO₂ in einem Brutschrank deponiert.

Im Gefäß wirken Scherkräfte tangential auf die Oberfläche von Endothelzellen. Das Pumpsystem wurde verwendet, um die Scherkräfte eines laminaren Flusses in einem in-vitro-Modell zu simulieren. Eine schematische Darstellung des Pumpsystems ist in Abbildung 7 gezeigt.

2 Material und Methoden

Das Pumpsystem wurde pro Flusseinheit mit 13,5 ml EC-Vollmedium befüllt und 24 h im Brutschrank inkubiert. Das *Bubble-Release*-Programm wurde gestartet, um Luftblasen aus dem System zu entfernen. Pro μ -Slide wurden 2×10^5 Endothelzellen (HUVEC) ausgesät, die Reservoirs mit Medium aufgefüllt und im Brutschrank inkubiert.

Nach 24 h wurden die adhärennten Endothelzellen in den μ -Slides an das Pumpsystem angeschlossen. Die Endothelzellen wurden 72 h einem laminaren Fluss (LF) ausgesetzt. Bei einer Flussrate von 28,78 ml/min wirkten gleichförmige Scherkräfte von 10 dyn/cm^2 auf die Zellen. Als Kontrolle dienten HUVEC, die unter statischen Bedingungen (S) für 72 h in den Flusskanälen (μ -Slides) kultiviert wurden. In diesen *Slides* erfolgte nach jeweils 24 h ein Mediumwechsel, um eine ausreichende Nährstoffversorgung zu gewährleisten.

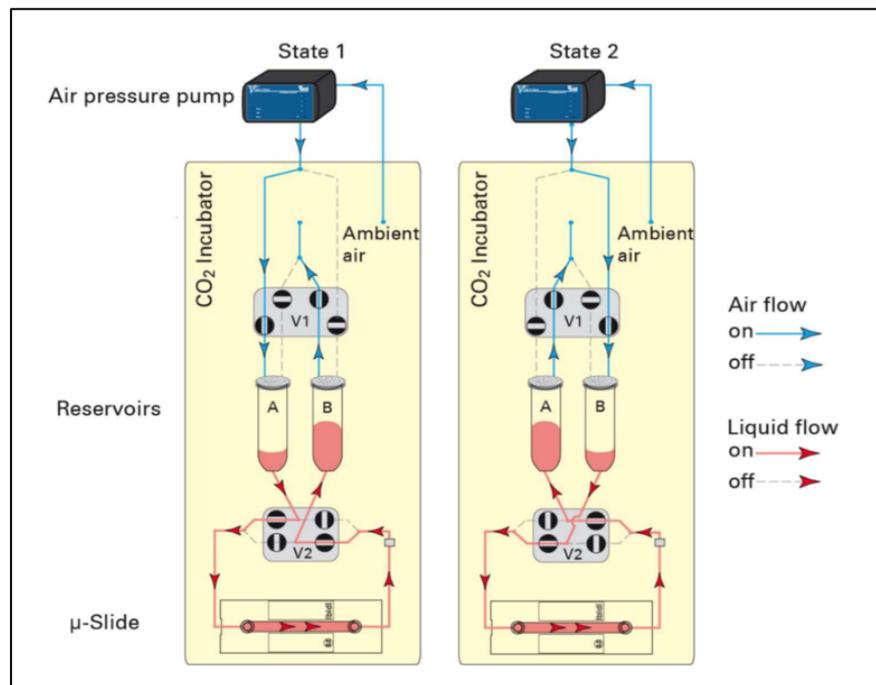


Abbildung 7: **Schematische Darstellung des Schaltsystems innerhalb der Flusseinheit des Ibidi-Pumpsystems.** Durch das wechselnde Abklemmen der Luftschläuche (blaue Linien mit Pfeilen) wird abwechselnd Luft in die mit Medium gefüllten Reservoirs gepumpt. Durch das wechselseitige Öffnen des Kanalsystems (rote Linien mit Pfeilen) wird ein laminarer Fluss erzeugt, dessen gleichförmige Scherkräfte auf die Endothelzellen in den Flusskanälen (μ -Slides) einwirken. Die Abbildung wurde mit freundlicher Genehmigung von Ibidi der Bedienungsanleitung des Pumpsystems entnommen (www.ibidi.com).

2.7.2 Inkubation mit MNP unter laminarem Fluss

Vor der Inkubation mit MNP wurden auch die *Slides* mit S-HUVEC an das Pumpsystem angeschlossen. S-HUVEC und LF-HUVEC wurden nun mit einer der folgenden MNP (fluidMAG-CT50, -DXS50, -Q50, -DEAE50) unter LF (28,78 ml/min) für 3 h beladen ($c(\text{Fe}) = 0,5 \text{ mmol/l}$) und inkubiert. Die MNP wurden zuvor in EC-Vollmedium gelöst und das Medium ausgetauscht. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂.

2.7.3 Berliner-Blau-Färbung und Lichtmikroskopie

Die *Slides* wurden von der Pumpe getrennt und mehrmals mit PBS gespült, ohne den Kanal trocken zu legen. Die Endothelzellen wurden für 10 min mit Roti-Histofix 4 % fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit Kaliumhexacyanoferrat II (4 %) für 10 min. Darauf wurden die Zellen mit einem 1:1-Gemisch aus Kaliumhexacyanoferrat II (4 %) und HCl (2 %) bis zu einer Blaufärbung der Endothelzellen für 5-30 min inkubiert. Die *Slides* wurden mit H₂O_{bidest.} gespült, mit Immomount befüllt und im Lichtmikroskop ausgewertet.

Je *Slide* wurden 5 Fotos in 20facher Vergrößerung an markierten Stellen im Abstand von 8 mm angefertigt. Die Auswertung der Fotos erfolgte mit der AxioVision Software. Dazu wurden die blaugefärbten Areale in % für jedes Bild anteilig bestimmt und anschließend die Werte gemittelt.

2.8 Software

- ITEM Software (Olympus GmbH) für die Transmissionselektronenmikroskopie
- Graphad 8.0 (Prism) zur Erstellung von Abbildungen und für die statistische Auswertung
- AxioVision Software (Zeiss) für die Licht- und Transmissionselektronenmikroskopie
- PumpControl Software (Ibidi) für die Steuerung der Flusspumpe
- Summit Software (Beckman Coulter) für die Durchflusszytometrie
- SoftMax Pro Software (Molecular Devices) für die Absorptionsspektrometrie
- Powerpoint 16 (Microsoft) zur Erstellung von Abbildungen

2.9 Statistische Analyse

Der deskriptive Vergleich und die Analyse experimenteller Daten erfolgte mithilfe der Software Graphpad 8.0 (Prism). Die experimentellen Daten sind in Abbildungen als Mittelwerte \pm Standardabweichung des Mittelwertes (SD) präsentiert. Zum Vergleich der Aufnahme von MNP in Abhängigkeit der vorangegangenen Kultivierungsbedingungen wurde der Anteil blaugefärbter Areale (in %) zwischen LF-HUVEC und S-HUVEC mittels ungepaarten Student's t-Test auf signifikante Unterschiede analysiert. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert $< 0,05$ angenommen. Lineare Regressionsanalysen kamen zur Anwendung, um signifikante Veränderungen der Steigung einer Funktionsgeraden von Messwerten der MPS-Messungen zu ermitteln.

3 Ergebnisse

3.1 Visualisierung der Glykokalyx (GCX) mittels TEM

Ziel dieser Arbeit war es, die Interaktion von MNP mit Strukturen der Zelloberfläche zu untersuchen. Vorangegangene Arbeiten legten eine Wechselwirkung zwischen GCX und VSOP nahe [91].

3.1.1 Darstellung der GCX von Endothelzellen

Für die Etablierung einer geeigneten Methode zur Darstellung der endothelialen GCX wurden EA.hy926 Zellen entweder mit einer chemischen Fixierung (Glutaraldehyd/Lanthannitrat/Alcian Blau) oder mittels Hochdruckeinfrierung (HPF/FS) fixiert. Sowohl nach chemischer Fixierung als auch nach Hochdruckeinfrierung konnte die GCX von EA.hy926 Zellen in der TEM dargestellt werden (Abbildung 8).

Die Struktur der GCX unterschied sich deutlich zwischen den angewandten Fixiertechniken (**A** vs. **B**). Nach chemischer Fixierung war die GCX als dünner elektronendichter Streifen auf der Oberfläche der Endothelzellen erkennbar. Im Gegensatz dazu fand sich ein sehr großes, ausgeprägtes Netz auf der Oberfläche der Endothelzellen, die mittels HPF/FS konserviert wurden. Mit einer Ausdehnung von über 10 μm war dieses Netz lückenhaft aufgebaut und in Richtung des äußeren Randes ausgedünnt (**B**). Der zellnahe Rand wurde von einer Linie gebildet, die mit Teilen der Zelloberfläche assoziiert war (**B**). Die Unterbrechung zwischen GCX und Zelloberfläche war höchstwahrscheinlich durch die Fixierung bedingt.

Im Inneren der unter Hochdruck eingefrorenen Zellen zeichneten sich deutlich Zellorganellen wie Mitochondrien, Vesikel, Ribosomen oder das endoplasmatische Retikulum ab (**B, D**). Dies unterstrich die technisch wirksame Fixierung. Dagegen waren innere Bestandteile chemisch fixierter Zellen nur ansatzweise erkennbar, sodass sich nur der Zellkern deutlich hervorhob (**A**). Die unter Hochdruck eingefrorene GCX (**B, D**) war deutlich größer ($> 10 \mu\text{m}$) als die GCX der chemisch fixierten Endothelzellen, deren Größe nicht mehr als 50 nm betrug (**A, C**).

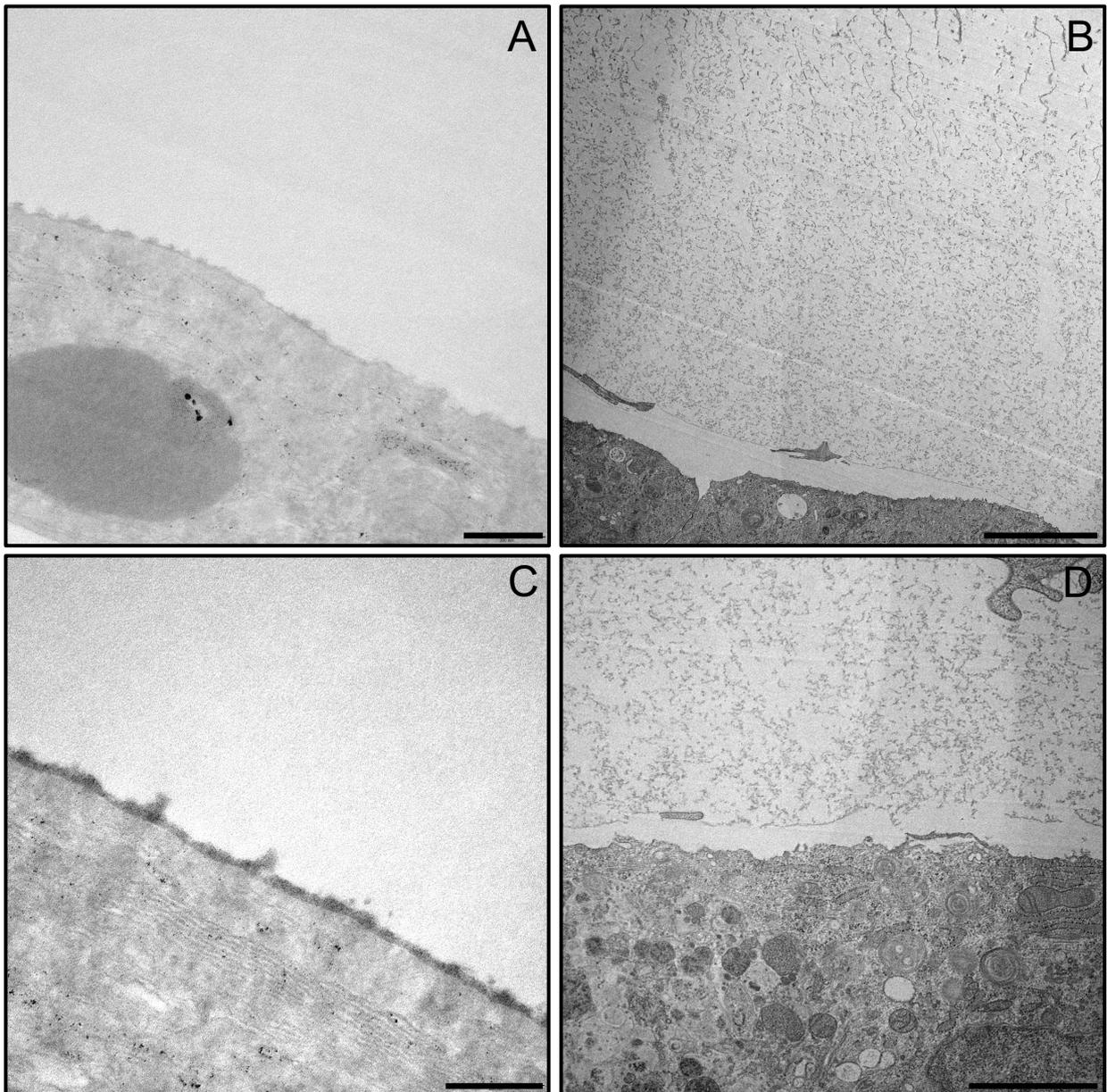


Abbildung 8: Darstellung der GCX humaner EA.hy926 Zellen nach chemischer Fixierung vs. HPF/FS mittels TEM. **A, C:** EA.hy926 Zellen nach chemischer Fixierung mit Glutaraldehyd, Lanthannitrat und Alcian Blau. Die GCX ist als kontrastreicher Streifen auf der Zelloberfläche erkennbar (Größe < 50 nm). **B, D:** Die GCX ist nach Hochdruckeinfrierung (HPF/FS) als großes Netzwerk auf der Zelloberfläche sichtbar (Größe > 10 µm). Maßstabsbalken: **A, C:** 200 nm; **B:** 5 µm; **D:** 2 µm.

Die Hochdruckeinfrierung (HPF/FS) ist für die TEM-Darstellung der endothelialen GCX geeignet. Chemische Fixierungen mit Glutaraldehyd und Lanthannitrat führten zu inakzeptablen Artefakten.

3.1.2 Interaktion von VSOP mit der GCX von THP-1 Monozyten

Aus methodischen Gründen wurde die Interaktion von MNP und GCX in nicht adhärenenten THP-1 Monozyten untersucht, da die Darstellung von Suspensionszellen mittels HPF/FS weniger störanfällig war.

THP-1 Zellen wurden für 3 min, 30 min und 180 min mit VSOP ($c(\text{Fe}) = 1 \text{ mmol/l}$) inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte THP-1 Zellen. Nach bereits 3 min waren einzelne oder gruppierte MNP in der GCX der THP-1 Monozyten sichtbar (Abbildung 9 **A**). Diese waren durch dunkle, kontrastreiche Punkte gekennzeichnet, die sich innerhalb der netzartigen GCX befanden (**A**, **C**, **C1**) und in der unbehandelten Kontrolle nicht vorhanden waren (**B**, **B1**).

Es zeigte sich eine gleichmäßige Verteilung der MNP über die gesamte GCX (**A**). Unterschiede waren in der Anzahl der zusammengelagerten MNP erkennbar, die mit Strukturen der GCX assoziiert waren (**C1**, **D1**). Besonders große Gruppierungen von MNP befanden sich direkt an Stellen der Zellmembran, die durch Einstülpungen gekennzeichnet waren (**D**, **D1**). Kleiner gruppierte MNP fanden sich überwiegend innerhalb der GCX (**A**, **C1**).

Die Einstülpungen in der Zellmembran indizierten den Beginn der intrazellulären Aufnahme (Endozytose) der MNP (**D**, **D1**). Nach 30 min waren im Zytoplasma der Zellen Vesikel mit MNP erkennbar, die zuvor durch Endozytose aufgenommen wurden (**E**, **E1**). Diese Vesikel waren nach 180 min mit einer größeren Menge an MNP in einer größeren Anzahl in den Zellen vorhanden (**F**, **F1**). In beiden Zellpräparationen (30 min, 180 min) waren MNP auch noch innerhalb der GCX sichtbar (**E**, **F**).

Zwischen den Zellpräparationen (3 min, 30 min, 3 h) waren Unterschiede in der netzartigen Struktur der GCX erkennbar. Ein grobmaschiges, dichtes Netz befand sich auf den Monozyten, die für 3 min mit den MNP inkubiert wurden. Teile der Zelloberfläche dieser Zellpräparation waren durch einen schmalen kontrastfreien Streifen von der netzartigen GCX getrennt (**A**). Zellbruchstücke an dieser Stelle sprachen für eine fixierbedingte Ablösung, da der restliche Teil der GCX mit der Zelloberfläche verbunden war (**A**). Ein weniger dichtes Netzwerk war auf der Oberfläche von THP-1 Zellpräparationen ohne MNP und nach 30 min Inkubation mit MNP zu beobachten (**B**, **B1**, **E**). Diese Unterschiede konnten ebenfalls auf die Fixierung zurückgeführt werden.

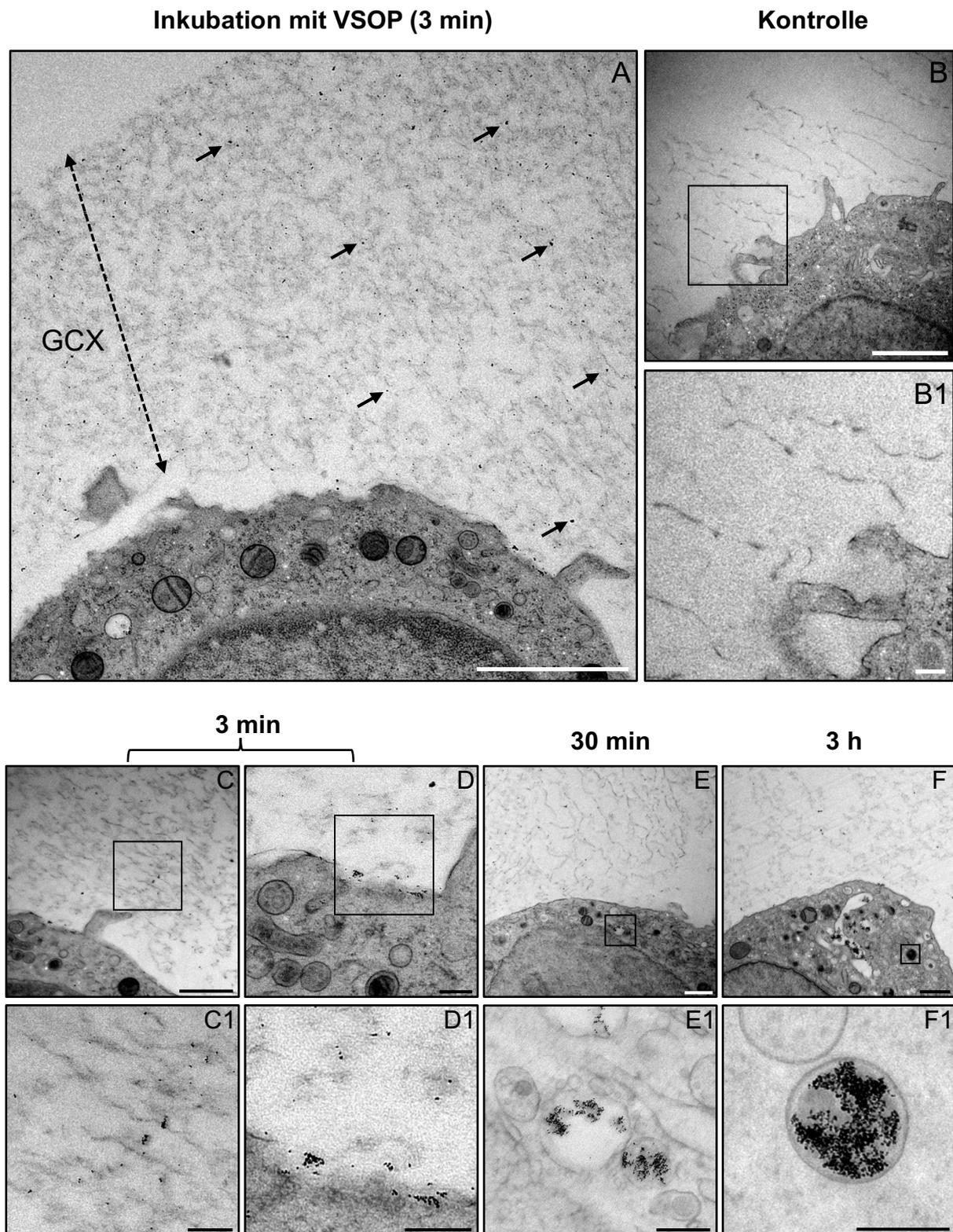


Abbildung 9: Darstellung der Wechselwirkung von VSOP mit der GCX von THP-1 Monozyten mittels HPF/FS-TEM. THP-1 Monozyten wurden für 3 min, 30 min, 180 min mit VSOP inkubiert und mittels HPF/FS kryofixiert. Kontrolle: Unbehandelte THP-1 Zellen. Die schwarzen Pfeile deuten auf gruppierte VSOP in der GCX (A). In unbehandelten THP-1 Zellen waren keine VSOP sichtbar (B). Nach 3 min waren VSOP mit der GCX assoziiert (C, C1) und wurden durch Endozytose aufgenommen (D, D1). Maßstabsbalken: A, B: 2 μ m; C, E, F: 1 μ m; B1, C1, D, D1, E1, F1: 250 nm; Abbildung modifiziert nach Poller et al. [1].

Zusammengefasst waren nach 3 min unterschiedlich große Gruppierungen zusammengelagerter MNP mit Strukturen der GCX assoziiert. Zudem befanden sich gruppierte MNP direkt an der Zellmembran. Nach 30 min und 180 min waren Vesikel mit aufgenommenen MNP innerhalb des Zytoplasmas der THP-1 Monozyten erkennbar.

3.2 Veränderung der magnetischen Eigenschaften von VSOP nach Zellkontakt

Die Veränderung der magnetischen Eigenschaften von VSOP bei Kontakt mit biologischem Material kann mittels MPS-Messung durch die Veränderung des Verhältnisses der gemessenen Signalintensität der dritten und fünften Harmonischen der Anregungsfrequenz (A_5/A_3 -Verhältnis) erfasst werden [77, 81]. Ein starker Anstieg des A_5/A_3 -Verhältnisses von VSOP konnte zuvor bereits 3 min nach Zellkontakt gezeigt werden [81].

3.2.1 Magnetische Eigenschaften von zellgebundenen VSOP

In einer nicht kontinuierlichen Messreihe wurden THP-1 Monozyten für 300 s, 600 s und 900 s mit VSOP ($c(\text{Fe}) = 0,5 \text{ mmol/l}$) inkubiert und anschließend die freien MNP durch Waschen entfernt, um das magnetische Signal von zellgebundenen VSOP nach Zellkontakt zu verschiedenen Zeitpunkten zu messen. Die MPS-Messung erfolgte bei Anregungsamplituden von $\hat{B} = 25 \text{ mT}$.

Bereits nach 300 s war das gemessene A_5/A_3 -Verhältnis von zellgebundenen VSOP ($8,0 \pm 0,5 \%$) deutlich höher als der Referenzwert von VSOP ohne Zellen ($5,9 \%$). Zugleich stiegen die Werte zu späteren Messzeitpunkten (600 s, 900 s) nicht weiter an. Der Mittelwert des A_5/A_3 -Verhältnisses von zellgebundenen VSOP ($7,9 \pm 0,1 \%$) von allen drei Zeitpunkten war höher als der Referenzwert von VSOP ohne Zellen ($5,9 \%$). Diese Ergebnisse verdeutlichen die Veränderung der magnetischen Eigenschaften von VSOP nach Zellkontakt und konnten frühere Untersuchungen bestätigen [81].

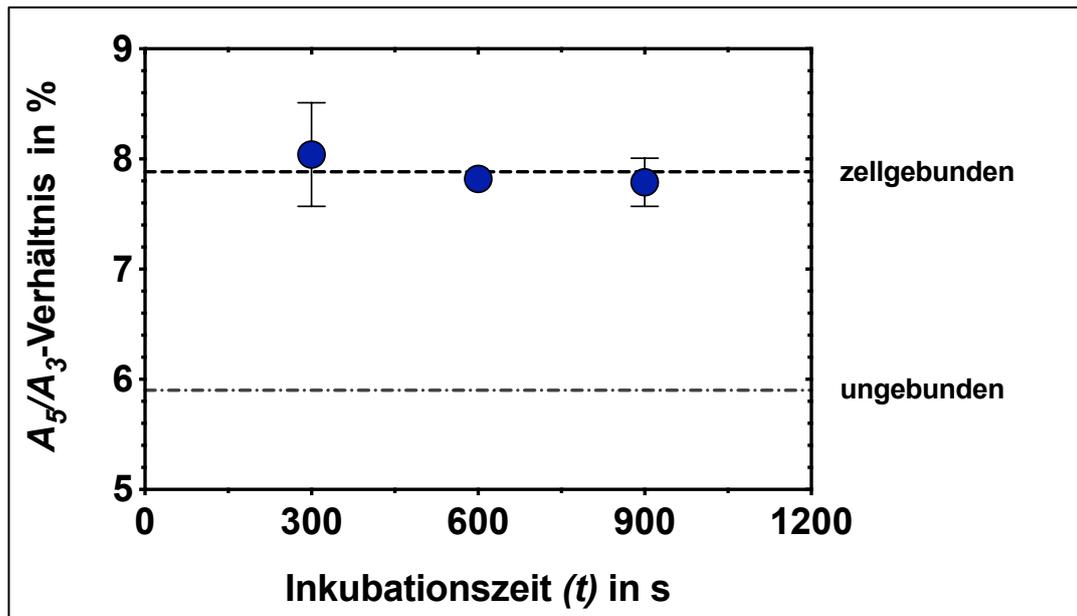


Abbildung 10: **MPS-Messung von zellgebundenen VSOP nach Entfernung freier MNP.** THP-1 Zellen wurden mit VSOP ($c(\text{Fe}) = 0,5 \text{ mmol/l}$) für angegebene Zeiten (300 s, 600 s, 900 s) inkubiert und alle freien MNP entfernt. Dargestellt ist das prozentuale Verhältnis der gemessenen Signalintensität der dritten und fünften Harmonischen der Anregungsfrequenz (A_5/A_3 -Verhältnis). Die unterbrochenen Linien markieren den Mittelwert der Messwerte von VSOP zellgebunden und den Referenzwert von VSOP ohne Zellen (ungebunden). MPS-Messung erfolgte bei Anregungsamplituden von $\hat{B} = 25 \text{ mT}$. $n = 3$, Mittelwerte \pm SD, modifiziert nach Poller et al. [1].

3.2.2 Magnetische Eigenschaften von VSOP unmittelbar nach Zellkontakt

Die Ergebnisse des vorangegangenen Versuches indizierten eine schnelle Veränderung des A_5/A_3 -Verhältnisses von VSOP kurz nach Zellkontakt und keinen weiteren Anstieg nach Entfernung freier MNP zwischen 300 s und 900 s. Um die Kinetik der Veränderung zu untersuchen, wurde mit einer neuen Methodik in folgendem Versuch das A_5/A_3 -Verhältnis unmittelbar nach Zellkontakt kontinuierlich gemessen. Dazu wurden THP-1 Monozyten in PBS gelöst und in der Messkammer des MPS platziert (siehe Abbildung 3). Über ein Schlauchsystem wurden in PBS gelöste VSOP ($c(\text{Fe}) = 0,5 \text{ mmol/l}$) zu den im MPS platzierten THP-1 Zellen gegeben und gemischt, während kontinuierlich Messungen bei Anregungsamplituden von $\hat{B} = 25 \text{ mT}$ im Abstand von 4 s über einen Zeitraum von 884 s durchgeführt wurden. Als Kontrolle diente ein zellfreier Messansatz.

Zu Beginn nach erstem Zellkontakt war das gemessene A_5/A_3 -Verhältnis von VSOP ($6,76 \pm 0,41\%$) deutlich höher als das zum gleichen Zeitpunkt gemessene A_5/A_3 -

3 Ergebnisse

Verhältnis von VSOP ohne Zellkontakt ($5,88 \pm 0,29\%$). Die graue Linie in Abbildung 11 markiert den Mittelwert aller Messungen von VSOP in PBS ohne Zellen ($5,75 \pm 0,09\%$), die blaue Linie repräsentiert den Mittelwert von VSOP mit Zellen ($7,10 \pm 0,21\%$).

Das A_5/A_3 -Verhältnis von VSOP mit Zellen stieg kontinuierlich sowie signifikant an und erreichte einen Wert von $7,55 \pm 0,07\%$ zum Zeitpunkt der letzten Messung nach 884 s (Abbildung 11). Die lineare Regressionsanalyse zeigte eine signifikante Veränderung in der Steigung einer Funktionsgeraden des A_5/A_3 -Verhältnisses aller gemessenen Zeitpunkte von VSOP mit Zellen ($p < 0,001$). Im Gegensatz dazu waren die Messwerte von VSOP in PBS relativ konstant und es zeigte sich keine signifikante Veränderung in der Steigung einer Funktionsgeraden des A_5/A_3 -Verhältnisses aller gemessenen Zeitpunkte von VSOP in PBS ($p = 0,31$).

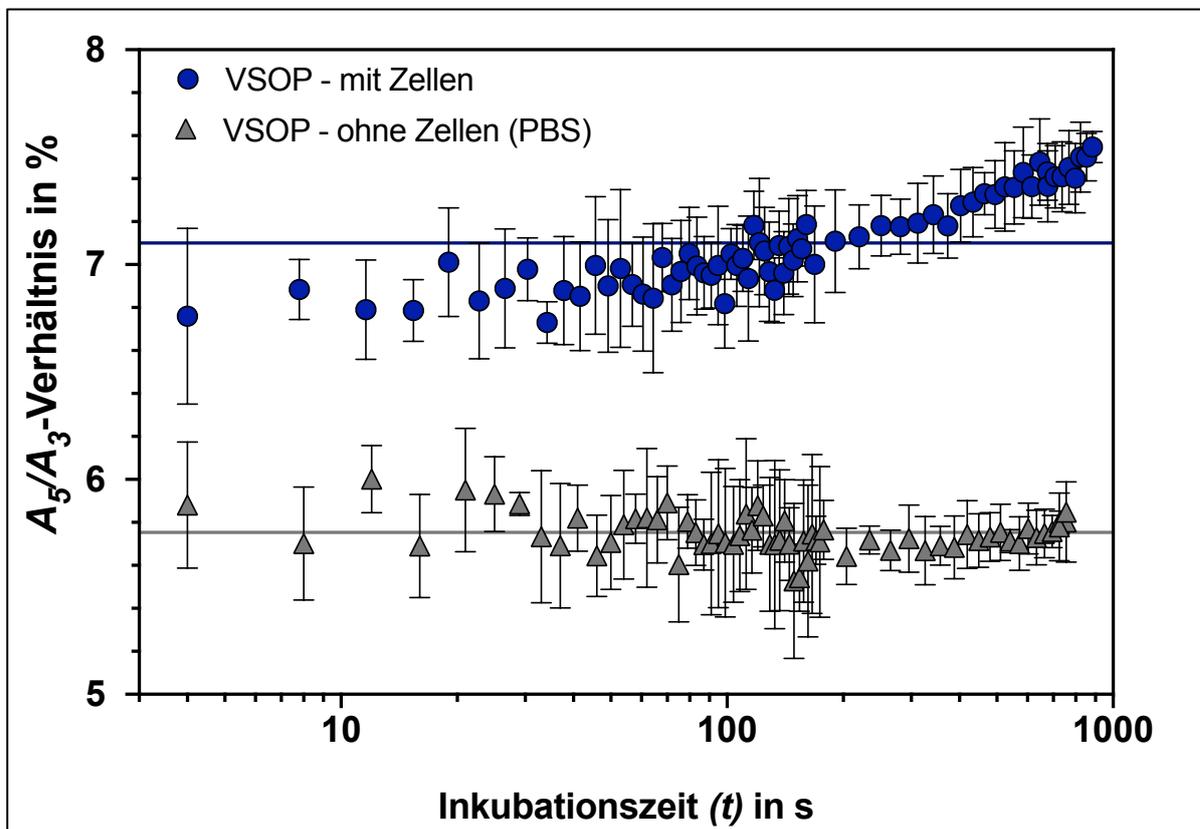


Abbildung 11: **MPS-Messung von VSOP während des Kontaktes mit THP-1 Zellen und PBS.** Dargestellt ist das A_5/A_3 -Verhältnis zu allen gemessenen Zeitpunkten während des Kontaktes mit THP-1 Zellen oder ohne Zellkontakt. Die Linien markieren den Mittelwert aller Messwerte von VSOP ohne Zellen (grau) und von VSOP mit Zellen (blau). Die MPS-Messungen erfolgten kontinuierlich im Abstand von 4-30 s bei Anregungsamplituden von $\hat{B} = 25$ mT. $n = 3-5$, Mittelwerte \pm SD, modifiziert nach Poller et al. [1].

Mit einer kontinuierlichen MPS-Messung konnte während des Zellkontaktes die Veränderung der magnetischen Eigenschaften von VSOP anhand des gemessenen A_5/A_3 -Verhältnisses bestimmt werden. Die Ergebnisse unterstreichen somit die Bedeutung der MPS-Messung und zeigen eine neue Möglichkeit auf, um physikochemische Veränderungen von MNP in biologischen Systemen sowie deren Kinetik zu erfassen.

3.3 FluidMAG-CT50 als potenzieller MPI-Partikel für die Bildgebung der Atherosklerose

Die schnelle Aufnahme von VSOP in atherosklerotische Plaques konnte im Mausmodell mehrfach nachgewiesen werden [53, 88-90]. VSOP erwiesen sich als MRT-Kontrastmittel zur Darstellung atherosklerotischer Läsionen potenziell geeignet, sind jedoch aufgrund ihrer vergleichsweise geringeren Signalstärke für MPI nicht verwendbar. Deshalb wurde nach einem MPI-Tracer mit besseren magnetischen Eigenschaften bei gleichzeitig ähnlichem Verhalten im biologischen System gesucht. Aufgrund der Annahme, dass die Citrat-Beschichtung von VSOP die zelluläre Aufnahme der MNP begünstigt, wurde der ebenfalls mit Citrat beschichtete MNP fluidMAG-CT50 für die Untersuchung ausgewählt.

3.3.1 Quantifizierung zellassoziierter fluidMAG-CT50-Partikel

Um die Aufnahme von fluidMAG-CT50 in Endothelzellen zu untersuchen, wurden EA.hy926 Zellen mit fluidMAG-CT50 ($c(\text{Fe}) = 0,5 \text{ mmol/l}$) für 1 h beladen und für angegebene Zeiten inkubiert (1 h, 3 h, 6 h, 24 h). Die zellassozierte $m(\text{Fe})$ wurde mittels MPS-Messung bei Anregungsamplituden von $\hat{B} = 25 \text{ mT}$ bestimmt. Nach 1 h Inkubation mit fluidMAG-CT50 waren bereits $39,0 \pm 4,4 \text{ pg Fe}$ pro Zelle gebunden (Abbildung 12). Die zellassozierte $m(\text{Fe})$ erhöhte sich leicht bis zu einer Inkubationszeit von 6 h und war zu diesem Zeitpunkt am höchsten ($50,3 \pm 8,1 \text{ pg/Zelle}$). Nach 24 h Inkubation verringerte sich die $m(\text{Fe})$ pro Zelle ($38,1 \pm 5,5 \text{ pg}$) wieder.

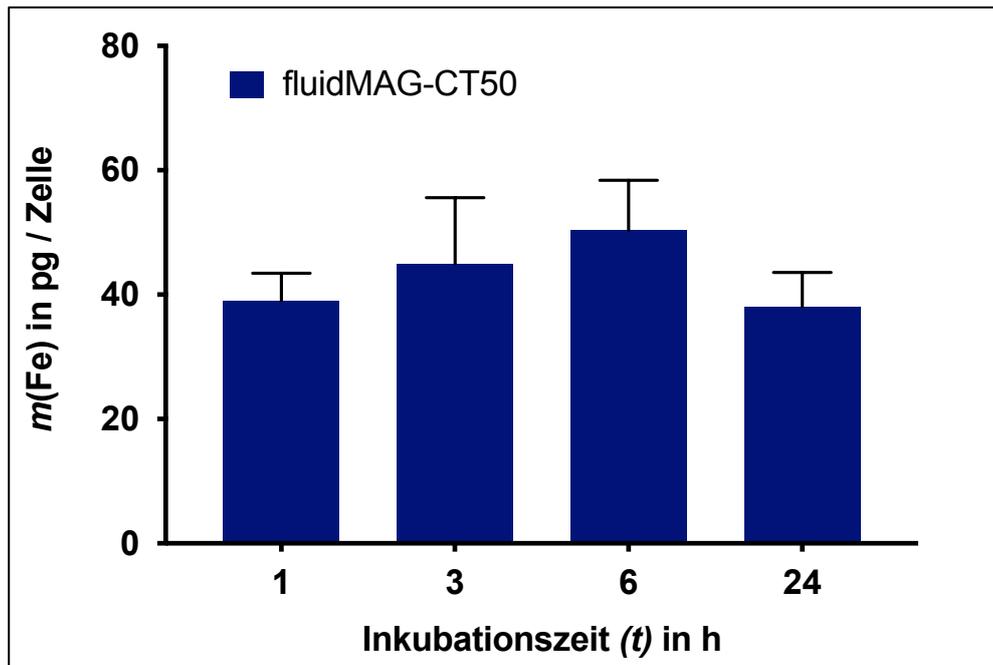


Abbildung 12: **Zellassoziierte Eisenmasse von EA.hy926 Zellen nach Inkubation mit fluidMAG-CT50.** EA.hy926 Zellen wurden für 1 h mit fluidMAG-CT50 ($c(\text{Fe}) = 0,5 \text{ mmol/l}$) beladen und für 1 h, 3 h, 6 h und 24 h inkubiert. Die Quantifizierung erfolgte nach MPS-Messung bei Anregungsamplituden von $\hat{B} = 25 \text{ mT}$. $n = 3$, Mittelwerte \pm SD

Aus diesem Ergebnis konnte geschlussfolgert werden, dass fluidMAG-CT50-Partikel an Endothelzellen binden und in die Zellen aufgenommen werden, da trotz Entfernung der MNP aus dem Medium nach einer Stunde die zellassoziierte $m(\text{Fe})$ weiter anstieg. Es konnte keine differenzierte Aussage über die Menge der intrazellulären MNP getroffen werden, da mittels MPS-Messung nur die gesamte zellassoziierte $m(\text{Fe})$ bestimmt wurde. Lichtmikroskopische Beobachtungen ließen ebenfalls eine intrazelluläre Aufnahme vermuten.

3.3.2 Aufnahme von fluidMAG-CT50 in Endothelzellen nach unterschiedlicher Kultivierung (S vs. LF)

Die Entwicklung der Atherosklerose findet an prädisponierten Stellen im Gefäß statt, die gestörten Flussbedingungen unterliegen [11]. Es wurde untersucht, ob der Citratbeschichtete MNP fluidMAG-CT50 in Abhängigkeit von Kultivierungsbedingungen, nämlich statisch (S) versus laminaren Fluss (LF), in primäre Endothelzellen (HUVEC) aufgenommen wird.

3 Ergebnisse

HUVEC wurden für 3 d unterschiedlich kultiviert (S vs. LF) und darauf für 3 h unter LF mit fluidMAG-CT50 ($c(\text{Fe}) = 0,5 \text{ mmol/l}$) inkubiert. Nach Eisenfärbung wurden die Berliner-Blau-positiven Areale vermessen. Diese dienten als Maß für die zelluläre Aufnahme der fluidMAG-CT50-Partikel.

Die Zellmorphologie unterschied sich zwischen den verschiedenen kultivierten HUVEC deutlich (Abbildung 13: **B**, **C**). LF-HUVEC waren parallel entlang des laminaren Flusses ausgerichtet, wohingegen S-HUVEC diffus und ungeordnet verteilt waren. In LF-HUVEC (**C**) waren weniger blau-gefärbte Bereiche sichtbar, die sich größtenteils zwischen oder im Randbereich der Zellen befanden. Der Anteil der Berliner-Blau-gefärbten Areale war signifikant höher ($p < 0,05$) in S-HUVEC ($5,8 \pm 2,0 \%$), als in LF-HUVEC ($1,4 \pm 0,4 \%$) (Abbildung 13: **A**). Diese Ergebnisse indizierten, dass fluidMAG-CT50 sich besonders in atherosklerotischen Plaques anreichern könnte.

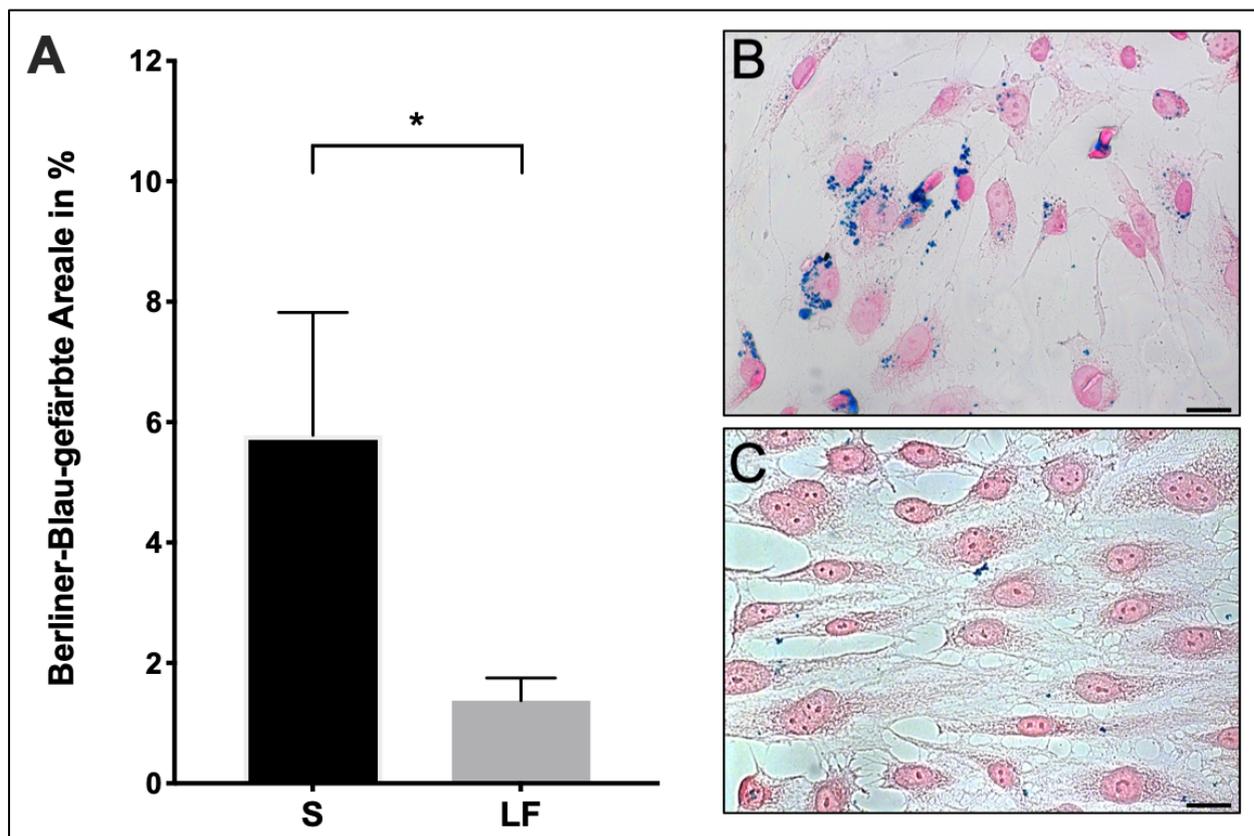


Abbildung 13: **Aufnahme von fluidMAG-CT50 in HUVEC nach unterschiedlicher Kultivierung (S vs. LF)**. Endothelzellen wurden für 3 Tage S oder unter LF kultiviert und anschließend für 3 h unter LF mit fluidMAG-CT50 ($c(\text{Fe}) = 0,5 \text{ mmol/l}$) inkubiert. Berliner-Blau-positive Areale wurden vermessen und dienten als Maß für die Aufnahme der MNP (**A**). S-HUVEC (**B**) und LF-HUVEC (**C**) nach Berliner-Blau-Färbung mit Kernechtrotfärbung. $n = 3$, Mittelwerte \pm SD, $* = p < 0,05$, Maßstabsbalken: **B**, **C**: $15 \mu\text{m}$

3.3.3 Detektionslimit von fluidMAG-CT50-markierten Zellspots im MPI

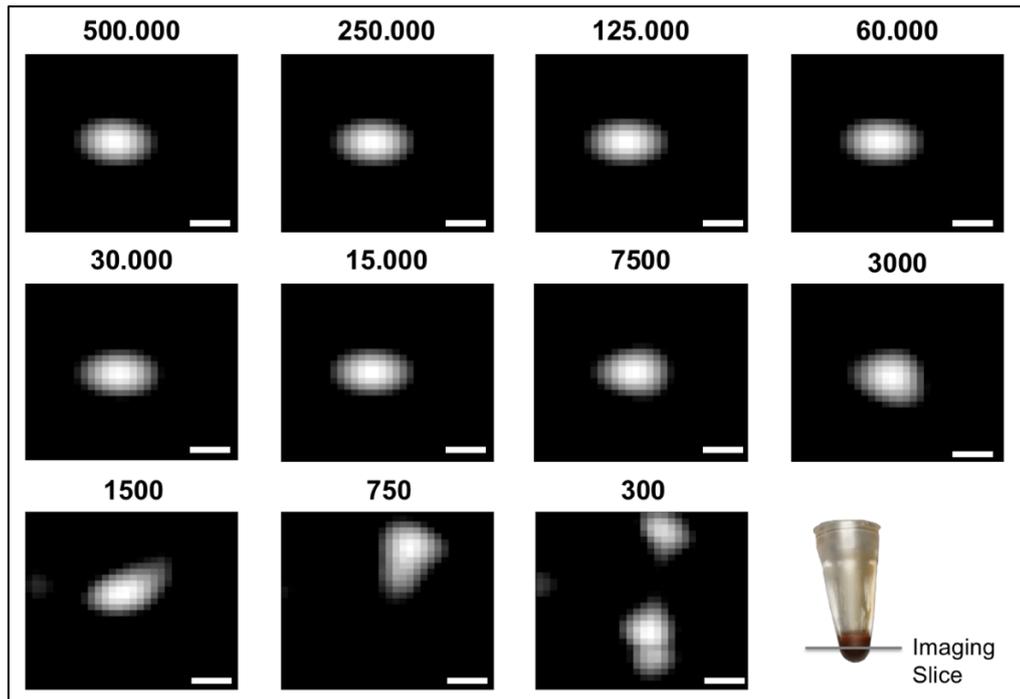
Für die Bestimmung der Detektionsgrenze zellgebundener fluidMAG-CT50-Partikel wurde eine absteigende Anzahl von EA.hy926 Zellen mit MNP für 24 h inkubiert. Die Proben mit definierter Zellzahl wurden anschließend im MPI-Scanner vermessen. In Abbildung 14 sind die MPI-Bilder einer einzelnen Messreihe (A) und die quantifizierte $m(\text{Fe})$ der Proben von vier Messreihen (B) dargestellt. Die MPI-Messung erfolgte bei Anregungsamplituden von $\hat{B} = 12$ mT in allen Raumachsen und einem Feldgradienten von 1,25/1,25/2,5 T/m (in x/y/z-Richtung). Für jede bildliche Rekonstruktion wurden die Daten einer Messzeit von 2 s gemittelt (FOV: 28 x 28 x 14 mm³) und die gleichen Rekonstruktionsparameter verwendet. Als Referenzprobe für die Kalibriermessung dienten fluidMAG-CT50-Partikel ohne Zellen.

Zellspots oberhalb einer Probengröße von 1500 Zellen konnten in der ersten Messreihe ohne Artefakte dargestellt werden (Abbildung 14, **A**). In den bildlichen Rekonstruktionen der Zellspots mit niedrigerer Zellzahl (750, 300) traten deutliche Artefakte auf, sodass in diesem Bereich nicht mehr sicher zwischen Rauschen und dem Signal der zellassoziierten fluidMAG-CT50-Partikel unterschieden werden konnte.

Die $m(\text{Fe})$ der Proben von vier unabhängigen Messreihen konnte anhand der aufsummierten Signalintensität innerhalb des gesamten FOV quantifiziert werden (**B**). Das mittlere Hintergrundrauschen aller Messungen betrug $86,3 \pm 11,8$ ng Fe. Aus der Summe des mittleren Hintergrundrauschens und dem fünffachen Wert der SD wurde die Detektionsgrenze von 145,3 ng Fe zellgebundener fluidMAG-CT50-Partikel bestimmt. Die durchschnittliche Beladung der Zellen mit fluidMAG-CT50 aller Messproben betrug 9,4 pg Fe/Zelle. Daraus folgte ein Detektionslimit von 15461 Zellen, die zuvor mit fluidMAG-CT50 markiert wurden. Die mittels MPI quantifizierte $m(\text{Fe})$ von 15000 markierten Zellen betrug $149,9 \pm 60,4$ ng Fe. Das MPI-Signal der Proben, welche 7500 oder weniger fluidMAG-CT50-beladene Zellen enthielten, lag unterhalb der festgelegten Detektionsgrenze ($113,6 \pm 23,5$ ng Fe).

Mit zunehmender Zellzahl stieg die gemessene Signalintensität an. Es bestand ein linearer Zusammenhang zwischen Zellzahl und quantifizierter $m(\text{Fe})$ oberhalb der Detektionsgrenze. Die $m(\text{Fe})$ von fluidMAG-CT50-markierten Endothelzellen konnte demnach zuverlässig mittels MPI bestimmt werden.

A



B

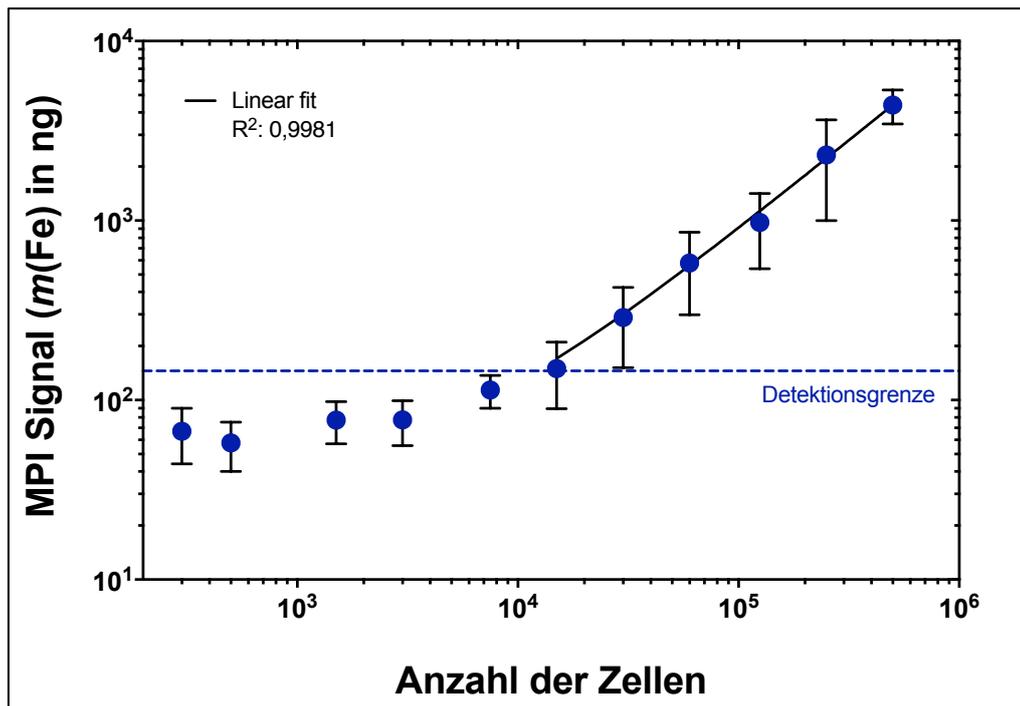


Abbildung 14: **Detektionslimit von fluidMAG-CT50-beladenen EA.hy926 Zellen im MPI.** EA.hy926 Zellen wurden mit fluidMAG-CT50 ($c(\text{Fe}) = 1 \text{ mmol/l}$) für 24 h inkubiert. MPI-Messung bei $\hat{B} = 12 \text{ mT}$ und einem Feldgradienten von 1,25/1,25/2,5 T/m (in x/y/z-Richtung). FOV: $28 \times 28 \times 14 \text{ mm}^3$. **A:** MPI-Bilder (*Imaging Slices*) der Proben einer Messreihe. Angabe der Zellzahl oberhalb der bildlichen Rekonstruktion. Maßstabsbalken: 5 mm. **B:** Für die $m(\text{Fe})$ -Quantifizierung wurden die Signalintensitäten einer Probe innerhalb des gesamten FOV aufsummiert. Die blaue Linie markiert die Detektionsgrenze von fluidMAG-CT50-beladenen EA.hy926 Zellen (145,3 ng Fe). Die aufaddierten Signalintensitäten der Proben aus 4 unabhängigen Messreihen sind als Mittelwerte $\pm \text{SD}$ präsentiert.

3.3.4 Räumliche Auflösung und Quantifizierbarkeit von fluidMAG-CT50-markierten THP-1 Zellen im Modell eines Gefäßquerschnitts im MPI

Nach Darstellung und Quantifizierung von Endothelzellen sollten auch THP-1 Monozyten in der MPI visualisiert werden. Aus Monozyten gereifte und in atherosklerotische Läsionen eingewanderte Makrophagen stellen einen Marker für die Vulnerabilität atherosklerotischer Plaques dar [19]. Die Detektion von fluidMAG-CT50-markierten Monozyten innerhalb einer atherosklerotischen Läsion sollte mithilfe eines Modells getestet werden. Dazu wurden Phantome eines Gefäßquerschnitts in einem 3D-Drucker für den MPI-Scanner erstellt. Die Zellproben mit fluidMAG-CT50 wurden in Agarosegel innerhalb der Phantome eingebettet und somit fixiert (Abbildung 15).

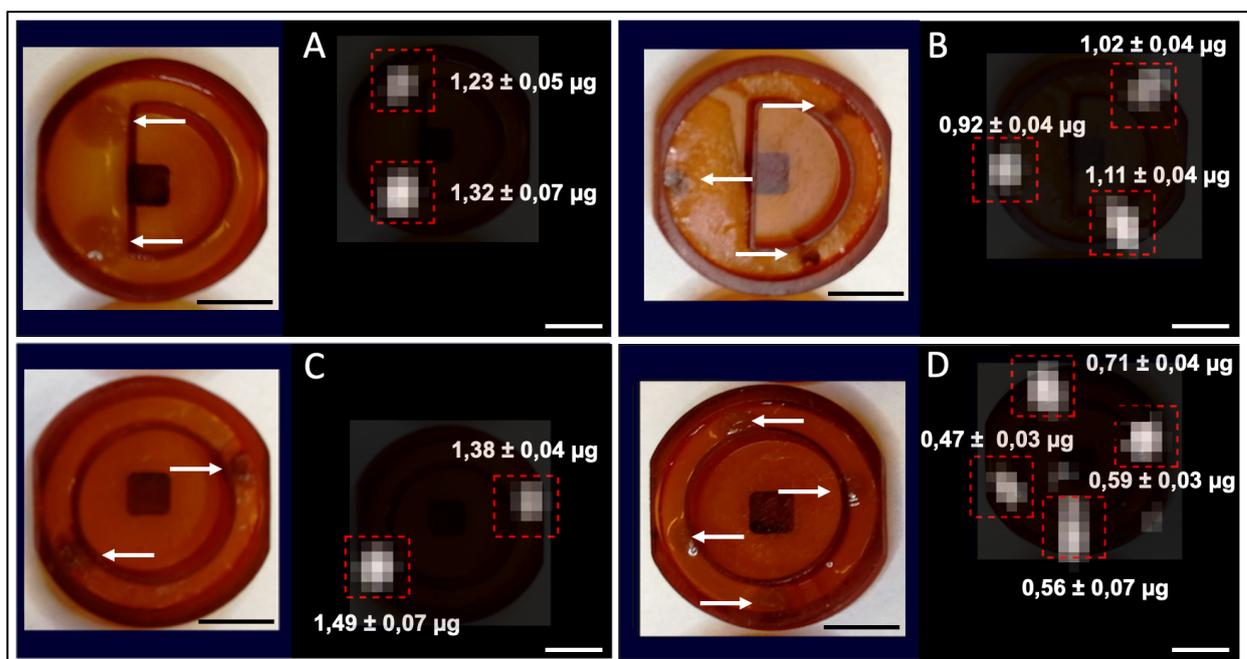


Abbildung 15: **Darstellung und Quantifizierbarkeit von fluidMAG-CT50-markierten THP-1 Zellen im Modell eines Gefäßquerschnitts im MPI.** THP-1 Zellen wurden für 24 h mit fluidMAG-CT50 ($c(\text{Fe}) = 1 \text{ mmol/l}$) inkubiert. Die Einbettung der markierten THP-1 Zellen erfolgte in Agarosegel in Phantomen eines Gefäßquerschnitts (Abbildung neben MPI-Bild). MPI-Messung bei $\hat{B} = 12 \text{ mT}$ und einem Feldgradienten von $1,25/1,25/2,5 \text{ T/m}$ (in x/y/z-Richtung). FOV: $28 \times 28 \times 14 \text{ mm}^3$. Die $m(\text{Fe})$ der Proben wurden innerhalb der rot markierten Areale quantifiziert. Eine transparente Abbildung der Phantome ist den MPI-Bildern unterlegt. **A, C:** Zwei Zellproben; **B:** Drei Zellproben; **D:** Vier Zellproben; Maßstabsbalken: 5 mm

FluidMAG-CT50-markierte THP-1 Monozyten konnten als abgrenzbare Signalspots innerhalb eines größeren Gefäßmodells unabhängig voneinander in der MPI dargestellt werden. Der geringste Abstand zwischen zwei Zellproben betrug 5 mm (**A**). Anhand der

Signalintensität der Proben innerhalb eines Phantoms konnte eine quantitative Aussage über die Menge an fluidMAG-CT50-beladenen Zellen getroffen werden. Die $m(\text{Fe})$ der einzelnen Zellspots wurde über die Summe der Signalintensitäten innerhalb der rot markierten Areale quantifiziert. Die Quantifizierung der $m(\text{Fe})$ könnte die Unterscheidung verschiedener Gefäßabschnitte ermöglichen, in denen keine oder bevorzugt MNP in atherosklerotische Läsionen aufgenommen werden, sodass eine Aussage über die Vulnerabilität der Plaques getroffen werden könnte.

3.4 Einfluss von Citrat-beschichteten MNP auf die intrazelluläre Bildung von ROS, die Ferritin-Synthese und die Zellviabilität

Die sichere Anwendung von Citrat-beschichteten MNP zur Darstellung atherosklerotischer Plaques für die nicht-invasive Bildgebung erfordert den Ausschluss zellschädigender Einflüsse der MNP. Da die Potenzierung von oxidativem Stress die Progression der Atherogenese verstärken könnte [2, 3], ist es wichtig die Bildung radikaler Sauerstoffspezies (ROS) und somit potenziell toxische Wirkung von MNP auf die Zellen zu untersuchen.

3.4.1 Einfluss von Citrat-beschichteten MNP auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Beide Zelllinien (HUVEC und EA.hy926) wurden für 1 h beladen und für 1-48 h mit Citrat-beschichteten MNP ($c(\text{Fe}) = 0,5 \text{ mmol/l}$) inkubiert. Die Inkubation mit $5 \mu\text{g/ml H}_2\text{DCFDA}$ erfolgte für 30 min. Die zelluläre Aufnahme von VSOP und fluidMAG-CT50 führte in EA.hy926 Zellen zu einem transienten Anstieg des DCF-Levels und indizierte eine vorübergehend erhöhte Bildung von ROS gegenüber der Kontrolle. Der Höhepunkt des Anstiegs lag bei 4 h sowohl für fluidMAG-CT50 als auch für VSOP und sank nachfolgend wieder ab (Abbildung 16). Während sich nach Inkubation mit VSOP die ROS-Bildung in Form des DCF-Levels nach 4 h fast verdoppelte ($1,90 \pm 0,30$), erreichte das DCF-Level nach Inkubation mit fluidMAG-CT50 einen 1,4fach erhöhten Wert ($1,44 \pm 0,21$).

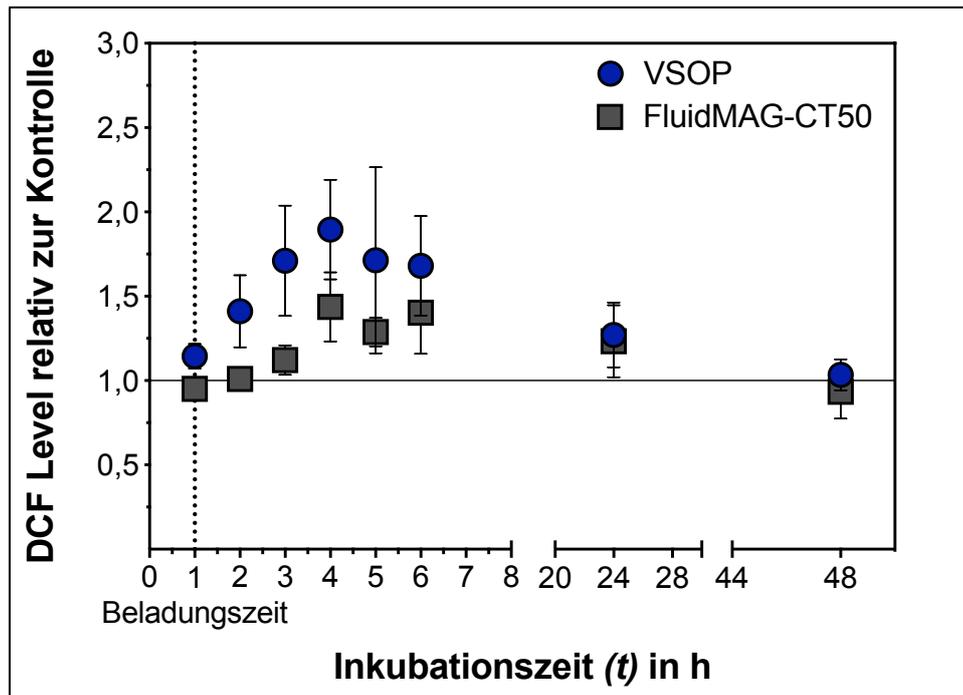


Abbildung 16: **ROS-Bildung in EAhy.926 nach Inkubation mit fluidMAG-CT50 und VSOP.** EA.hy926 wurden für 1 h mit fluidMAG-CT50 oder VSOP ($c(\text{Fe}) = 0,5 \text{ mmol/l}$) beladen und für 1-48 h inkubiert. Unbehandelte EA.hy926 dienen als Kontrolle. $n = 3-6$ für beide MNP, Mittelwerte \pm SD

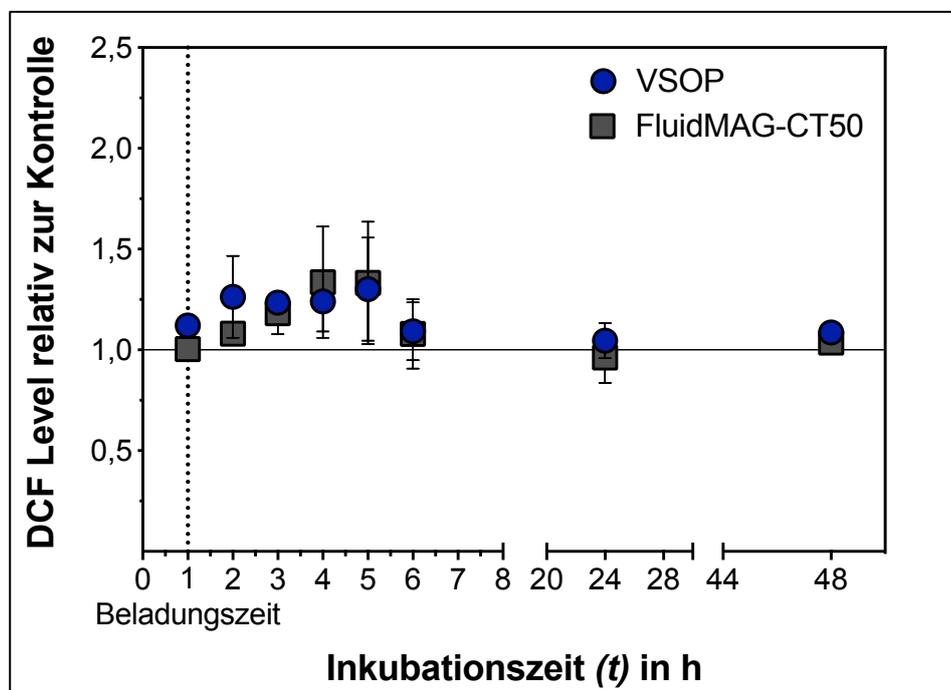


Abbildung 17: **ROS-Bildung in HUVEC nach Inkubation mit fluidMAG-CT50 und VSOP.** HUVEC wurden für 1 h mit fluidMAG-CT50 oder VSOP ($c(\text{Fe}) = 0,5 \text{ mmol/l}$) beladen und für 1-48 h inkubiert. Unbehandelte HUVEC dienen als Kontrolle. $n = 3-6$ für beide MNP, Mittelwerte \pm SD

In HUVEC führte die Inkubation mit VSOP und fluidMAG-CT50 ebenfalls zu einem Anstieg der ROS-Bildung (Abbildung 17). Nach Inkubation mit VSOP und fluidMAG-CT50 war eine transiente Erhöhung des DCF-Levels zwischen 2 und 5 h erkennbar. Die ROS-Bildung in HUVEC nach Inkubation mit den Citrat-beschichteten MNP reduzierte sich bereits nach 24 h wieder auf den Wert der unbehandelten Kontrolle (VSOP: $1,05 \pm 0,09$, fluidMAG-CT50: $0,96 \pm 0,13$).

3.4.2 Einfluss von Citrat-beschichteten MNP auf die Ferritin-Synthese

Für den quantitativen Nachweis von Ferritin im *Western Blot* wurden EA.hy926 Zellen und HUVEC mit fluidMAG-CT50 oder VSOP ($c(\text{Fe}) = 0,5 \text{ mmol/l}$) inkubiert. In EA.hy926 Zellen war die Expression von Ferritin am stärksten nach 24 h (Abbildung 18). Eine vermehrte Synthese von Ferritin erfolgte nach 6 h Inkubation mit beiden MNP, eine verringerte Expression zeigte sich nach 48 h Inkubation mit fluidMAG-CT50. Zellen nach 48 h Inkubation mit VSOP zeigten keine eindeutig geringere Ferritin-Expression.

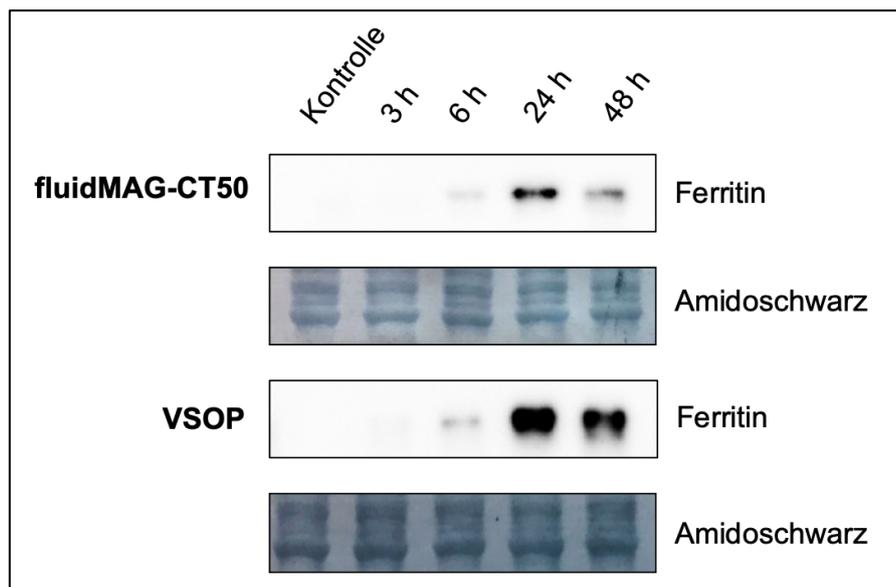


Abbildung 18: **Ferritin-Synthese in EA.hy926 Zellen nach Inkubation mit fluidMAG-CT50 und VSOP.** EA.hy926 wurden für 1 h mit fluidMAG-CT50 oder VSOP ($c(\text{Fe}) = 0,5 \text{ mmol/l}$) beladen und für angegebene Zeiten inkubiert (3 h, 6 h, 24 h, 48 h). Unbehandelte HUVEC dienen als Kontrolle. Amidoschwarz diente als Ladekontrolle.

Auch in HUVEC konnte eine erhöhte Expression von Ferritin auf Proteinebene nach Eisenpartikelaufnahme gezeigt werden (Abbildung 19). Im Vergleich zur Kontrolle präsentierte sich in HUVEC ein starker Anstieg der Ferritin-Synthese bereits 6 h nach Inkubation mit beiden MNP. Nach 48 h Inkubation mit VSOP war die Ferritin-Expression wieder deutlich geringer, wohingegen nach 48 h Inkubation mit fluidMAG-CT50 das Ferritin-Level kaum verringert war.

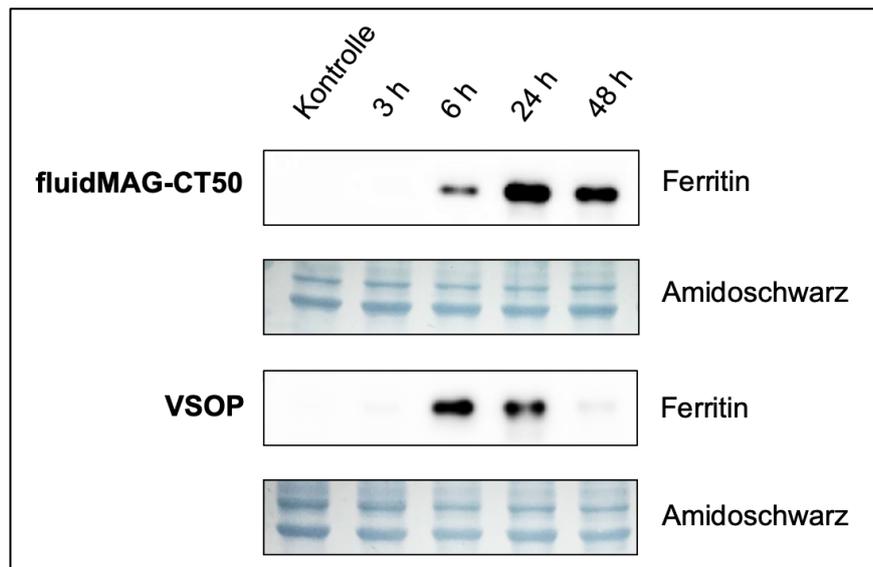


Abbildung 19: **Ferritin-Synthese in HUVEC nach Inkubation mit fluidMAG-CT50 und VSOP.** HUVEC wurden für 1 h mit fluidMAG-CT50 oder VSOP ($c(\text{Fe}) = 0,5 \text{ mmol/l}$) beladen und für angegebene Zeiten inkubiert (3, 6, 24, 48 h). Unbehandelte HUVEC dienen als Kontrolle. Amidoschwarz diente als Ladekontrolle.

3.4.3 Einfluss von Citrat-beschichteten MNP auf die Zellviabilität

HUVEC wurden für 3 h mit VSOP oder fluidMAG-CT50 ($c(\text{Fe}) = 0,5 \text{ mmol/l}$) beladen und für 1-3 Tage inkubiert. Unbehandelte HUVEC dienen als Kontrolle. Die Behandlung erfolgte mit 5 mg/ml MTT Testsubstanz. In den primären Endothelzellen war nach Inkubation mit Citrat-beschichteten VSOP und fluidMAG-CT50 keine Reduktion der Zellviabilität in Form des kolorimetrisch bestimmten Formazan-Levels gegenüber der Kontrolle zu beobachten (Abbildung 20).

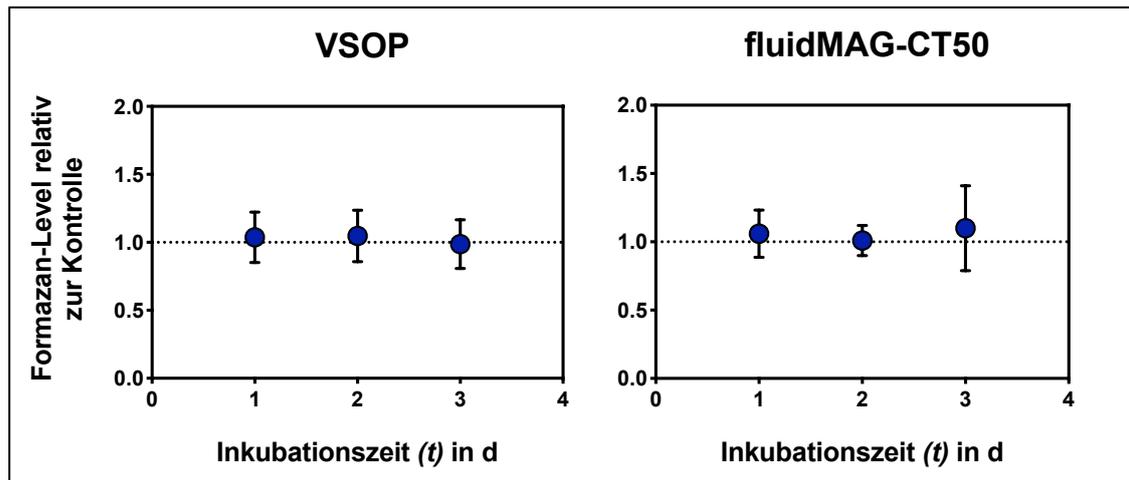


Abbildung 20: **Zellviabilität von HUVEC nach Inkubation mit VSOP und fluidMAG-CT50.** HUVEC wurden für 3 h mit VSOP oder fluidMAG-CT 50 ($c(\text{Fe}) = 0,5 \text{ mmol/l}$) beladen und für 1-3 Tage inkubiert. Darstellung des Formazan-Levels relativ zur Kontrolle, $n = 3$, Mittelwerte \pm SD

3.5 Eigenschaften der sterisch-stabilisierten MNP fluidMAG-DXS50, -Q50, -DEAE50 und Resovist

In den vorangegangenen Versuchen wurde der elektrostatisch-stabilisierte MNP fluidMAG-CT50 als potenzieller MPI-Tracer für die Darstellung der Atherosklerose mittels MPI untersucht. In folgenden Ergebnissen werden die Eigenschaften sterisch-stabilisierter MNP für eine experimentelle Verwendung evaluiert.

3.5.1 Magnetische Eigenschaften nach Zellkontakt

Mittels MPS-Messung wurden die magnetischen Eigenschaften der MNP vor und nach Zellkontakt untersucht, um einen für die Anwendung im biologischen System geeigneten MNP mit vorteilhaften magnetischen Eigenschaften zu ermitteln. In Tabelle 1 sind die Ergebnisse der MPS-Messung aufgeführt. Für die Untersuchung des A_5/A_3 -Verhältnisses nach Zellbindung und die Bestimmung der zellassoziierten $m(\text{Fe})$ wurden EA.hy926 Zellen für 3 h mit fluidMAG-CT50, -DXS50, -Q50, -DEAE50, VSOP oder Resovist ($c(\text{Fe}) = 0,5 \text{ mmol/l}$) inkubiert. Die MPS-Messung erfolgte bei Anregungsamplituden von $\hat{B} = 25 \text{ mT}$.

Das magnetische Moment (A_3^*) ist ausschlaggebend für die Signalstärke der MNP. Die Messung von A_3^* zeigte deutliche Unterschiede zwischen VSOP ($0,65 \text{ Am}^2/\text{kg Fe}$) und den größeren MNP, deren magnetisches Moment um das Zehnfache höher war

3 Ergebnisse

(Tabelle 1). Kleinere Unterschiede fanden sich zwischen den fluidMAG-MNP-CT50 ($7,6 \pm 0,4 \text{ Am}^2/\text{kg Fe}$), -DXS50 ($7,4 \pm 0,4 \text{ Am}^2/\text{kg Fe}$) und -DEAE50 ($7,7 \pm 0,4 \text{ Am}^2/\text{kg Fe}$). Am höchsten war die Signalintensität von fluidMAG-Q50 ($9,8 \pm 0,5 \text{ Am}^2/\text{kg Fe}$) und somit höher als von Resovist ($9,3 \pm 0,5 \text{ Am}^2/\text{kg Fe}$).

Für alle untersuchten MNP waren deutliche Unterschiede des gemessenen A_5/A_3 -Verhältnisses zwischen freien und zellgebundenen Partikeln zu erkennen. Dieses war vor Zellkontakt bei -CT50 (35,0 %) und Resovist (40,6 %) am höchsten und fiel nach Zellbindung bei beiden MNP stark ab (-CT50: $26,1 \pm 0,2 \%$; Resovist: $27,3 \pm 0,4 \%$). Das A_5/A_3 -Verhältnis von freien -DXS50- ($32,4 \%$) und -Q50-Partikeln ($33,0 \%$) war nahezu gleich, reduzierte sich jedoch von -DXS50 ($29,5 \pm 0,1 \%$) nach Zellkontakt weniger als von -Q50 ($23,7 \pm 0,2 \%$), sodass das A_5/A_3 -Verhältnis von -DXS50 nach Zellkontakt am höchsten war. Das A_5/A_3 -Verhältnis von -DEAE50 war sowohl vor ($30,0 \%$) als auch nach Zellkontakt ($22,9 \pm 0,2 \%$) von allen fluidMAG-Partikeln am geringsten. Einzig das A_5/A_3 -Verhältnis von VSOP erhöhte sich von $5,9 \%$ ohne Zellen auf $8,3 \pm 0,1 \%$ nach Zellbindung, war aber dennoch am niedrigsten von allen untersuchten MNP.

Tabelle 1: Ergebnisse der MPS-Messungen verschiedener MNP nach Zellbindung und Quantifizierung der zellassozierten Eisenmasse. EA.hy926 Zellen wurden für 3 h mit MNP ($c(\text{Fe}) = 0,5 \text{ mmol/l}$) inkubiert. Das magnetische Moment A_3^* ($\text{Am}^2/\text{kg Fe}$) wurde ohne Zellen bestimmt. Für die Messwerte von A_3^* der Referenzproben ohne Zellen sind die Messunsicherheiten angegeben. Messunsicherheit des A_5/A_3 -Verhältnisses der ungebundenen Proben für alle Messwerte: $< 0,001 \%$. Das A_5/A_3 -Verhältnis der zellgebundenen Proben wurde aus dem zellgebundenen A_3^* errechnet (hier nicht gezeigt). MPS-Messung bei Anregungsamplituden von $\hat{B} = 25 \text{ mT}$. $n = 3-7$, Mittelwerte \pm SD

MNP	A_3^* ($\text{Am}^2/\text{kg Fe}$)	A_5/A_3 -Verhältnis (%)		Zellassozierte $m(\text{Fe})$ (pg/Zelle)
		ungebunden	zellgebunden	
fluidMAG-CT50	$7,6 \pm 0,4$	35,0	$26,1 \pm 0,2$	$25,4 \pm 2,7$
fluidMAG-DXS50	$7,4 \pm 0,4$	32,4	$29,5 \pm 0,1$	$12,4 \pm 2,8$
fluidMAG-Q50	$9,8 \pm 0,5$	33,0	$23,7 \pm 0,2$	$36,6 \pm 7,7$
fluidMAG-DEAE50	$7,7 \pm 0,4$	30,0	$22,9 \pm 0,2$	$26,3 \pm 12,1$
Resovist	$9,3 \pm 0,5$	40,6	$27,3 \pm 0,4$	$2,7 \pm 0,4$
VSOP	$0,65 \pm 0,03$	5,9	$8,3 \pm 0,1$	$18,0 \pm 2,4$

Die $m(\text{Fe})$ pro Zelle war nach Inkubation mit -Q50-Partikeln am höchsten ($36,6 \pm 7,7$ pg), gefolgt von -DEAE50 ($26,3 \pm 12,1$ pg) und -CT50 ($25,4 \pm 2,7$ pg). Geringer waren die zellassozierten $m(\text{Fe})$ von -DXS50 ($12,4 \pm 2,8$ pg) und VSOP ($18,0 \pm 2,4$ pg). Mit Abstand am geringsten fiel die zellassozierte $m(\text{Fe})$ nach Inkubation mit Resovist aus ($2,7 \pm 0,4$ pg). Es konnte nicht zwischen internalisierter und an der Oberfläche gebundener $m(\text{Fe})$ pro Zelle differenziert werden.

3.5.2 Aufnahme von sterisch-stabilisierten fluidMAG-Partikeln in Endothelzellen nach unterschiedlicher Kultivierung (S vs. LF)

Für die Untersuchung der zellulären Aufnahme sterisch-stabilsierter MNP in Abhängigkeit der vorangeegangenen Kultivierung (S vs. LF) wurden HUVEC für drei Tage S oder unter LF kultiviert. Anschließend wurden alle Endothelzellen für 3 h unter LF mit -DXS50, -Q50 oder -DEAE50 inkubiert ($c(\text{Fe}) = 0,5$ mmol/l). Für die histologische Analyse wurden nach einer Eisenfärbung Berliner-Blau-positive Areale vermessen, welche als Maß für die Aufnahme der MNP dienten.

In Abbildung 21 sind der Anteil der Berliner-Blau-gefärbten Areale in Endothelzellen nach Inkubation mit den sterisch-stabilisierten MNP dargestellt. Die angefärbte Fläche war in S-HUVEC ($1,01 \pm 0,61$ %) nach Inkubation mit -DXS50 größer als die markierten Areale in LF-HUVEC ($0,13 \pm 0,07$ %). Der Unterschied erwies sich nicht als statistisch signifikant ($p = 0,07$). In und zwischen unter LF kultivierten Endothelzellen waren vereinzelt blau gefärbte Areale zu erkennen (**B**).

Nach 3 h Inkubation mit Polydiallyldimethylamin-beschichteten fluidMAG-Q50-MNP zeigten sich signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen der angefärbten Fläche in S-HUVEC ($2,32 \pm 1,03$ %) und der markierten Areale in LF-HUVEC ($0,35 \pm 0,10$ %). In S-HUVEC waren Ansammlungen von aufgenommenen MNP (blau markierte Flächen) erkennbar (**C**), die in LF-HUVEC kleiner und seltener waren (**D**).

Auch in Endothelzellen, die mit Diethylaminethylstärke-beschichteten fluidMAG-DEAE50-MNP inkubiert wurden, war der prozentuale Anteil angefärbter Areale in S-HUVEC höher ($1,82 \pm 1,45$ %) als die blau markierten Areale in LF-HUVEC ($0,27 \pm 0,06$ %). Dieser Unterschied erwies sich nicht als statistisch signifikant ($p = 0,14$).

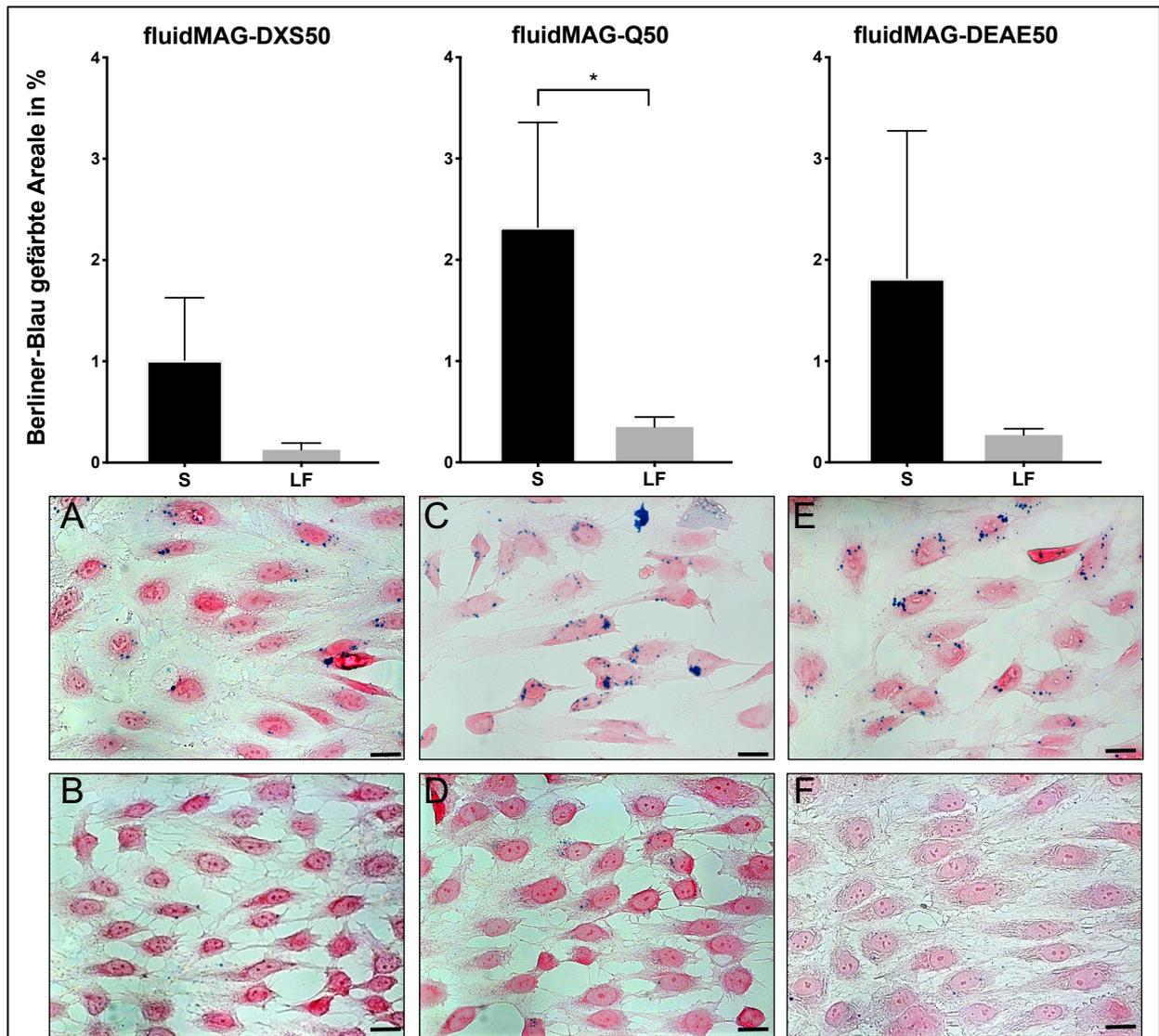


Abbildung 21: **Aufnahme von fluidMAG-DXS50, -Q50 und -DEAE50 in HUVEC nach unterschiedlicher Kultivierung (S vs. LF).** Endothelzellen wurden für 3 d unter LF oder S kultiviert und anschließend für 3 h unter LF mit fluidMAG-Partikeln ($c(\text{Fe}) = 0,5 \text{ mmol/l}$) inkubiert. Berliner-Blau-positive Areale wurden vermessen und dienten als Maß für die Aufnahme der MNP. Lichtmikroskopische Bilder: fluidMAG-DXS50: **A:** S-HUVEC, **B:** LF-HUVEC; fluidMAG-Q50: **C:** S-HUVEC, **D:** LF-HUVEC; fluidMAG-DEAE50: **E:** S-HUVEC, **F:** LF-HUVEC. Berliner-Blau-Färbung mit Kernechtrotfärbung. Maßstabsbalken: 15 μm ; $n = 3$, Mittelwerte \pm SD, * $p < 0,05$

3.5.3 Einfluss von sterisch-stabilisierten MNP auf die Zellviabilität

HUVEC wurden für 3 h mit FluidMAG-DXS50, -Q50, -DEAE50 oder Resovist ($c(\text{Fe}) = 0,5 \text{ mmol/l}$) beladen und 1-3 d inkubiert. Die Messung der Zellviabilität erfolgte mit einem MTT-Assay.

Abbildung 22 zeigt die Zellviabilität von HUVEC nach Inkubation mit sterisch-stabilisierten MNP. In den primären Endothelzellen war nach Inkubation mit fluidMAG-Q50 und fluidMAG-DXS50 ein leichter Rückgang der Zellviabilität in Form des kolorimetrisch bestimmten Formazan-Levels gegenüber der Kontrolle zu beobachten. Nach Inkubation mit fluidMAG-DEAE50 und Resovist war keine bis geringe Reduktion der metabolischen Zellaktivität messbar.

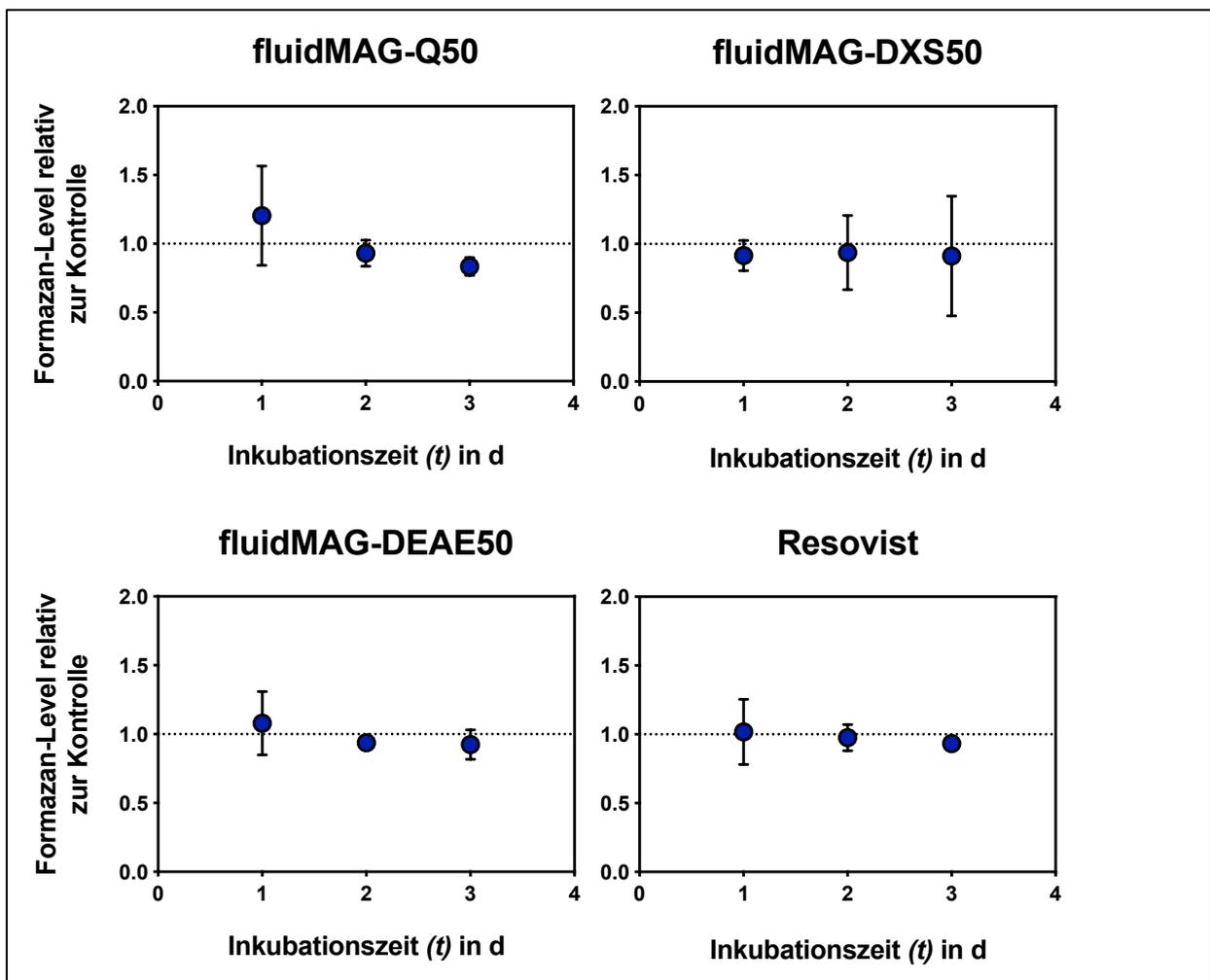


Abbildung 22: **Zellviabilität von HUVEC nach Inkubation mit sterisch-stabilisierten MNP.** HUVEC wurden für 3 h mit fluidMAG-Q50, -DXS50, -DEAE50 oder Resovist ($c(\text{Fe}) = 0,5 \text{ mmol/l}$) beladen und für 1-3 d inkubiert. Darstellung des Formazan-Levels relativ zur Kontrolle, $n = 3$, Mittelwerte \pm SD.

4 Diskussion

Die Detektion von vulnerablen atherosklerotischen Plaques ist wichtig, um folgenschweren Komplikationen präventiv entgegenwirken zu können. MNP stellen im Rahmen der nicht-invasiven Bildgebung (MPI) eine potenzielle Möglichkeit für die Detektion von atherosklerotischen Läsionen dar. MPI befindet sich als neu entwickelte Bildgebungsmethode im experimentellen Stadium und die Suche nach geeigneten MNP ist für die präklinische Weiterentwicklung von großer Bedeutung.

Ziel dieser Arbeit war es, verschiedene MNP auf ihre Eignung für die Bildgebung der Atherosklerose anhand ihrer physikalischen Eigenschaften und ihres Verhaltens im biologischen System zu prüfen. Ausgehend von der Hypothese, dass Citrat-beschichtete MNP als erstes mit der GCX auf der Zelle wechselwirken, sollte eine Visualisierung der GCX in Interaktion mit MNP durch Etablierung einer geeigneten Fixiertechnik für die TEM erreicht werden.

Mithilfe der Kryofixierung in Form der Hochdruckeinfrierung und anschließender Gefriersubstitution (HPF/FS) konnten die fragilen Strukturbestandteile der GCX von humanen Endothelzellen erhalten und die Interaktion von Citrat-beschichteten VSOP mit der GCX von THP-1 Monozyten mittels TEM visualisiert werden. Mithilfe einer kontinuierlichen MPS-Messung konnte diese Zell-MNP-Wechselwirkung auf physikalischer Ebene anhand von Veränderungen der magnetischen Eigenschaften der MNP analysiert werden.

Die effektive Markierung von Endothelzellen (EA.hy926) mit fluidMAG-CT50 und die Internalisierung der MNP durch Endothelzellen (HUVEC) in Abhängigkeit der vorangegangenen Kultivierung (S vs. LF) könnten eine spezifische Darstellung atherosklerotischer Plaques ermöglichen. Die Darstellung und Quantifizierung von fluidMAG-CT50-markierten Zellspots bekräftigten die Anwendbarkeit für MPI.

Die biologische Kompatibilität von Citrat-beschichteten MNP wurde im in-vitro-Zellmodell bestätigt. Die Inkubation mit MNP bewirkte eine transiente Erhöhung von oxidativem Stress in humanen Endothelzellen. Nach Anstieg der Ferritin-Synthese verringerte sich die ROS-Bildung wieder. Nach MNP-Inkubation konnte kein Rückgang der Zellviabilität beobachtet werden.

Weitere Untersuchungen mit sterisch-stabilisierten MNP zeigten, dass deren Aufnahme in Endothelzellen ebenfalls von der vorangegangenen Kultivierung (S vs. LF) abhängig war. Die Zellviabilität war nach Inkubation mit sterisch-stabilisierten MNP nicht bis gering beeinträchtigt.

Die beschriebenen Ergebnisse werden nachfolgend genauer und in Bezug auf bestehende Literatur diskutiert.

4.1 Visualisierung der Glykokalyx und Interaktion mit MNP

Die Struktur der GCX von in vitro kultivierten Zellen mittels TEM zu visualisieren stellt eine technische Herausforderung dar. Bisher gibt es wenige Studien, welche die GCX von in vitro kultivierten Endothelzellen mithilfe der Hochdruckeinfrierung sowie anschließender Gefriersubstitution (HPF/FS) in der TEM dargestellt haben [100].

4.1.1 Etablierung der Fixiertechnik

In der Vergangenheit wurden verschiedene Fixiertechniken zur Darstellung der GCX in der TEM verwendet. Die Visualisierung der GCX mithilfe der TEM erfolgte erstmalig auf kapillaren Endothelzellen mit einer chemischen Fixierung [101]. Ruthenium-Rot wurde verwendet, um als kationische Färbung negativ geladene Polysaccharide innerhalb der GCX zu binden und mit Glutaraldehyd/Osmiumtetroxid elektronendicht zu fixieren. Als Resultat war eine 20 nm dünne Schicht auf der endothelialen Zelloberfläche erkennbar. Es folgten weitere Arbeiten, in denen die GCX mit einer Größe von 20-40 nm auf humanen mikrovaskulären Endothelzellen und bovinen Aortenendothelzellen (BAEC) in vitro dargestellt wurde [102, 103]. Hämodynamische Messungen ließen jedoch bereits früher die Existenz einer größeren (1,2 µm) Plasma-Schicht in mikrovaskulären Gefäßen vermuten [104].

Später wurde Lanthannitrat zur Stabilisierung und Alcian-Blau anstelle von Ruthenium-Rot verwendet, um negativ geladene Strukturen effizienter zu festigen und besseren Zugang zur GCX zu erhalten. Mit dieser Fixiertechnik konnte eine 850 nm große GCX auf humanen Aortenendothelzellen mittels TEM dargestellt werden [105]. Trotzdem indizierten mehrere Studien eine größere GCX in vivo (4,5 µm), sodass die GCX auf in vitro kultivierten Zellen deutlich kleiner geschätzt wurde [106, 107].

Ebong et al. gelang es 2011, die GCX von in vitro kultivierten BAEC mit einer Kryofixierung aus *Rapid Freezing* und nachfolgender Gefriersubstitution (RF/FS) in einer Größe von über 11 μm zu erhalten und mittels TEM darzustellen [100]. Die BAEC wurden mit dieser Technik innerhalb von Millisekunden in flüssigem Stickstoff eingefroren, sodass keine Bestandteile der GCX durch Dehydrierung verloren gingen. Die anschließende Gefriersubstitution mit Aceton ermöglichte einen langsamen Austausch des nicht kristallförmig gefrorenen Wassers bei allmählichem Temperaturanstieg, sodass eine Konservierung zellulärer Strukturen in natürlichem Zustand gewährleistet wurde [100].

Vor diesem Hintergrund sollte eine geeignete Fixiertechnik zur Darstellung der GCX in vitro kultivierter Zellen (EA.hy926 und THP-1 Monozyten) etabliert werden. Ein wichtiges Kriterium war die GCX in ihrer vollen Größe sowie möglichst unverändert zu erhalten, um anschließend die Interaktion von GCX und MNP analysieren zu können. Dazu wurde einerseits die chemische Fixierung (Glutaraldehyd/Alcian Blau/Lanthannitrat), andererseits die Hochdruckeinfrierung mit anschließender Gefriersubstitution (HPF/FS) verwendet.

Die GCX von humanen EA.hy926 Zellen wurde mit beiden Fixiertechniken (chemisch/physikalisch) mittels TEM visualisiert (Abbildung 8). Deutliche Unterschiede in Struktur und Größe der GCX zeigten sich zwischen den gewählten Fixiertechniken. Nach Fixierung mit Glutaraldehyd/Alcian Blau/Lanthannitrat war eine 50 nm große elektronendichte Schicht auf der Zelloberfläche erkennbar. Dieses Ergebnis war mit anderen TEM-Untersuchungen von in vitro kultivierten Endothelzellen nach chemischer Fixierung vergleichbar [102, 103, 107, 108].

Nach Fixierung mit HPF/FS war die endotheliale GCX hingegen deutlich größer ($>10 \mu\text{m}$) erhalten und auf der Zelloberfläche als grobmaschiges Netz mit langen fadenähnlichen Ausläufern am zellfernen Rand erkennbar. Dieser Effekt wurde auch von Ebong et al. beschrieben, sodass Strukturen im Zusammenhang mit der GCX fast hundertfach größer dargestellt werden konnten als nach chemischer Fixierung [100].

Die geringere Ausdehnung der chemisch fixierten endothelialen GCX lässt sich mit aller Wahrscheinlichkeit auf die Dehydrierung zurückführen [100]. Die fragile Struktur wird durch den schnellen Wasserentzug mit alkoholhaltigen Fixiermitteln zerstört [109]. Lösliche Bestandteile innerhalb der stark hydratisierten GCX sind über Membran-

verankerte Proteoglykane mit der Zelloberfläche verbunden [23], die nach Dehydrierung verloren gehen. Der Wasserentzug resultiert zudem in einer Kondensierung ursprünglich hydratisierter Teile der GCX [110, 111]. Infolge der partiellen Zerstörung ist nach chemischer Fixierung nur ein schmaler, elektronendichter Streifen auf der Oberfläche der Zellen erkennbar. Dieser Effekt wurde nach chemischer Fixierung der bakteriellen GCX beobachtet, sodass eine Stabilisierung nur durch ausreichend eingelagerte Proteine innerhalb der GCX oder durch eine feste Verankerung in der Umgebung erreicht werden kann [111].

Nach der Gefriersubstitution erfolgte kein Kollaps der GCX durch Komprimierung, obwohl hydratisierte Strukturen durch eine Mischung aus Aceton und Osmiumtetroxid ebenfalls dehydriert und endgültig fixiert werden. Ursächlich dafür schien die Einlagerung stabilisierender Proteine während der Hochdruckeinfrierung zu sein, die durch den Austausch von kristallfreiem Eis mit einem organischen Lösungsmittel fixiert werden. Diese Erklärung wird von Arbeiten vertreten, die nach Serumentzug einen kompletten Verlust der zellulären GCX zeigten [100, 112]. Auch intrazelluläre Strukturen werden während der Kryofixierung durch Osmiumtetroxid besser erhalten, da bei konventioneller Fixierung die Penetration der Zellmembran von Osmiumtetroxid limitiert ist [113].

Die dargestellte Größe der GCX muss dennoch kritisch hinterfragt werden, da der Einfluss von eingefrorenen Serumproteinen nicht vernachlässigt werden darf. Diese dienen zwar einerseits der Stabilisierung hydratisierter Strukturen innerhalb der GCX [111], könnten sich jedoch zusätzlich während der Hochdruckeinfrierung auf bestehende Strukturen auflagern und somit die GCX artifiziell vergrößern. Dieser mögliche Effekt ist bislang noch nicht hinreichend untersucht.

Auch wenn in-vitro-Versuche mit Endothelzellen die in-vivo-Situation des vaskulären Systems nicht vollständig abbilden, so existieren in-vivo-Daten, welche die Größe der endothelialen GCX im gleichen Mikrometerbereich schätzten [114]. Mithilfe einer kombinierten Fluoreszein/Indocyaningrün-Angiographie wurden retinale Gefäße untersucht und eine durchschnittlich 8,89 μm große GCX bei gesunden Probanden gemessen [114].

Letztlich erwies sich, dass einzig die aufwendige Technik HPF/FS geeignet ist, um die GCX von in-vitro-kultivierten Zellen zu erhalten und mittels TEM analysieren zu können.

Nachteile dieser Methode sind hohe Kosten und die Verfügbarkeit von speziellen Hochdruckeinfriergeräten [1].

4.1.2 Interaktion von MNP und GCX

Die Ergebnisse früherer Versuche führten zu der Hypothese, dass Citrat-beschichtete VSOP mit der GCX von THP-1 Monozyten wechselwirken [91]. Die Interaktion von VSOP mit der GCX von nichtadhärenten THP-1 Zellen konnte nun mittels TEM erstmalig visuell dargestellt werden. Nach 3 min Inkubation mit VSOP waren die MNP bereits innerhalb der GCX von THP-1 Monozyten erkennbar (3.1.2). Zudem waren nach kurzer Zeit VSOP-Cluster an der Zellmembran und beginnende Endozytose-Vorgänge zu beobachten. Nach längeren Inkubationszeiten (30 min, 180 min) waren VSOP sowohl in membranumschlossenen Vesikeln innerhalb der Zelle als auch extrazellulär mit Bestandteilen der GCX assoziiert. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass einerseits komplexe Wechselwirkungen der MNP mit Strukturbestandteilen der GCX vorliegen, andererseits ein Teil der MNP die GCX passiert und nach kurzer Zeit über die Zellmembran via Endozytose aufgenommen wird.

Polyanionische GAGs der GCX könnten aufgrund der negativen Ladung ihrer Carboxyl- und Sulfatgruppen eine entscheidende Rolle bei der Interaktion mit Citrat-beschichteten MNP spielen. Unterstützt wird diese Theorie von Beobachtungen zur Wechselwirkung von Hyaluronsäure und Citrat-beschichteten Gold-Nanopartikeln. Hier vermuteten die Autoren, dass die stark negativ geladene Hyaluronsäure aufgrund ihrer hohen Affinität zum Goldkern der Partikel die stabilisierende Citrat-Hülle verdrängt [115]. Dies würde die Anlagerung der MNP an anionische Bestandteile der GCX trotz negativ geladener Hülle erklären.

Die Interaktion der GAGs mit der Citrat-Hülle wurde auch in anderen Untersuchungen hervorgehoben. Die Inhibition der GAG-Synthese durch Glucose-Deprivation führte zu einer signifikant geringeren Aufnahme von elektrostatisch-stabilisierten VSOP in THP-1 Monozyten [91]. Nach Inhibierung der GAG-Synthese kam es hingegen nicht zu einer reduzierten Aufnahme des sterisch-stabilisierten MNP Resovist, dessen Hülle sich aus einem funktionellen Polymer (Carboxydextran) zusammensetzt [91]. Auch in immortalisierten Mäuschern-Endothelzellen war die zelluläre Aufnahme von VSOP nach enzymatischer Degradation der GAGs signifikant verringert [90]. Ferner lagerten sich

kationische Nanopartikel, die für eine Perfusionsbildgebung im Tiermodell verwendet wurden, ebenfalls in der GCX des Kapillarsystems der Lunge an [116].

Ob die GCX die Aufnahme von MNP begünstigt oder inhibiert, scheint von verschiedenen Faktoren, insbesondere von der Größe, der Beschichtung und der Ladung der MNP, aber auch von der spezifischen Struktur der GCX abhängig zu sein [117-120]. Beobachtungen zur Funktion der GCX als Regulator der zellulären Aufnahme finden sich in Arbeiten, die vor allem Polymer-beschichtete Nanopartikel untersuchten. Diese Studien heben besonders die Degradation der GCX als Ursache für die zelluläre Internalisierung von sterisch-stabilisierten Nanopartikeln hervor. Eine Degradation der endothelialen GCX führte demnach zu einer stark erhöhten Aufnahme von *Quantumdots* mit funktionellen Carboxylgruppen in Endothelzellen aus dem Kremastermuskel der Maus [120]. Weitere Daten einer in-vitro-Untersuchung zeigten gleichfalls eine gesteigerte Partikelaufnahme nach Zerstörung der GCX von HUVEC [118]. Auch kleinere PEG-beschichtete Goldnanopartikel wurden vermehrt von Endothelzellen aus den Fettdepots von Ratten aufgenommen [117]. Im Gegensatz dazu finden sich auch in-vitro-Ergebnisse, die keine erhöhte Aufnahme von Polymer-beschichteten (PEG) Goldnanopartikeln in Endothelzellen des Gehirns und eine reduzierte Aufnahme in Endothelzellen der Niere zeigten [121]. Als mögliche Erklärung wird in der Arbeit eine verringerte Endozytose-Rate aufgeführt, die durch die Zerstörung von Vesikel-bildenden Mikrodomänen nach enzymatischer Degradation der GCX verringert ist [121].

Zuvor diskutierte Ergebnisse lassen sich aufgrund der weitaus größeren Hülle Polymer-beschichteter Partikel dennoch nicht ohne Weiteres auf Citrat-beschichtete MNP übertragen. Eine deutlich effizientere Aufnahme von anionischen MNP gegenüber den Polymer-beschichteten MNP Resovist (Carboxydextran) und Sinerem (Dextran) konnte in Tumorzellen sowie mesenchymalen Stammzellen gezeigt werden [122, 123]. Die Eigenschaften Citrat-beschichteter MNP könnten sich als Vorteil gegenüber vielfach verwendeten sterisch-stabilisierten MNP erweisen, um atherosklerotische Plaques darzustellen. Nicht nur die schnellere und effizientere Aufnahme in Zellen, sondern auch die Markierung alcianophiler Mikrovesikel innerhalb atherosklerotischer Läsionen, die mit einer Zerstörung der Gefäßwand assoziiert sind, könnten die Verwendung der Citrat-beschichteten MNP als Tracer hervorheben [53, 54]. Zusätzlich zeigten zuvor genannte experimentelle Arbeiten, dass die GCX eine Barriere für Polymer-beschichtete Partikel mit funktionellen Carboxylgruppen darstellt [117, 118, 120]. Die Aufnahme

elektrostatisch-stabilisierter MNP wird durch die Wechselwirkung mit der GCX eher begünstigt [90, 91, 115].

Unterschiede in der Natur der Nanopartikel-GCX-Interaktion können auch zelltypspezifisch sein. In vorliegender Arbeit wurden THP-1 Monozyten verwendet, während zuvor genannte Arbeiten vorwiegend Endothelzellen untersuchten [117, 118, 120]. Neben der unterschiedlichen Partikel-Beschichtung könnte dies eine weitere Erklärung für die unterschiedliche Wechselwirkung der GCX mit den MNP sein. Die Synthese großer Mengen an membrangebundenen und extrazellulären Proteoglykanen wie Versican und Perlecan ist charakteristisch für THP-1 Monozyten [124]. Die polyanionischen GAGs könnten durch schnelle Bindung und Aggregation der MNP die Aufnahme Citrat-beschichteter MNP noch beschleunigen und somit verbessern, ähnlich wie für die Aggregation von Goldnanopartikeln beschrieben, die zu einer vermehrten Aufnahme in Zellen führte [125]. Untersuchungen der Nanopartikelwechselwirkung mit Endothelzellen aus unterschiedlichen Organen und Gefäßabschnitten sind wichtig, da sich die Endothelzellen in ihrer Struktur und Funktion maßgeblich unterscheiden [120, 126].

Die Existenz von Poren innerhalb der GCX mit einer Größe von sieben bis acht Nanometern wird diskutiert [26, 117]. MNP mit kleinerem Durchmesser könnten demnach einfach durch die GCX diffundieren. Auch die Penetration der GCX von fluoreszierenden Dextran-Molekülen ist abhängig von ihrer Größe [127]. Beobachtungen zufolge wurden größere Moleküle (148 kDa) vollständig abgehalten, während mittelgroße (50,7 kDa) nach 30 min durch die visköse Schicht diffundierten, aber nicht internalisiert wurden. Kleine Moleküle hingegen wanderten sehr schnell durch die GCX und wurden innerhalb von einer Minute in die arterielle Gefäßwand aufgenommen (4,4 kDa) [127].

Mit einem hydrodynamischen Durchmesser von neun bis elf Nanometern besitzen VSOP eine Größe, die den Durchtritt durch kleine Poren innerhalb der GCX erleichtern könnte. In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung von Interesse, dass eine zelluläre Aufnahme von VSOP *in vitro* vor allem nach vorangegangener Kultivierung mit gestörten Flussbedingungen erfolgte [89, 90]. Nach Kultivierung unter laminarem Fluss und Einwirkung gleichförmiger Scherkräfte wurden die Citrat-beschichteten MNP hingegen nicht aufgenommen. Gestörte Flussbedingungen führen zu einer Degradation der GCX und endothelialen Dysfunktion [128]. Laminare Scherkräfte hingegen könnten maßgeblich die flussabhängige Struktur der GCX und somit die Größe von Poren

beeinflussen. Dementsprechend wurde gezeigt, dass die Dichte der GCX am größten und kontinuierlichsten unter laminarem Fluss ist und die Aufnahme von Ox-LDL verringert wird [129].

Diese Beobachtungen könnten auch auf die in-vivo-Situation übertragen werden, da die Entstehung von atherosklerotischen Plaques vor allem an prädisponierten Stellen im Gefäß stattfindet, die gestörten Flussbedingungen unterliegen [11, 12]. Die Anreicherung von VSOP in atherosklerotischen Plaques an prädisponierten Stellen im Gefäß konnte in-vivo und ex-vivo mehrfach gezeigt werden [53, 54, 89, 90]. Autoren berichten zudem über Unterschiede in der in-vivo-Aufnahme von sogenannten *Quantumdots* in Abhängigkeit des Gefäßabschnittes. So konnte in Kapillaren trotz dichter endothelialer GCX die Aufnahme von Nanopartikeln bestätigt werden [120]. Dieser Effekt könnte auch auf eine verringerte Blutflussgeschwindigkeit zurückgeführt werden, die eine vermehrte Interaktion der Nanopartikel mit der Zelloberfläche ermöglicht [120, 130]. Carboxyl-beschichtete *Quantumdots* binden zudem an mit Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1) beschichtete Oberflächen unter Fluss [120]. So könnte eine degradierte GCX, die im gesunden Gefäßabschnitt eine Bindung an Adhäsionsmoleküle verhindert, die Anheftung an ICAM-1 und VCAM-1 der MNP verstärken [120].

4.1.3 Funktionelle Veränderungen der magnetischen Eigenschaften von MNP nach Zellkontakt

Es wurde beobachtet, dass sich die magnetischen Eigenschaften von MNP nach Kontakt mit biologischem Material verändern können. Das hat maßgeblichen Einfluss auf die Detektierbarkeit und Quantifizierbarkeit von MNP mittels MPS und MPI im biologischen System. Diese Ergebnisse stehen mit vorangegangenen Arbeiten im Einklang, die das MPS-Signal von zellassozierten MNP untersuchten [77, 79, 81]. Mit einer kontinuierlichen MPS-Messung konnte die Veränderung der magnetischen Eigenschaften von VSOP nach Kontakt mit THP-1 Monozyten nahezu in Echtzeit bestimmt werden. Es zeigte sich ein deutlicher Anstieg des A_5/A_3 -Verhältnisses bereits wenige Sekunden nach Zellkontakt (3.2.2). Nach Zugabe von VSOP in PBS fand sich hingegen keine signifikante Veränderung des A_5/A_3 -Verhältnisses über die gesamte Messdauer von etwa zwölfminhalb Minuten.

Auffällig war die vergleichsweise höhere Standardabweichung der ersten Messzeitpunkte, die zum Ende deutlich geringer wurde. Dies lässt sich durch die

kürzeren Messintervalle am Anfang erklären. Kurze Messzeiten wurden bewusst zu Beginn der kontinuierlichen MPS-Messung gewählt, um in kurzem Abstand die magnetischen Veränderungen der MNP nahezu in Echtzeit zu detektieren. Die Messintervalle wurden für spätere Zeitpunkte erhöht, sodass eine größere Messgenauigkeit erreicht werden konnte.

Die magnetischen Eigenschaften der MNP sind von einer Vielzahl von Faktoren wie der Größe, Zusammensetzung und Struktur des Eisenkerns sowie der Bestandteile und Ladung der Hülle abhängig [57, 60]. Nach Kontakt mit einem biologischen Medium bildet sich eine Korona aus Biomolekülen um die Nanopartikel, die aus Proteinen, Kohlenhydraten und Lipiden bestehen kann [131, 132]. Weitere mögliche Veränderungen wie Immobilisierung, Aggregation oder der Zerfall nach Wechselwirkung mit biologischem Material beeinflussen zusätzlich die magnetischen Eigenschaften der Nanopartikel [133].

Eine mögliche Ursache für die Veränderung der magnetischen Eigenschaften ist die zuvor diskutierte Interaktion mit Bestandteilen der GCX. Der Kontakt von polyanionischen GAGs mit VSOP könnte die schnelle Veränderung des A_5/A_3 -Verhältnisses bewirken. Diese Hypothese wird von Ergebnissen unterlegt, die eine Veränderung der magnetischen Eigenschaften von Resovist und Feraheme nach Inkubation mit GAGs zeigten [94]. Die Wechselwirkung der Eisenkerne mit den GAGs kann zu einer Aggregation von VSOP in der GCX führen, wie in Abbildung 9 sichtbar war. Ähnliche Beobachtungen lieferten Aggregationsexperimente mit VSOP in einer Kochsalzlösung [81]. Infolge der Zusammenlagerung besonders kleiner MNP stieg das gemessene A_5/A_3 -Verhältnis mit zunehmender Salzkonzentration in der Lösung an [81].

Interessanterweise kann für VSOP ein Anstieg des A_5/A_3 -Verhältnisses beobachtet werden, wohingegen für viele andere MNP nach Zellaufnahme oder zunehmender Aggregation eine Abnahme erfasst wurde. Dieser Zusammenhang kann mit der Größe der MNP erklärt werden. Größere MNP haben in der Regel ein höheres magnetisches Moment mit größerem A_5/A_3 -Verhältnis und sind dadurch besser geeignet für die MPI. Bei Aggregation nehmen magnetische Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen den MNP zu, sodass eine im Vergleich zu nicht interagierenden MNP geringere Frequenzantwort sowie ein geringeres A_5/A_3 -Verhältnis resultieren. Dagegen können magnetische Dipol-Dipol-Interaktionen bei deutlich kleineren MNP wie VSOP zu einer Verstärkung der Frequenzantwort führen. In numerischen Simulationen war zudem die Frequenzantwort abhängig von der Anisotropie der MNP. Magnetische Dipol-Dipol-

Wechselwirkungen können demnach also in einem gesteigerten oder verringerten A_5/A_3 -Verhältnis resultieren [1, 134, 135].

Das A_5/A_3 -Verhältnis von VSOP stieg kontinuierlich über die gesamte Messdauer an. Dies kann durch Bindung einer zunehmenden Zahl von MNP an Zellstrukturen erklärt werden, die eine Veränderung der physikochemischen Eigenschaften gebundener MNP bewirken. Das gemessene A_5/A_3 -Verhältnis setzt sich aus dem Signal der freien und zellassoziierten MNP zusammen. Diese Beobachtungen sind auch für MPI relevant. So könnte die messbare Veränderung des A_5/A_3 -Verhältnisses nach Zellkontakt eine funktionelle Bildgebung ermöglichen, die es erlaubt den Zustand von MNP (gebunden/ungebunden) in einem biologischen System genau abzubilden. Eine präzise Aussage über die Lokalisation und Ankunft in der Zielregion von MNP könnte getroffen werden. Mit einer Rekonstruktion von zwei unterschiedlichen Kalibriermessungen, die eine Probe aus freien und eine Probe aus gebundenen MNP enthält, kann diese Vorstellung realisiert werden, sodass eine klare Unterscheidung zwischen freien und zellgebundenen MNP getroffen werden kann. Erste Versuche mit Citrat-beschichteten MNP geben einen Ausblick auf die potenziellen Möglichkeiten dieser funktionellen Bildgebung [136, 137].

4.2 FluidMAG-CT50 als potenzieller MPI-Tracer für die Bildgebung der Atherosklerose

Die präklinische Entwicklung und Testung von geeigneten MNP ist Voraussetzung für die Anwendung von MPI als neue potenzielle Bildgebung der Atherosklerose. Citrat-beschichtete MNP wie VSOP wurden bereits in Tiermodellen erfolgreich eingesetzt, um atherosklerotische Plaques im MRT zu detektieren [53, 54, 89]. Die magnetischen Eigenschaften von VSOP sind jedoch nicht für eine Anwendung im MPI geeignet. MNP mit einem größeren Eisenkern, wie Citrat-beschichtete fluidMAG-CT50-Partikel, sind aufgrund der stärkeren Signalintensität im MPI potenziell besser einsetzbar [58].

Eine wichtige Voraussetzung für die Verwendung der MNP ist die effektive Aufnahme in Zellen. In anderen Arbeiten wurde gezeigt, dass fluidMAG-CT50 von mesenchymalen Stammzellen nach 24 h Inkubation effektiver aufgenommen werden als polymerbeschichtete MNP vergleichbarer Größe [138]. Auch humane respiratorische Epithelzellen konnten mit -CT50 markiert werden [139]. FluidMAG-CT50 wird demnach

von verschiedenen Zellen aufgenommen. Die Aufnahmeeffektivität von -CT50 variierte zwischen den Zellarten und ist vermutlich zelltypspezifisch wie für andere Nanopartikel bereits nachgewiesen wurde [140].

In vorliegender Arbeit konnte gezeigt werden, dass Endothelzellen (EA.hy926) mit fluidMAG-CT50 effektiv markiert werden können. Nach 1 h Inkubation ($c(\text{Fe}) = 0,5 \text{ mmol/l}$) waren 39 pg Fe mit einer einzelnen Endothelzelle assoziiert (Abbildung 12). Die zellassoziierte $m(\text{Fe})$ nahm über den Inkubationszeitraum von 1-6 h leicht zu, obwohl die Endothelzellen nur für 1 h mit -CT50 beladen und freie, nicht gebundene MNP anschließend entfernt wurden. Dieser Effekt zeigte sich wahrscheinlich aufgrund freier MNP, die trotz der Waschschriffe am Boden der 6-Wellen haften blieben und schließlich nach längerer Inkubationszeit von den Zellen internalisiert wurden. Nach 24 h sank infolge einer größeren Gesamtzellzahl durch Zellteilung die zellassoziierte $m(\text{Fe})$ pro Zelle wieder.

Eine weitere Voraussetzung für die Verwendung von fluidMAG-CT50 ist die präferenzielle Anreicherung der MNP im atherosklerotischen Gewebe. In einem in-vitro-Flusskammermodell konnte die verstärkte Anreicherung von fluidMAG-CT50 unter proatherogenen Bedingungen in Abhängigkeit der vorangegangenen Kultivierung (S vs. LF) in HUVEC gezeigt werden (3.3.2). In S-HUVEC war eine signifikant höhere Aufnahme von -CT50 gegenüber LF-HUVEC zu beobachten. Diese Ergebnisse sprechen für eine potenzielle Anreicherung von -CT50 in atherosklerotischen Plaques, was eine bildgebende Darstellung der Läsionen ermöglichen könnte.

Die Aufnahme von MNP in Abhängigkeit der vorangegangenen Kultivierungsbedingungen wurde erst in sehr wenigen Studien untersucht [89, 90]. In diesen wurde ebenfalls eine starke Anreicherung von Citrat-beschichteten VSOP nach statischer Kultivierung beobachtet. In anderen Arbeiten wurde die Internalisierung von MNP in Endothelzellen nur in Abhängigkeit der Inkubationsbedingungen geprüft, indem alle Zellen statisch kultiviert wurden. Dort konnte einerseits keine erhöhte endotheliale Aufnahme von MNP in Abhängigkeit der Inkubation (LF vs. gestörte Flussbedingungen) beobachtet werden, andererseits eine deutliche Verringerung von Quantumdots und Polystyren-Nanopartikeln mit zunehmendem Scherstress [141-143]. In vorliegender Arbeit hingegen wurden HUVEC für drei Tage einem LF ausgesetzt, um die Genexpression und den Phänotyp nachhaltig zu verändern [144].

Die Aufnahme unter proatherogenen Bedingungen indizierte die potenzielle Eignung von fluidMAG-CT50 für die Bildgebung der Atherosklerose. Tatsächlich konnten fluidMAG-CT50-markierte EA.hy926 Zellen mittels MPI dargestellt werden. Die festgelegte und gemessene Detektionsgrenze von fluidMAG-CT50 markierten EA.hy926 Zellen (9 pg Fe/Zelle) lag bei etwa 15.500 Zellen. Oberhalb dieser Detektionsgrenze bestand ein linearer Zusammenhang zwischen Zellzahl und MPI-Signalstärke, was eine Voraussetzung für die Quantifizierung der zellassozierten $m(\text{Fe})$ ist. Ferner könnte bei einer höheren $m(\text{Fe})$ pro Zelle die Detektionsgrenze weiter gesenkt werden. In einer anderen Arbeit korrelierte das MPI-Signal von Resovist ebenfalls mit der Zellzahl von humanen embryonalen Stammzellen [83, 84].

Das Detektionslimit ist abhängig von der Weiterentwicklung des MPI-Scanners und der verwendeten MNP. Ein Detektionslimit von fünf Nanogramm Eisen in vitro wurde kürzlich für einen MPI-Scanner mit einer alternativen Empfängerspule angegeben, sodass bei einer höheren Beladung von 50 pg Fe/Zelle eine theoretische Detektionsgrenze von 100 Zellen erreicht werden könnte [145]. Diese Ergebnisse zeigen, dass MPI das Potenzial zur Detektion und Quantifizierung inflammatorisch aktivierter Endothelzellen und Plaque-Makrophagen in vivo besitzt.

Die räumliche Auflösung des MPI-Signals im Zielgewebe war ein weiteres Kriterium für die Verwendung von fluidMAG-CT50 als Tracer. Nach Einbettung von Zellspots in Phantome, die einen Gefäßquerschnitt repräsentierten, konnte zwischen nebeneinander lokalisierten Zellspots in der rekonstruierten bildlichen Darstellung unterschieden werden (3.3.4). Die Zellspots waren als eigenständige Punkte bei einem Abstand von 5 mm zu erkennen und konnten quantifiziert werden. Ähnliche Ergebnisse finden sich in einer Arbeit, in der humane embryonale Stammzellen in einem Acryl-Phantom im MPI mit Resovist visualisiert wurden. Das MPI-Signal der Zellspots korrespondierte linear mit der assoziierten $m(\text{Fe})$ und ermöglichte eine quantitative Bildgebung [146]. Die maximale räumliche Auflösung der MPI ist abhängig von den verwendeten MNP. Nach Einsatz von 15 nm großen MNP konnte bereits eine räumliche Auflösung von 1,2 mm erreicht werden [147].

Zusammenfassend wurde eine potenzielle Eignung von Citrat-beschichteten MNP wie fluidMAG-CT50 als Tracer für die Bildgebung der Atherosklerose nachgewiesen. Die Durchführung von in-vivo-Untersuchungen ist notwendig, um eine Anreicherung in atherosklerotischen Plaques zu bestätigen. Nach weiterer technischer Verbesserung

einzelner Komponenten sowie der Entwicklung eines klinischen MPI-Scanners könnte die präzise quantitative Analyse von atherosklerotischen Läsionen mithilfe der MPI weitere Möglichkeiten bieten, vulnerable Plaques anhand aufgenommener MNP zu charakterisieren [148, 149].

4.3 Sterisch-stabilisierte fluidMAG-MNP als potenzielle MPI-Tracer

Die Untersuchung sterisch-stabilsierter fluidMAG-MNP erfolgte, um weitere potenzielle Tracer anhand ihrer Aufnahme in Endothelzellen in Abhängigkeit der Kultivierungsbedingungen (S vs. LF) zu charakterisieren. Diese MNP weisen ähnliche magnetische Eigenschaften wie fluidMAG-CT50 auf, sind jedoch anders beschichtet (Tabelle 1). Alle drei getesteten MNP sind durch eine Hülle stabilisiert, die sich aus einer stärkehaltigen Matrix und angefügten funktionellen Gruppen zusammensetzt. Die MNP fluidMAG-Q50 und -DEAE50 sind beide mit kationischen Aminogruppen funktionalisiert, wohingegen -DXS50 mit anionischen Sulfatgruppen ausgestattet ist. Die fluidMAG-Partikel-DXS50, -Q50 und -DEAE50 wurden alle stärker in S-HUVEC als in LF-HUVEC aufgenommen und ähnelten somit dem Aufnahmeverhalten von -CT50 und VSOP. Die Unterschiede waren jedoch nur für -Q50 statistisch signifikant ($p < 0,05$). Nach 3 h Inkubation waren die MNP mit positivem Zetapotenzial deutlich stärker mit den Zellen assoziiert als -DXS50 mit negativem Zetapotenzial. Die Aufnahme von -DXS50 war demnach sowohl nach Analyse der Berliner-Blau-gefärbten Areale als auch nach MPS-Quantifizierung zellassoziierter MNP deutlich geringer als die Aufnahme der fluidMAG-MNP mit positiver Ladung.

Eine mögliche Erklärung könnte in der zuvor diskutierten Wechselwirkung zwischen negativ geladener GCX und der Hülle der MNP liegen. Elektrostatische Abstoßungskräfte zwischen negativ geladenen GAGs und der anionischen Hülle könnten eine Anreicherung von fluidMAG-DXS50 an der Zelloberfläche erschweren. Große Moleküle wie z.B. Dextran werden zusätzlich eher von der Oberfläche endothelialer Zellen ferngehalten [150]. Anders als Citrat-beschichtete MNP (-CT50) besitzt -DXS50 eine Hülle aus Dextransulfat, die eine Wechselwirkung des positiv geladenen Eisenkerns mit GAGs der GCX möglicherweise sterisch verhindert.

Die positiv geladenen MNP -Q50 und -DEAE50 wurden auch in mesenchymale Stammzellen gut aufgenommen [151]. Auffällig war die hohe Standardabweichung der quantifizierten $m(\text{Fe})$ pro Zelle nach Inkubation mit -Q50 und -DEAE50 in vorliegender und genannter Arbeit. Diese Beobachtungen deuten auf eine große Variabilität an gebundenen MNP pro Zelle hin. Instabile MNP können teilweise verklumpen und als große Agglomerate an den Zellen hängen bleiben. Unterstützt wird diese These von Arbeiten, die eine starke Aggregation von -DEAE50 und -DXS50 in Zellkulturmedium sowie einer physiologischen Pufferlösung zeigten [152, 153].

Auch fluidMAG-PEI, das ähnlich wie fluidMAG-Q50 ein stark positives Zetapotenzial besitzt, aggregierte in einer elektrolytreichen Lösung [153]. Die stabilisierende Hülle war demnach nicht dicht oder groß genug, um in einem Medium mit großer Ionenstärke die anziehenden van-der-Waals-Kräfte und die Interaktion magnetischer Dipole auszugleichen [153]. Weitere Bestätigung für diese Hypothese fand sich in den lichtmikroskopischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit, die nicht nur perinukleär-internalisierte, sondern auch großflächig zusammengelagerte -Q50- und -DEAE50-Partikel auf der Zelloberfläche zeigten.

Die Ergebnisse der Charakterisierung offenbarten deutliche Unterschiede zwischen den magnetischen Eigenschaften der MNP vor und nach Zellkontakt (Tabelle 1). Das A_5/A_3 -Verhältnis verringerte sich bei allen untersuchten MNP ausgenommen VSOP. Eine Erklärung dafür liefert die Größe der MNP. Der Eisenkern der Multikernpartikel (fluidMAG) ist deutlich größer als von VSOP. Bei Aggregation der MNP nach Zellbindung, kann die Zusammenlagerung durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zu einer geringeren Frequenzantwort führen, wie in 4.1.3 diskutiert wurde. Die optimale Größe für einen MPI-Tracer wird bei 25-30 nm vermutet [154].

Ein verringertes A_5/A_3 -Verhältnis war ebenfalls bei Resovist nach Zellbindung zu erkennen. Auch andere Untersuchungen zeigten ein verringertes magnetisches Signal von MNP nach Zellbindung/Kontakt mit biologischem Material [94, 146]. Für das starke Signal von Resovist sind nur 30% der Partikel mit einer durchschnittlichen Größe von 22 nm verantwortlich [155]. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Wichtigkeit von Untersuchungen magnetischer Nanopartikel nach Zellkontakt und -aufnahme, um einen geeigneten MPI-Tracer zu finden.

Letztlich könnte FluidMAG-DXS50 neben Resovist als potenzieller MPI-Tracer die beste Auflösung nach Zellkontakt haben. Durch seine vergleichsweise geringe Aufnahme in Zellen ist -DXS50 anderen MNP wie fluidMAG-CT50 jedoch unterlegen. Aufgrund des guten A_5/A_3 -Verhältnisses von -CT50 nach Zellbindung und der Neigung von -Q50 und -DEAE50 teilweise große Agglomerate in biologischen Medien zu bilden, ist der Citratbeschichtete MNP als MPI-Tracer scheinbar am besten geeignet.

4.4 Transienter oxidativer Stress und Zellviabilität nach Inkubation mit MNP

Hauptrisikofaktoren der Atherosklerose führen zu erhöhtem oxidativem Stress in Endothelzellen. Die vermehrte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies steigert die Expression von Adhäsionsmolekülen, wirkt apoptotisch auf das Endothel, führt zu einem Anstieg von Matrixmetalloproteasen im umliegenden Gewebe und fördert auf diese Weise die Atherogenese [2, 3, 156, 157]. Durch die Reaktion von freien Eisen-Ionen und Wasserstoffperoxid können Hydroxylradikale gebildet werden, die zu einer Oxidierung organischer Biomoleküle führen. Als potenzielle Tracer werden MNP vor allem in atherosklerotischen Plaques angereichert, prozessiert und in Form von Ferritin gespeichert [72]. Bei einer möglichen Freisetzung von freien Eisen-Ionen könnte zusätzlicher oxidativer Stress innerhalb atherosklerotischer Plaques die Progression der Atherogenese weiter vorantreiben. Um die Biokompatibilität zu prüfen, wurde die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in humanen Endothelzellen nach Inkubation mit Citratbeschichteten MNP untersucht.

H₂DCFDA wird als lipophiles Molekül in die Zellen aufgenommen und nach Reaktion mit reaktiven Sauerstoffspezies zu fluoreszierendem DCF umgewandelt [95]. Nach Inkubation mit H₂DCFDA von mit VSOP oder fluidMAG-CT50 beladenen Endothelzellen war sowohl in EA.hy926 als auch in HUVEC ein transienter Anstieg der ROS-Bildung in Form des erhöhten DCF-Levels messbar. Ähnliche Effekte wurden in anderen in-vitro-Untersuchungen mit murinen Makrophagen, humanen mikrovaskulären und zerebralen Endothelzellen nach Inkubation mit MNP beschrieben [158-160].

Der vorübergehende Anstieg der ROS-Bildung könnte durch eine Freisetzung von freien Fe²⁺-Ionen infolge des lysosomalen Abbaus der MNP bedingt sein [161]. Die dadurch induzierte Fenton-Reaktion wird als hauptsächliche Ursache der Bildung von

Hydroxylradikalen betrachtet [162]. Auffällig war zudem, dass der Anstieg des DCF-Levels nach Inkubation mit VSOP in HUVEC bereits früh ein Plateau erreichte, wohingegen nach Inkubation mit fluidMAG-CT50 der höchste Wert erst nach vier Stunden gemessen wurde. Dies könnte durch eine langsamere Aufnahme und Biodegradation von fluidMAG-CT50 in der Zelle erklärt werden, welche durch den fünffach größeren hydrodynamischen Durchmesser bedingt sind. Die Biodegradation von internalisierten MNP hat Einfluss auf die Eisenhomöostase der Zelle [72].

Die zelluläre Eisenhomöostase wird hauptsächlich durch die post-transkriptionelle Kontrolle von Eisen-regulierenden Proteinen (IRPs) gesteuert. Bei niedrigem Eisenlevel in der Zelle binden IRPs an auf Eisen-reagierende Elemente (IREs) auf der mRNA und inhibieren die Translation des Speicherproteins Ferritin oder stabilisieren die mRNA des Transferrin-Rezeptors 1 (TfR1). Umgekehrt verlieren IRPs ihre Affinität zu IREs bei einem Eisenüberschuss, sodass eine vermehrte Translation der mRNA in einem erhöhten zellulären Ferritin-Gehalt resultiert [163].

Die Inkubation mit Citrat-beschichteten MNP führte zu einem deutlichen Anstieg der Ferritin-Synthese in Endothelzellen. In HUVEC war nach sechs Stunden bereits ein deutlich stärkeres Signal im *Western Blot* zu erkennen, wohingegen in EA.hy926 Zellen nur einer leichter Anstieg der Ferritin-Expression sichtbar war. Nach 24 h war in beiden Zelllinien eine deutliche Zunahme des Signals zu beobachten, die eine starke Erhöhung der Translation von Ferritin implizierte. Diese Ergebnisse standen im Einklang mit den Beobachtungen, die eine reduzierte Erhöhung des DCF-Levels nach sechs Stunden (HUVEC) bzw. 24 h (EA.hy926) zeigten. Weitere Studien hoben ebenfalls einen starken Anstieg der Ferritin-Synthese nach Inkubation mit MNP in Astrozyten nach einem Tag sowie in Makrophagen nach sechs Stunden hervor [164, 165]. Es wurde geschlossen, dass die Endothelzellen nach Aufnahme der MNP initial vermehrt oxidativen Stress erleben, diesen aber durch eine gesteigerte Synthese des Eisenspeicherproteins Ferritin wieder reduzieren können.

Nach Inkubation mit Citrat-beschichteten MNP war trotz des transienten Anstiegs der ROS-Bildung keine Reduktion der mittels MTT-Tests gemessenen Zellviabilität zu beobachten (Abbildung 20). Die kolorimetrische Messung des Formazan-Levels im MTT-Test muss jedoch kritisch betrachtet werden, da durch die intrazelluläre Aufnahme von MNP die Formazan-Level unter- oder überschätzt werden können [98]. Berridge et al. hielten fest, dass der MTT-Test mehr Auskunft über die Aktivität einer bestimmten

Gruppe von Enzymen als über die konkrete Anzahl lebendiger Zellen gibt [166]. Veränderungen der Aktivität dieser Enzyme sowie metabolische Störungen und oxidativer Stress haben möglicherweise erhebliche Auswirkungen auf die Ergebnisse des MTT-Tests [98]. Die Reduktion von MTT zu Formazan könnte durch die MNP selbst verursacht werden und eine zusätzliche Lichtabsorption durch die MNP eine künstliche Erhöhung des Signals bewirken [167]. Zuletzt genannter Effekt wurde versucht zu minimieren, indem das Hintergrundsignal von Proben, die MTT-Testsubstanz mit MNP ohne Zellen enthielten, von den experimentellen Messungen subtrahiert wurde. Die Ergebnisse vorliegender Arbeit zeigen, dass die Zellviabilität nach Inkubation mit den getesteten MNP sich nicht verringert, die Beobachtungen jedoch durch Schwächen des MTT-Tests limitiert sind.

Auch andere Arbeiten, welche die Zellviabilität über die Zellteilungs- und Apoptose-Rate bestimmten, zeigten, dass die Aufnahme von VSOP in THP-1 Monozyten und Makrophagen keine Zytotoxizität induzierte [81, 91]. Bisherige humane Studien konnten eine hohe Bioverträglichkeit von VSOP feststellen. Nach intravenöser Injektion konnten keine toxischen Auswirkungen beobachtet werden [56]. Seltene Nebenwirkungen in einer klinischen Studie mit Ferumoxtran 10 (Sinerem®) waren Kopfschmerzen, niedriger Blutdruck und das Auftreten allergischer Reaktionen in Form von Urtikaria [168]. Eine Gefahr durch Überdosierung scheint eher gering. Die Gesamtmenge an Eisen im menschlichen Körper beträgt 3500 mg, ist also deutlich größer als eine diagnostische Dosis von 20-50 mg Eisen. Chronische Leberschäden entstehen durch eine Überdosierung von 4 mg Fe/g Lebergewicht [57, 169]. Ein weiterer Vorteil der MNP wäre demnach die hohe Bioverträglichkeit und Anwendbarkeit als Kontrastmittel in einer nicht-invasiven Bildgebung.

4.5 Limitationen

Im Rahmen dieser experimentellen Arbeit finden sich Limitationen, welche die Aussagekraft bestimmter Ergebnisse beeinflussen können. Die Versuche zur Untersuchung der Wechselwirkung der GCX mit MNP waren durch den hohen technischen Aufwand und die Verfügbarkeit von Hochdruckeinfriersystemen sowie die Kosten dieser Methodik limitiert. Daher waren die Ergebnisse aus diesen Versuchen in der Anzahl begrenzt. Die Darstellung der Interaktion von VSOP mit der GCX erfolgte aus denselben Gründen vorrangig über die Visualisierung von THP-1 Monozyten. Ferner war der früheste, darstellbare Zeitpunkt der Wechselwirkung zwischen GCX und VSOP durch die technische Durchführbarkeit auf drei Minuten nach Zugabe der MNP limitiert. In weiteren Untersuchungen soll in Zukunft diese Wechselwirkung auch in Endothelzellen nach Kultivierung unter laminarem Fluss sowie unter proatherogenen Bedingungen untersucht werden.

Auch die kontinuierliche MPS-Messung der magnetischen Eigenschaften von MNP direkt nach Zellkontakt war in der Anwendung auf ein in-vitro-Modell begrenzt. Die spannenden Ergebnisse und Möglichkeiten dieser neu eingesetzten Technik können jedoch in Zukunft direkt auf die MPI übertragen und damit in Versuchsabläufe integriert werden, welche die in-vivo-Situation noch besser abbilden.

Die Aussagekraft der Ergebnisse zur Eignung von FluidMAG-CT50 begrenzen sich ebenfalls auf Beobachtungen in in-vitro-Modellen. Zwar konnten vergleichbare Ergebnisse von Citrat-beschichteten MNP mit ähnlichen Eigenschaften bereits in vivo und in humanen Studien gezeigt werden [55, 56, 89, 90]. Um die Anwendbarkeit von fluidMAG-CT50 zu bestätigen, sind jedoch trotzdem Versuche in einem in-vivo-Modell nötig. Ferner ist die MPI aktuell auf eine präklinische Anwendung beschränkt, sodass die Entwicklung eines klinischen MPI-Scanners eine wichtige Voraussetzung für die translationale Forschung darstellt.

4.6 Ausblick

In vorliegender Arbeit konnten VSOP in Interaktion mit der GCX von THP-1 Monozyten visualisiert werden. Die genauen Mechanismen dieser Wechselwirkung sind jedoch ungeklärt und liefern Raum für weitergehende Untersuchungen. Die Ergebnisse heben zudem die Bedeutung der funktionellen Veränderung der magnetischen Eigenschaften von MNP nach Zellkontakt hervor. Dies stellt einen wichtigen Aspekt für die Entwicklung der MPI zu einer funktionellen Bildgebung dar, in der MNP in Abhängigkeit ihres Zustandes (gebunden/ungebunden) im biologischen Gewebe unterschiedlich visualisiert werden können [137]. Die Untersuchung von fluidMAG-CT50 zeigte die Anwendbarkeit von Citrat-beschichteten MNP als MPI-Tracer, die es in weiterführenden Versuchen im in-vivo-Modell zu prüfen gilt. Zusammenfassend verspricht die Weiterentwicklung von MPI eine aussichtsreiche neue Bildgebungsmethode, die in Zukunft mit der Darstellung von spezifischen Tracern eine nicht-invasive Detektion von vulnerablen atherosklerotischen Plaques ermöglichen könnte.

5 Literaturverzeichnis

1. Poller WC, Lova N, Schleicher M, Munster-Wandowski A, Taupitz M, Stangl V, Ludwig A, Wiekhorst F. Initial interaction of citrate-coated iron oxide nanoparticles with the glycocalyx of THP-1 monocytes assessed by real-time magnetic particle spectroscopy and electron microscopy. *Sci Rep.* 2020;10(1):3591.
2. Ross R. Atherosclerosis — An Inflammatory Disease. *New England Journal of Medicine.* 1999;340(2):115-26.
3. Davignon J, Ganz P. Role of Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis. *Circulation.* 2004;109(23 suppl 1):III-27-III-32.
4. Tsai JC, Perrella MA, Yoshizumi M, Hsieh CM, Haber E, Schlegel R, Lee ME. Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1994;91(14):6369-73.
5. Navab M, Berliner JA, Watson AD, Hama SY, Territo MC, Lusis AJ, Shih DM, Lenten BJ, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Fogelman AM. The Yin and Yang of Oxidation in the Development of the Fatty Streak. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 1996;16(7):831-42.
6. Diaz MN, Frei B, Vita JA, Keaney JFJ. Antioxidants and Atherosclerotic Heart Disease. *New England Journal of Medicine.* 1997;337(6):408-16.
7. Parhami F, Fang ZT, Fogelman AM, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA. Minimally modified low density lipoprotein-induced inflammatory responses in endothelial cells are mediated by cyclic adenosine monophosphate. *Journal of Clinical Investigation.* 1993;92(1):471-8.
8. Steinberg D, Lewis A. Conner Memorial Lecture. *Circulation.* 1997;95(4):1062-71.
9. Jin ZG, Wong C, Wu J, Berk BC. Flow shear stress stimulates Gab1 tyrosine phosphorylation to mediate protein kinase B and endothelial nitric-oxide synthase activation in endothelial cells. *J Biol Chem.* 2005;280(13):12305-9.
10. Chien S. Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: the wisdom of the cell. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292(3):H1209-24.
11. Malek AM, Alper SL, Izumo S. Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *JAMA.* 1999;282(21):2035-42.
12. Zhou J, Li YS, Chien S. Shear stress-initiated signaling and its regulation of endothelial function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34(10):2191-8.

13. Drexler H. Factors involved in the maintenance of endothelial function. *The American Journal of Cardiology*. 1998;82(9, Supplement 2):3S-4S.
14. Galkina E, Ley K. Vascular Adhesion Molecules in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2007;27(11):2292-301.
15. Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: New perspectives and therapeutic strategies. *Nature Medicine*. 2002;8:1249.
16. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1994;14(5):840-56.
17. Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nature Immunology*. 2011;12:204.
18. Falk E. Pathogenesis of Atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;47(8 Supplement):C7-C12.
19. Newby AC. Metalloproteinase Expression in Monocytes and Macrophages and its Relationship to Atherosclerotic Plaque Instability. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2008;28(12):2108-14.
20. Davies MJ. The pathophysiology of acute coronary syndromes. *Heart*. 2000;83(3):361-6.
21. Schaar JA, Muller JE, Falk E, Virmani R, Fuster V, Serruys PW, Colombo A, Stefanadis C, Ward Casscells S, Moreno PR, Maseri A, van der Steen AFW. Terminology for high-risk and vulnerable coronary artery plaques. *European Heart Journal*. 2004;25(12):1077-82.
22. WHO. Causes of Death [Internet]. 2018 [cited 06.05.2020]. Available from: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/causes-of-death/GHO/causes-of-death>.
23. Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MAMJ, oude Egbrink MGA. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflügers Archiv*. 2007;454(3):345-59.
24. Kolarova H, Ambruzova B, Svihalkova Sindlerova L, Klinke A, Kubala L. Modulation of endothelial glycocalyx structure under inflammatory conditions. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:694312.

25. Kogan G, Šoltés L, Stern R, Gemeiner P. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*. 2007;29(1):17-25.
26. Weinbaum S, Zhang X, Han Y, Vink H, Cowin SC. Mechanotransduction and flow across the endothelial glycocalyx. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(13):7988-95.
27. Pahakis MY, Kosky JR, Dull RO, Tarbell JM. The role of endothelial glycocalyx components in mechanotransduction of fluid shear stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007;355(1):228-33.
28. Florian JA, Kosky JR, Ainslie K, Pang Z, Dull RO, Tarbell JM. Heparan Sulfate Proteoglycan Is a Mechanosensor on Endothelial Cells. *Circulation Research*. 2003;93(10):e136-e42.
29. Carey DJ. Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochemical Journal*. 1997;327(Pt 1):1-16.
30. Zeng Y, Waters M, Andrews A, Honarmandi P, Ebong EE, Rizzo V, Tarbell JM. Fluid shear stress induces the clustering of heparan sulfate via mobility of glypican-1 in lipid rafts. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 2013;305(6):H811-H20.
31. Gouverneur M, Van Den Berg B, Nieuwdorp M, Stroes E, Vink H. Vasculoprotective properties of the endothelial glycocalyx: effects of fluid shear stress. *Journal of Internal Medicine*. 2006;259(4):393-400.
32. Vink H, Constantinescu AA, Spaan JAE. Oxidized Lipoproteins Degrade the Endothelial Surface Layer. Implications for Platelet-Endothelial Cell Adhesion. 2000;101(13):1500-2.
33. Henry CBS, Duling BR. TNF- α increases entry of macromolecules into luminal endothelial cell glycocalyx. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2000;279(6):H2815-H23.
34. Fuster V, Moreno PR, Fayad ZA, Corti R, Badimon JJ. Atherothrombosis and High-Risk Plaque: Part I: Evolving Concepts. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005;46(6):937-54.
35. Vancraeynest D, Pasquet A, Roelants V, Gerber BL, Vanoverschelde J-LJ. Imaging the Vulnerable Plaque. *Journal of the American College of Cardiology*. 2011;57(20):1961-79.

36. DeMaria AN, Narula J, Mahmud E, Tsimikas S. Imaging Vulnerable Plaque by Ultrasound. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;47(8, Supplement):C32-C9.
37. Mehta SK, McCrary JR, Frutkin AD, Dolla WJS, Marso SP. Intravascular ultrasound radiofrequency analysis of coronary atherosclerosis: an emerging technology for the assessment of vulnerable plaque. *European Heart Journal*. 2007;28(11):1283-8.
38. Stone GW, Maehara A, Lansky AJ, de Bruyne B, Cristea E, Mintz GS, Mehran R, McPherson J, Farhat N, Marso SP, Parise H, Templin B, White R, Zhang Z, Serruys PW. A Prospective Natural-History Study of Coronary Atherosclerosis. *New England Journal of Medicine*. 2011;364(3):226-35.
39. Sano K, Kawasaki M, Ishihara Y, Okubo M, Tsuchiya K, Nishigaki K, Zhou X, Minatoguchi S, Fujita H, Fujiwara H. Assessment of Vulnerable Plaques Causing Acute Coronary Syndrome Using Integrated Backscatter Intravascular Ultrasound. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;47(4):734-41.
40. Jang I-K, Bouma BE, Kang D-H, Park S-J, Park S-W, Seung K-B, Choi K-B, Shishkov M, Schlendorf K, Pomerantsev E, Houser SL, Aretz HT, Tearney GJ. Visualization of coronary atherosclerotic plaques in patients using optical coherence tomography: comparison with intravascular ultrasound. *Journal of the American College of Cardiology*. 2002;39(4):604-9.
41. Brezinski M, Saunders K, Jesser C, Li X, Fujimoto J. Index Matching to Improve Optical Coherence Tomography Imaging Through Blood. *Circulation*. 2001;103(15):1999-2003.
42. Kubo T, Imanishi T, Takarada S, Kuroi A, Ueno S, Yamano T, Tanimoto T, Matsuo Y, Masho T, Kitabata H, Tsuda K, Tomobuchi Y, Akasaka T. Assessment of Culprit Lesion Morphology in Acute Myocardial Infarction: Ability of Optical Coherence Tomography Compared With Intravascular Ultrasound and Coronary Angioscopy. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007;50(10):933-9.
43. Motoyama S, Sarai M, Harigaya H, Anno H, Inoue K, Hara T, Naruse H, Ishii J, Hishida H, Wong ND, Virmani R, Kondo T, Ozaki Y, Narula J. Computed Tomographic Angiography Characteristics of Atherosclerotic Plaques Subsequently Resulting in Acute Coronary Syndrome. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009;54(1):49-57.
44. Kitagawa T, Yamamoto H, Horiguchi J, Ohhashi N, Tadehara F, Shokawa T, Dohi Y, Kunita E, Utsunomiya H, Kohno N, Kihara Y. Characterization of Noncalcified Coronary

Plaques and Identification of Culprit Lesions in Patients With Acute Coronary Syndrome by 64-Slice Computed Tomography. *JACC: Cardiovascular Imaging*. 2009;2(2):153-60.

45. Motoyama S, Kondo T, Sarai M, Sugiura A, Harigaya H, Sato T, Inoue K, Okumura M, Ishii J, Anno H, Virmani R, Ozaki Y, Hishida H, Narula J. Multislice Computed Tomographic Characteristics of Coronary Lesions in Acute Coronary Syndromes. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007;50(4):319-26.

46. Braunwald E. Noninvasive detection of vulnerable coronary plaques: Locking the barn door before the horse is stolen. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(1):58-9.

47. Cai J-M, Hatsukami TS, Ferguson MS, Small R, Polissar NL, Yuan C. Classification of Human Carotid Atherosclerotic Lesions With In Vivo Multicontrast Magnetic Resonance Imaging. *Circulation*. 2002;106(11):1368-73.

48. Yuan C, Mitsumori LM, Ferguson MS, Polissar NL, Echelard D, Ortiz G, Small R, Davies JW, Kerwin WS, Hatsukami TS. In Vivo Accuracy of Multispectral Magnetic Resonance Imaging for Identifying Lipid-Rich Necrotic Cores and Intraplaque Hemorrhage in Advanced Human Carotid Plaques. *Circulation*. 2001;104(17):2051.

49. Makowski MR, Henningsson M, Spuentrup E, Kim WY, Maintz D, Manning WJ, Botnar RM, Botnar RM. Characterization of coronary atherosclerosis by magnetic resonance imaging. *Circulation*. 2013;128(11):1244-55.

50. Mehta KS, Lee JJ, Taha AA, Avgerinos E, Chaer RA. Vascular applications of contrast-enhanced ultrasound imaging. *Journal of Vascular Surgery*. 2017;66(1):266-74.

51. Kooi ME, Cappendijk VC, Cleutjens KBJM, Kessels AGH, Kitslaar PJEHM, Borgers M, Frederik PM, Daemen MJAP, van Engelshoven JMA. Accumulation of Ultrasmall Superparamagnetic Particles of Iron Oxide in Human Atherosclerotic Plaques Can Be Detected by In Vivo Magnetic Resonance Imaging. *Circulation*. 2003;107(19):2453-8.

52. Tang TY, Howarth SPS, Miller SR, Graves MJ, Patterson AJ, U-King-Im J-M, Li ZY, Walsh SR, Brown AP, Kirkpatrick PJ, Warburton EA, Hayes PD, Varty K, Boyle JR, Gaunt ME, Zalewski A, Gillard JH. The ATHEROMA (Atorvastatin Therapy: Effects on Reduction of Macrophage Activity) Study: Evaluation Using Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide-Enhanced Magnetic Resonance Imaging in Carotid Disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009;53(22):2039-50.

53. Makowski MR, Varma G, Wiethoff AJ, Smith A, Mattock K, Jansen CHP, Warley A, Taupitz M, Schaeffter T, Botnar RM. Noninvasive Assessment of Atherosclerotic

Plaque Progression in ApoE^{-/-} Mice Using Susceptibility Gradient Mapping. *Circulation: Cardiovascular Imaging*. 2011;4(3):295.

54. Wagner S, Schnorr J, Ludwig A, Stangl V, Ebert M, Hamm B, Taupitz M. Contrast-enhanced MR imaging of atherosclerosis using citrate-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles: calcifying microvesicles as imaging target for plaque characterization. *International Journal of Nanomedicine*. 2013;8:767-79.

55. 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. *Investigative Radiology*. 2004;39(7):394-405.

56. Wagner M, Wagner S, Schnorr J, Schellenberger E, Kivelitz D, Krug L, Dewey M, Laule M, Hamm B, Taupitz M. Coronary MR angiography using citrate-coated very small superparamagnetic iron oxide particles as blood-pool contrast agent: Initial experience in humans. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. 2011;34(4):816-23.

57. Ittrich H, Peldschus K, Raabe N, Kaul M, Adam G. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles in biomedicine: applications and developments in diagnostics and therapy. *RoFo : Fortschritte auf dem Gebiete der Rontgenstrahlen und der Nuklearmedizin*. 2013;185(12):1149-66.

58. Gleich B, Weizenecker J. Tomographic imaging using the nonlinear response of magnetic particles. *Nature*. 2005;435:1214.

59. Bulte JWM. Superparamagnetic iron oxides as MPI tracers: A primer and review of early applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2019;138:293-301.

60. Gupta AK, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*. 2005;26(18):3995-4021.

61. Laurent S, Forge D, Port M, Roch A, Robic C, Vander Elst L, Muller RN. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chemical Reviews*. 2008;108(6):2064-110.

62. Biederer S. *Magnet-Partikel-Spektrometer: Entwicklung eines Spektrometers zur Analyse superparamagnetischer Eisenoxid-Nanopartikel für Magnetic-Particle-Imaging*: Springer-Verlag; 2012.

63. Hemmingsson A, Carlsten J, Ericsson A. Relaxation enhancement of the dog liver and spleen by biodegradable superparamagnetic particles in proton magnetic resonance imaging. *Acta Radiol*. 1987;28:703-5.

64. Weissleder R, Elizondo G, Wittenberg J. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: an intravenous contrast agent for assessing lymph nodes with MR imaging. *Radiology*. 1990;175:494-8.
65. Seneterre E, Weissleder R, Jaramillo D. Bone marrow: ultrasmall superparamagnetic iron oxide for MR imaging. *Radiology*. 1991;179:529-33.
66. Stillman AE, Wilke N, Li D. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide to enhance MRA of the renal and coronary arteries: studies in human patients. *J Comput Assist Tomogr*. 1996;20:51-5.
67. Schmitz SA, Winterhalter S, Schiffler S, Gust R, Wagner S, Kresse M, Coupland SE, Semmler W, Wolf K-J. USPIO-enhanced Direct MR Imaging of Thrombus: Preclinical Evaluation in Rabbits. *Radiology*. 2001;221(1):237-43.
68. Canet E, Revel D, Forrat R. Superparamagnetic iron oxide particles and positive enhancement for myocardial perfusion studies assessed by subsecond T1-weighted MRI. *Magn Reson Imaging*. 1993;11:1139-45.
69. Hahn PF, Stark DD, Weissleder R. Clinical application of superparamagnetic iron oxide to MR imaging of tissue perfusion in vascular liver tumors. *Radiology*. 1990;174:361-6.
70. Laurent S, Dutz S, Häfeli UO, Mahmoudi M. Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2011;166(1):8-23.
71. Lunov O, Syrovets T, Rucker C. Lysosomal degradation of the carboxydextran shell of coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles and the fate of professional phagocytes. *Biomaterials*. 2010;31:9015-22.
72. Poller WC, Pieber M, Boehm-Sturm P, Ramberger E, Karampelas V, Möller K, Schleicher M, Wiekhorst F, Löwa N, Wagner S, Schnorr J, Taupitz M, Stangl K, Stangl V, Ludwig A. Very small superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Long-term fate and metabolic processing in atherosclerotic mice. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2018;14(8):2575-86.
73. Schwenk MH. Ferumoxytol: A New Intravenous Iron Preparation for the Treatment of Iron Deficiency Anemia in Patients with Chronic Kidney Disease. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 2010;30(1):70-9.
74. Lewin M, Carlesso N, Tung C-H, Tang X-W, Cory D, Scadden DT, Weissleder R. Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. *Nature Biotechnology*. 2000;18:410.

75. Islam T, Josephson L. Current state and future applications of active targeting in malignancies using superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Cancer Biomark.* 2009;5:99-107.
76. Weizenecker J, Borgert J, Gleich B. A simulation study on the resolution and sensitivity of magnetic particle imaging. *Physics in Medicine & Biology.* 2007;52(21):6363.
77. Wiekhorst F, Löwa N, Poller W, Metzkw S, Ludwig A, Trahms L. Changes in the behavior of magnetic iron oxide nanoparticles during cellular uptake detected by magnetic particle spectroscopy. 5th International Workshop on Magnetic Particle Imaging (IWMPI); 26-28 March 2015.
78. Loewa N, Wiekhorst F, Gemeinhardt I, Ebert M, Schnorr J, Wagner S, Taupitz M, Trahms L. Cellular uptake of magnetic nanoparticles quantified by magnetic particle spectroscopy. *IEEE Transactions on Magnetics.* 2013;49(1):275-8.
79. Rauwerdink AM, Weaver JB. Viscous effects on nanoparticle magnetization harmonics. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials.* 2010;322(6):609-13.
80. Rahmer J, Weizenecker J, Gleich B, Borgert J. Signal encoding in magnetic particle imaging: properties of the system function. *BMC Medical Imaging.* 2009;9:4-.
81. Poller WC, Lowa N, Wiekhorst F, Taupitz M, Wagner S, Moller K, Baumann G, Stangl V, Trahms L, Ludwig A. Magnetic Particle Spectroscopy Reveals Dynamic Changes in the Magnetic Behavior of Very Small Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles During Cellular Uptake and Enables Determination of Cell-Labeling Efficacy. *J Biomed Nanotechnol.* 2016;12(2):337-46.
82. Weizenecker J, Gleich B, Rahmer J, Dahnke H, Borgert J. Three-dimensional real-time in vivo magnetic particle imaging. *Physics in Medicine & Biology.* 2009;54(5):L1.
83. Saritas EU, Goodwill PW, Croft LR, Konkle JJ, Lu K, Zheng B, Conolly SM. Magnetic Particle Imaging (MPI) for NMR and MRI researchers. *Journal of Magnetic Resonance.* 2013;229:116-26.
84. Zheng B, von See MP, Yu E, Gunel B, Lu K, Vazin T, Schaffer DV, Goodwill PW, Conolly SM. Quantitative Magnetic Particle Imaging Monitors the Transplantation, Biodistribution, and Clearance of Stem Cells In Vivo. *Theranostics.* 2016;6(3):291-301.
85. Schmitz SA, Taupitz M, Wagner S, Wolf K-J, Beyersdorff D, Hamm B. Magnetic resonance imaging of atherosclerotic plaques using superparamagnetic iron oxide particles. *Journal of Magnetic Resonance Imaging.* 2001;14(4):355-61.
86. McAteer MA, Schneider JE, Ali ZA, Warrick N, Bursill CA, von zur Muhlen C, Greaves DR, Neubauer S, Channon KM, Choudhury RP. Magnetic Resonance Imaging

of Endothelial Adhesion Molecules in Mouse Atherosclerosis Using Dual-Targeted Microparticles of Iron Oxide. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2008;28(1):77-83.

87. Segers FME, den Adel B, Bot I, van der Graaf LM, van der Veer EP, Gonzalez W, Raynal I, de Winther M, Wodzig WK, Poelmann RE, van Berkel TJC, van der Weerd L, Biessen EAL. Scavenger Receptor-AI-Targeted Iron Oxide Nanoparticles for In Vivo MRI Detection of Atherosclerotic Lesions. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2013;33(8):1812-9.

88. Scharlach C, Kratz H, Wiekhorst F, Warmuth C, Schnorr J, Genter G, Ebert M, Mueller S, Schellenberger E. Synthesis of acid-stabilized iron oxide nanoparticles and comparison for targeting atherosclerotic plaques: evaluation by MRI, quantitative MPS, and TEM alternative to ambiguous Prussian blue iron staining. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2015;11(5):1085-95.

89. Poller WC, Ramberger E, Boehm-Sturm P, Mueller S, Möller K, Löwa N, Wiekhorst F, Wagner S, Taupitz M, Schellenberger E, Baumann G, Stangl K, Stangl V, Ludwig A. Uptake of citrate-coated iron oxide nanoparticles into atherosclerotic lesions in mice occurs via accelerated transcytosis through plaque endothelial cells. *Nano Research*. 2016;9(11):3437-52.

90. Berndt D, Millward JM, Schnorr J, Taupitz M, Stangl V, Paul F, Wagner S, Wuerfel JT, Sack I, Ludwig A, Infante-Duarte C. Inflammation-induced brain endothelial activation leads to uptake of electrostatically stabilized iron oxide nanoparticles via sulfated glycosaminoglycans. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2017;13(4):1411-21.

91. Ludwig A, Poller WC, Westphal K, Minkwitz S, Lättig-Tünnemann G, Metzkwow S, Stangl K, Baumann G, Taupitz M, Wagner S, Schnorr J, Stangl V. Rapid binding of electrostatically stabilized iron oxide nanoparticles to THP-1 monocytic cells via interaction with glycosaminoglycans. *Basic Research in Cardiology*. 2013;108(2):328.

92. Edgell CJ, McDonald CC, Graham JB. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983;80(12):3734-7.

93. Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *International Journal of Cancer*. 1980;26(2):171-6.

94. Löwa N, Seidel M, Radon P, Wiekhorst F. Magnetic nanoparticles in different biological environments analyzed by magnetic particle spectroscopy. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2017;427:133-8.
95. Lebel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the Probe 2',7'-Dichlorofluorescein as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress. *Chem Res Toxicol*. 1992;5(2):227-31.
96. Keston AS, Brandt R. The Fluorometric Analysis of Ultramicro Quantities of Hydrogen Peroxide. *Anal Biochem*. 1965;11:1-5.
97. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*. 1985;150(1):76-85.
98. Stepanenko A, Dmitrenko V. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene*. 2015;574(2):193-203.
99. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983;65(1):55-63.
100. Ebong EE, Macaluso FP, Spray DC, Tarbell JM. Imaging the endothelial glycocalyx in vitro by rapid freezing/freeze substitution transmission electron microscopy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(8):1908-15.
101. Luft JH. Fine structures of capillary and endocapillary layer as revealed by ruthenium red. *Fed Proc*. 1966;25(6):1773-83.
102. Janczyk P, Hansen S, Bahramsoltani M, Plendl J. The glycocalyx of human, bovine and murine microvascular endothelial cells cultured in vitro. *Journal of Electron Microscopy*. 2010;59(4):291-8.
103. Ueda A, Shimomura M, Ikeda M, Yamaguchi R, Tanishita K. Effect of glycocalyx on shear-dependent albumin uptake in endothelial cells. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2004;287(5):H2287-H94.
104. Klitzman B, Duling BR. Microvascular hematocrit and red cell flow in resting and contracting striated muscle. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1979;237(4):H481-H90.
105. Devaraj S, Yun J-M, Adamson G, Galvez J, Jialal I. C-reactive protein impairs the endothelial glycocalyx resulting in endothelial dysfunction. *Cardiovascular Research*. 2009;84(3):479-84.

106. Megens RTA, Reitsma S, Schiffers PHM, Hilgers RHP, De Mey JGR, Slaaf DW, oude Egbrink MGA, van Zandvoort MAMJ. Two-Photon Microscopy of Vital Murine Elastic and Muscular Arteries. *Journal of Vascular Research*. 2007;44(2):87-98.
107. Chappell D, Jacob M, Paul O, Rehm M, Welsch U, Stoeckelhuber M, Conzen P, Becker BF. The glycocalyx of the human umbilical vein endothelial cell: an impressive structure ex vivo but not in culture. *Circ Res*. 2009;104(11):1313-7.
108. Singh A, Satchell SC, Neal CR, McKenzie EA, Tooke JE, Mathieson PW. Glomerular Endothelial Glycocalyx Constitutes a Barrier to Protein Permeability. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2007;18(11):2885-93.
109. Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P. The endothelial surface layer. *Pflügers Archiv*. 2000;440(5):653-66.
110. Fassel TA, Mozdziak PE, Sanger JR, Edmiston CE. Paraformaldehyde effect on ruthenium red and lysine preservation and staining of the staphylococcal glycocalyx. *Microscopy Research and Technique*. 1997;36(5):422-7.
111. Costerton J, Irvin R, Cheng K. The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annual Reviews in Microbiology*. 1981;35(1):299-324.
112. Ameye L, Hermann R, DuBois P, Flammang P. Ultrastructure of the echinoderm cuticle after fast-freezing / freeze substitution and conventional chemical fixations. *Microscopy Research and Technique*. 2000;48(6):385-93.
113. Feder N, Sidman RL. Methods and principles of fixation by freeze-substitution. *The Journal of Cell Biology*. 1958;4(5):593-602.
114. Broekhuizen LN, Lemkes BA, Mooij HL, Meuwese MC, Verberne H, Holleman F, Schlingemann RO, Nieuwdorp M, Stroes ESG, Vink H. Effect of sulodexide on endothelial glycocalyx and vascular permeability in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2010;53(12):2646-55.
115. Zhang S, Moustafa Y, Huo Q. Different interaction modes of biomolecules with citrate-capped gold nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2014;6(23):21184-92.
116. Lobov SA, King DW, Knox KJ, Senden TJ, Stephens RW. Cationised radiolabelled nanoparticles for perfusion imaging of the lungs. *Biomaterials*. 2013;34(6):1732-8.
117. Cheng MJ, Kumar R, Sridhar S, Webster TJ, Ebong EE. Endothelial glycocalyx conditions influence nanoparticle uptake for passive targeting. *Int J Nanomedicine*. 2016;11:3305-15.

118. Mockl L, Hirn S, Torrano AA, Uhl B, Brauchle C, Krombach F. The glycocalyx regulates the uptake of nanoparticles by human endothelial cells in vitro. *Nanomedicine (Lond)*. 2017;12(3):207-17.
119. Cruje C, Chithrani D. Polyethylene glycol density and length affects nanoparticle uptake by cancer cells. *J Nanomed Res*. 2014;1(1):00006.
120. Uhl B, Hirn S, Immler R, Mildner K, Mockl L, Sperandio M, Brauchle C, Reichel CA, Zeuschner D, Krombach F. The Endothelial Glycocalyx Controls Interactions of Quantum Dots with the Endothelium and Their Translocation across the Blood-Tissue Border. *ACS Nano*. 2017;11(2):1498-508.
121. Gromnicova R, Kaya M, Romero IA, Williams P, Satchell S, Sharrack B, Male D. Transport of Gold Nanoparticles by Vascular Endothelium from Different Human Tissues. *PLOS ONE*. 2016;11(8):e0161610.
122. Andreas K, Georgieva R, Ladwig M, Mueller S, Notter M, Sittinger M, Ringe J. Highly efficient magnetic stem cell labeling with citrate-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for MRI tracking. *Biomaterials*. 2012;33(18):4515-25.
123. Wilhelm C, Billotey C, Roger J, Pons J, Bacri J-C, Gazeau F. Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. *Biomaterials*. 2003;24(6):1001-11.
124. Makatsori E, Lamari FN, Theocharis AD, Anagnostides S, Hjerpe A, Tseggenidis T, Karamanos NK. Large matrix proteoglycans, versican and perlecan, are expressed and secreted by human leukemic monocytes. *Anticancer Res*. 2003;23(4):3303-9.
125. Krpetić Ž, Nativo P, Prior IA, Brust M. Acrylate-Facilitated Cellular Uptake of Gold Nanoparticles. *Small*. 2011;7(14):1982-6.
126. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circulation research*. 2007;100(2):174-90.
127. van Haaren PMA, VanBavel E, Vink H, Spaan JAE. Localization of the permeability barrier to solutes in isolated arteries by confocal microscopy. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2003;285(6):H2848-H56.
128. Harding IC, Mitra R, Mensah SA, Herman IM, Ebong EE. Pro-atherosclerotic disturbed flow disrupts caveolin-1 expression, localization, and function via glycocalyx degradation. *J Transl Med*. 2018;16(1):364.
129. Mitra R, O'Neil GL, Harding IC, Cheng MJ, Mensah SA, Ebong EE. Glycocalyx in Atherosclerosis-Relevant Endothelium Function and as a Therapeutic Target. *Current Atherosclerosis Reports*. 2017;19(12):63.

130. Lipowsky HH, Gao L, Lescanic A. Shedding of the endothelial glycocalyx in arterioles, capillaries, and venules and its effect on capillary hemodynamics during inflammation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2011;301(6):H2235-H45.
131. Lundqvist M, Stigler J, Elia G, Lynch I, Cedervall T, Dawson KA. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(38):14265-70.
132. Treuel L, Eslahian K, Docter D, Lang T, Zellner R, Nienhaus K, Nienhaus G, Stauber R, Maskos M. Physicochemical characterization of nanoparticles and their behavior in the biological environment. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2014;16(29):15053-67.
133. Nel AE, Mädler L, Velegol D, Xia T, Hoek EMV, Somasundaran P, Klaessig F, Castranova V, Thompson M. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nature Materials*. 2009;8:543.
134. Berkov D, Gorn N. Susceptibility of the disordered system of fine magnetic particles: a Langevin-dynamics study. *Journal of Physics: Condensed Matter*. 2001;13(41):9369.
135. Berkov DV, Gorn NL, Görnert P. Magnetization Dynamics in Nanoparticle Systems: Numerical Simulation Using Langevin Dynamics. *physica status solidi (a)*. 2002;189(2):409-21.
136. Paysen H, Schleicher M, Loewa N, Trahms L, Schaeffter T, Ludwig A, Wiekhorst F. Towards functional magnetic particle imaging of endothelial cells. 12th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers - Copenhagen, Denmark; May 22-26th 2018.
137. Paysen H, Loewa N, Stach A, Wells J, Kosch O, Twamley S, Makowski MR, Schaeffter T, Ludwig A, Wiekhorst F. Cellular uptake of magnetic nanoparticles imaged and quantified by magnetic particle imaging. *Sci Rep*. 2020;10(1):1922.
138. Kalber TL, Ordidge KL, Southern P, Loebinger MR, Kyrtatos PG, Pankhurst QA, Lythgoe MF, Janes SM. Hyperthermia treatment of tumors by mesenchymal stem cell-delivered superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2016;11:1973-83.

139. Ordidge KL, Gregori M, Kalber TL, Lythgoe MF, Janes SM, Giangreco A. Coupled cellular therapy and magnetic targeting for airway regeneration. *Biochem Soc Trans.* 2014;42(3):657-61.
140. McCarthy JR, Weissleder R. Multifunctional magnetic nanoparticles for targeted imaging and therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2008;60(11):1241-51.
141. Lin A, Sabnis A, Kona S, Nattama S, Patel H, Dong JF, Nguyen KT. Shear-regulated uptake of nanoparticles by endothelial cells and development of endothelial-targeting nanoparticles. *J Biomed Mater Res A.* 2010;93(3):833-42.
142. Matuszak J, Zaloga J, Friedrich RP, Lyer S, Nowak J, Odenbach S, Alexiou C, Cicha I. Endothelial biocompatibility and accumulation of SPION under flow conditions. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials.* 2015;380:20-6.
143. Samuel SP, Jain N, O'Dowd F, Paul T, Kashanin D, Gerard VA, Gun'ko YK, Prina-Mello A, Volkov Y. Multifactorial determinants that govern nanoparticle uptake by human endothelial cells under flow. *International Journal of Nanomedicine.* 2012;7:2943-56.
144. Sheikh S, Rainger GE, Gale Z, Rahman M, Nash GB. Exposure to fluid shear stress modulates the ability of endothelial cells to recruit neutrophils in response to tumor necrosis factor- α : a basis for local variations in vascular sensitivity to inflammation. *Blood.* 2003;102(8):2828.
145. Graeser M, Knopp T, Szwargulski P, Friedrich T, Gladiss A, Kaul M, Krishnan KM, Ittrich H, Adam G, Buzug TM. Towards Picogram Detection of Superparamagnetic Iron-Oxide Particles Using a Gradiometric Receive Coil. *Scientific reports.* 2017;7(1):6872.
146. Zheng B, Vazin T, Goodwill PW, Conway A, Verma A, Saritas EU, Schaffer D, Conolly SM. Magnetic particle imaging tracks the long-term fate of in vivo neural cell implants with high image contrast. *Scientific reports.* 2015;5:14055.
147. Ferguson RM, Minard KR, Krishnan KM. Optimization of nanoparticle core size for magnetic particle imaging. *Journal of magnetism and magnetic materials.* 2009;321(10):1548-51.
148. Du Y, Lai PT, Leung CH, Pong PWT. Design of Superparamagnetic Nanoparticles for Magnetic Particle Imaging (MPI). *International Journal of Molecular Sciences.* 2013;14(9):18682-710.
149. Bakenecker AC, Ahlborg M, Debbeler C, Kaethner C, Buzug TM, Ludtke-Buzug K. Magnetic particle imaging in vascular medicine. *Innov Surg Sci.* 2018;3(3):179-92.

150. Vink H, Duling BR. Capillary endothelial surface layer selectively reduces plasma solute distribution volume. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2000;278(1):H285-H9.
151. Riegler J, Liew A, Hynes SO, Ortega D, O'Brien T, Day RM, Richards T, Sharif F, Pankhurst QA, Lythgoe MF. Superparamagnetic iron oxide nanoparticle targeting of MSCs in vascular injury. *Biomaterials*. 2013;34(8):1987-94.
152. Zhang L, Yu F, Cole AJ, Chertok B, David AE, Wang J, Yang VC. Gum Arabic-Coated Magnetic Nanoparticles for Potential Application in Simultaneous Magnetic Targeting and Tumor Imaging. *The AAPS Journal*. 2009;11(4):693.
153. Eberbeck D, Kettering M, Bergemann C, Zirpel P, Hilger I, Trahms L. Quantification of the aggregation of magnetic nanoparticles with different polymeric coatings in cell culture medium. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2010;43(40):405002.
154. Ziemian S, Löwa N, Kosch O, Bajj D, Wiekhorst F, Schütz G. Optimization of Iron Oxide Tracer Synthesis for Magnetic Particle Imaging. *Nanomaterials*. 2018;8(4):180.
155. Kratz H, Taupitz M, Ariza de Schellenberger A, Kosch O, Eberbeck D, Wagner S, Trahms L, Hamm B, Schnorr J. Novel magnetic multicore nanoparticles designed for MPI and other biomedical applications: From synthesis to first in vivo studies. *PLOS ONE*. 2018;13(1):e0190214.
156. Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *The American Journal of Cardiology*. 2003;91(3, Supplement):7-11.
157. Ross R, Glomset J, Harker L. Response to injury and atherogenesis. *The American Journal of Pathology*. 1977;86(3):675-84.
158. Naqvi S, Samim M, Abdin MZ, Ahmed FJ, Maitra AN, Prashant CK, Dinda AK. Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress. *International Journal of Nanomedicine*. 2010;5:983-9.
159. Apopa PL, Qian Y, Shao R, Guo NL, Schwegler-Berry D, Pacurari M, Porter D, Shi X, Vallyathan V, Castranova V, Flynn DC. Iron oxide nanoparticles induce human microvascular endothelial cell permeability through reactive oxygen species production and microtubule remodeling. *Particle and Fibre Toxicology*. 2009;6(1):1.
160. Halamoda Kenzaoui B, Chapuis Bernasconi C, Guney-Ayra S, Juillerat-Jeanneret L. Induction of oxidative stress, lysosome activation and autophagy by nanoparticles in human brain-derived endothelial cells. *Biochemical Journal*. 2012;441(3):813-21.

161. Lévy M, Lagarde F, Maraloiu V-A, Blanchin M-G, Gendron F, Wilhelm C, Gazeau F. Degradability of superparamagnetic nanoparticles in a model of intracellular environment: follow-up of magnetic, structural and chemical properties. *Nanotechnology*. 2010;21(39):395103.
162. Voinov MA, Pagán JOS, Morrison E, Smirnova TI, Smirnov AI. Surface-Mediated Production of Hydroxyl Radicals as a Mechanism of Iron Oxide Nanoparticle Biototoxicity. *Journal of the American Chemical Society*. 2011;133(1):35-41.
163. Wallander ML, Leibold EA, Eisenstein RS. Molecular control of vertebrate iron homeostasis by iron regulatory proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2006;1763(7):668-89.
164. Geppert M, Hohnholt MC, Nürnberger S, Dringen R. Ferritin up-regulation and transient ROS production in cultured brain astrocytes after loading with iron oxide nanoparticles. *Acta Biomaterialia*. 2012;8(10):3832-9.
165. Gu J, Xu H, Han Y, Dai W, Hao W, Wang C, Gu N, Xu H, Cao J. The internalization pathway, metabolic fate and biological effect of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in the macrophage-like RAW264. 7 cell. *Science China Life Sciences*. 2011;54(9):793-805.
166. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology annual review*. 2005;11:127-52.
167. Holder AL, Goth-Goldstein R, Lucas D, Koshland CP. Particle-Induced Artifacts in the MTT and LDH Viability Assays. *Chem Res Toxicol*. 2012;25(9):1885-92.
168. Anzai Y, Piccoli CW, Outwater EK. Evaluation of neck and body metastases to nodes with ferumoxtran 10-enhanced MR imaging: phase III safety and efficacy study. *Radiology*. 2003;228:777-88.
169. Weissleder R, Bogdanov A, Neuwelt EA, Papisov M. Long-circulating iron oxides for MR imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1995;16(2):321-34.

6 Abkürzungsverzeichnis

BAEC	Bovine Aortenendothelzellen
CMR	Kardiale Magnetresonanztomographie
CT50	fluidMAG-CT50
CT-A	Computertomographie-Angiographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC	Endothelial Cells
ECGS	Endothelial Cell Growth Supplement
EGF	Epidermal Growth Factor
eNOS	endothelial Nitric Oxide Synthase
EZM	Extrazellulärmatrix
Fe	Eisen
FOV	Field of View
FS	Freeze Substitution
GAGs	Glykosaminoglykane
GCX	Glykokalyx
HDL	High Density Lipoprotein
HPF	High Pressure Freezing
HPMA	2-Hydroxypropylmethacrylamid
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
ICAM-1	Intracellular Adhesion Molecule 1
IFN- γ	Interferon-gamma
IREs	Iron Responsive Elements
IRPs	Iron Regulatory Proteins
IVUS	Intravasaler Ultraschall
LDL	Low Density Lipoprotein
LF	Laminarer Fluss
CSF	Macrophage-Colony Stimulating Factor
MCP-1	Monocytic Chemotactic Protein-1
MMP-1	Matrix Metalloprotease-1
MNP	Magnetische Nanopartikel
MPI	Magnetic Particle Imaging
MPS	Magnetic Particle Spectroscopy, Magnet-Partikel-Spektrometer
MRT	Magnetresonanztomographie
OCT	Optische Kohärenztomographie
PECAM-1	Platelet and Cell Adhesion Molecule-1
PEG	Polyethylenglycol
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RES	Retikuloendotheliales System
RF	Rapid Freezing
RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay
S	Statisch
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
SPIONs	Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles
TCFA	Thin Cap Fibroatheroma
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TNF- α	Tumor Necrosis Factor alpha
VCAM-1	Vascular Adhesion Molecule-1
VSMCs	Vascular Smooth Muscle Cells
VSOP	Very small Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Moritz Schleicher, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Magnetische Nanopartikel für die Bildgebung der Atherosklerose - Wechselwirkung mit Strukturen der Zelloberfläche“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Moritz Schleicher hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Poller WC, Pieber M, Boehm-Sturm P, Ramberger E, Karampelas V, Möller K, **Schleicher M**, Wiekhorst F, Löwa N, Wagner S, Schnorr J, Taupitz M, Stangl K, Stangl V, Ludwig A. Very small superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Long-term fate and metabolic processing in atherosclerotic mice. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2018;14(8):2575-86.

Beitrag im Einzelnen: Durchführung von Experimenten zur Toxizität von MNP.

Publikation 2: Poller WC, Löwa N, **Schleicher M**, Münster-Wandowski A, Taupitz M, Stangl V, Ludwig A, Wiekhorst F. Initial interaction of citrate-coated iron oxide nanoparticles with the glycocalyx of THP-1 monocytes assessed by real-time magnetic particle spectroscopy and electron microscopy. *Sci Rep*. 2020;10(1):3591.

Beitrag im Einzelnen: Planung der Experimente, Anfertigung der Versuchsproben und Durchführung von Versuchen, Mitarbeit an der Veröffentlichung der Publikation. Aus meiner Versuchsdurchführung sind die Ergebnisse in Abbildung 9, Abbildung 10 und Abbildung 11 entstanden.

Kongressbeiträge

Paysen H, **Schleicher M**, Loewa N, Trahms L, Schaeffter T, Ludwig A, Wiekhorst F. Towards functional magnetic particle imaging of endothelial cells. 12th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers - Copenhagen, Denmark; May 22-26th 2018.

Beitrag im Einzelnen: Planung der Experimente, Anfertigung der Versuchsproben, Erarbeitung des Abstracts.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Publikationen

Poller WC, Pieber M, Boehm-Sturm P, Ramberger E, Karampelas V, Möller K, **Schleicher M**, Wiekhorst F, Löwa N, Wagner S, Schnorr J, Taupitz M, Stangl K, Stangl V, Ludwig A. Very small superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Long-term fate and metabolic processing in atherosclerotic mice. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2018;14(8):2575-86.

Poller WC, Löwa N, **Schleicher M**, Münster-Wandowski A, Taupitz M, Stangl V, Ludwig A, Wiekhorst F. Initial interaction of citrate-coated iron oxide nanoparticles with the glycocalyx of THP-1 monocytes assessed by real-time magnetic particle spectroscopy and electron microscopy. *Sci Rep*. 2020;10(1):3591.

Kongressbeiträge

Paysen H, **Schleicher M**, Loewa N, Trahms L, Schaeffter T, Ludwig A, Wiekhorst F. Towards functional magnetic particle imaging of endothelial cells. 12th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers - Copenhagen, Denmark; May 22-26th 2018.

Danksagung

Ich möchte mich ganz besonders und herzlich bei PD Dr. rer. nat. Antje Ludwig für die Überlassung des spannenden Themas, die hervorragende Betreuung und die umfangreiche Unterstützung im Rahmen dieser Arbeit bedanken. Nicht nur der interessante wissenschaftliche Diskurs, sondern auch der Beistand als Mentorin wurden von mir fachlich wie menschlich sehr geschätzt.

Ganz vielen Dank an Univ.-Prof. Dr. Karl Stangl und Prof. Dr. Verena Stangl für die Ermöglichung dieser Arbeit sowie an das Deutsche Zentrum für Herz-Kreislauf-Forschung (DZHK) für die Unterstützung meiner Arbeit durch ein Forschungsstipendium.

Mein besonderer Dank an PD Dr. rer. nat. Antje Ludwig, Dr. Wolfram Poller, Anke Stach und Andrea Weller für die spannende Einführung in die Laborarbeit, die konstruktive Zusammenarbeit und natürlich für die geduldige Hilfe sowie Unterstützung beim Erstellen dieser Arbeit.

Vielen herzlichen Dank an das Team der PTB, insbesondere an Hendrik Paysen, Dr.-Ing. Norbert Löwa und Dr. Frank Wiekhorst für die Zusammenarbeit, die tolle Arbeitsatmosphäre, die Durchsicht dieser Arbeit und für die stetige Geduld und Bereitschaft, meine Fragen zu beantworten.

Ganz großer Dank gilt den Mitarbeitern des Instituts für Integrative Neuroanatomie und Neurophysiologie, besonders Dr. Agnieszka Münster-Wandowski, Heike Heilmann und Berit Söhl-Kielczynski sowohl für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung als auch für die Einführung in die Fixiertechniken der Transmissionselektronenmikroskopie.

Ganz lieben Dank an Vasileios Karampelas, Alexandros Krull, Shailey Twamley, Kerstin Wöltje, Carmen Hannemann und Johannes Schecker für den intensiven Austausch und die mentale Unterstützung im Labor.

Herzlicher Dank gilt meiner Familie und meiner Freundin, die mich immer unterstützt haben sowie für mich da waren und die Anfertigung dieser Arbeit erst ermöglichten.