

**Synthese verschiedener elektrostatisch stabilisierter  
Eisenoxid-Nanopartikel und Vergleich der Eignung für die  
zielgerichtete MR-Bildgebung von  
atherosklerotischen Plaques**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Constantin Scharlach  
aus Hannover

Berlin, 2014

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2010 bis September 2014 unter der wissenschaftlichen Leitung von Prof. Dr. Eyk Schellenberger in der AG Molekulare Bildgebung am Institut für Radiologie der Charité Berlin am Campus Charité Mitte angefertigt.

**1. Gutachter: Prof. Dr. Eyk Schellenberger**

Charité, Berlin, Deutschland

Institut für Radiologie

**2. Gutachter: Prof. Dr. Stephan Sigrist**

Freie Universität Berlin, Deutschland

Institut für Biologie

Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie

Disputation am: 23.01.2015



## Danksagung

---

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Eyk Schellenberger für die konstruktive Betreuung und stetige Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Bedanken möchte ich mich zudem für das Vertrauen und die daraus resultierende Freiheit bezüglich der Bearbeitung des Themas.

Prof. Dr. Stephan Sigrist danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Allen aktuellen und ehemaligen Kollegen der Arbeitsgruppe Schellenberger danke ich für das tolle Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit. Besonders sind an dieser Stelle Gesche Genter für die Synthese der Etidron- und Weinsäure-Partikel und Lena Figge für die Herausforderungen im Trivial Pursuit zu nennen.

Vielen Dank auch an Dr. Jörg Schnorr und Dr. Ines Gemeinhardt für die Hilfe rund um die *in-vivo*-Arbeiten und der gesamten Experimentellen Radiologie für die stetige Unterstützung und angenehme Atmosphäre. Monika Ebert möchte ich für die Synthese der VSOP danken. Ganz besonders danke ich Dr. Harald Kratz für die hervorragende theoretische und moralische Unterstützung sowie die Durchsicht der Arbeit.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Dr. Carsten Warmuth, Dr. Larissa Müller von der BAM, Dr. Frank Wiekhorst von der PTB und Dr. Antje Ludwig für die guten und konstruktiven Zusammenarbeiten bedanken, die entscheidend zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein größter Dank gilt meiner gesamten Familie für die ständige Unterstützung und Motivation.

Ganz besonders danke ich Barbara für die gemeinsame Zeit.



# INHALTSVERZEICHNIS

---

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Atherosklerose.....	2
1.2. Entstehung und Progression der Atherosklerose .....	3
1.3. Plaqueinstabilität und Komplikationen.....	4
1.4. Das ApoE-defiziente Mausmodell .....	8
1.5. Nichtinvasive bildgebende Modalitäten .....	9
1.6. Magnetresonanztomographie (MRT).....	10
1.6.1. Grundlagen der MRT .....	10
1.6.2. Relaxation.....	13
1.6.3. Kontrastmittel in der MRT .....	14
1.7. Eisenoxid-Nanopartikel .....	16
1.7.1. Superparamagnetismus der Eisenoxid-Nanopartikel .....	16
1.7.2. Synthese und Stabilisierung von Eisenoxid-Nanopartikeln .....	17
1.7.3. Kinetiken und Anwendungen von Eisenoxid-Nanopartikeln .....	20
1.7.4. Eisenoxid-Nanopartikel und MR-Bildgebung von atherosklerotischen Plaques.....	22
1.8. Zielstellung .....	24
<b>2. Material</b> .....	<b>25</b>
2.1. Geräte .....	25
2.2. Software .....	26
2.3. Sonstige Materialien.....	26
2.4. Chemikalien und Substanzen.....	27
2.5. Puffer, Medien und Zusätze .....	28
2.6. Kit-Systeme .....	28
2.7. Antikörper .....	29
2.8. Versuchstiere und Haltung .....	29

<b>3. Methoden</b> .....	<b>31</b>
3.1. Synthese von elektrostatisch stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikeln mit monomeren Säuren.....	31
3.1.1. Beschichtung von Eisenoxid-Nanopartikeln mit Citronensäure (VSOP) 34	
3.1.2. Beschichtung von Eisenoxid-Nanopartikeln mit L-Äpfelsäure .....	34
3.1.3. Beschichtung von Eisenoxid-Nanopartikeln mit Etidronsäure .....	35
3.1.4. Beschichtung von Eisenoxid-Nanopartikeln mit DL-Weinsäure .....	36
3.1.5. Beschichtung von Eisenoxid-Nanopartikeln mit trans-Aconitsäure ...	36
3.1.6. Beschichtung von Eisenoxid-Nanopartikeln mit 4-Amino-5-hydroxy-naphthalin-2,7-disulfonsäure .....	37
3.1.7. Beschichtung von Eisenoxid-Nanopartikeln mit Tartronsäure .....	37
3.1.8. Beschichtung von Eisenoxid-Nanopartikeln mit meso-2,3-Dimercaptobernsteinsäure (DMSA) .....	38
3.1.9. Beschichtung von Eisenoxid-Nanopartikeln mit Maleinsäure .....	39
3.2. Charakterisierung der Eisenoxid-Nanopartikel .....	39
3.2.1. Messung der hydrodynamischen Größe per Zetasizer (dynamische Lichtstreuung) .....	39
3.2.2. Bestimmung des Zetapotentials .....	40
3.2.3. Bestimmung der Relaxivitäten .....	40
3.2.4. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) der synthetisierten Eisenoxid-Nanopartikel .....	41
3.2.5. Bestimmung der Eisenkonzentrationen .....	41
3.2.6. Auswahl der Fraktionen und Konzentrierung der Nanopartikel-Suspensionen .....	41
3.2.7. Formulierung der Nanopartikel .....	42
3.3. Tierversuche .....	42
3.3.1. Injektion und Gewebeentnahme .....	42
3.3.2. Blutentnahme.....	43
3.4. Histologie.....	43
3.4.1. Behandlung von Gewebe für Paraffinschnitte .....	43
3.4.2. Anfertigung von Paraffingewebeschnitten .....	44
3.4.3. Histologische Färbungen .....	45
3.4.3.1. Berliner-Blau-Färbung.....	45

---

3.4.3.2. Movat-Färbung.....	46
3.4.3.3. Von Kossa-Färbung .....	46
3.4.4. Immunhistochemische Färbungen.....	47
3.5. Magnetresonanztomographie .....	48
3.5.1. In-vivo-MRT .....	48
3.5.2. Erstellen eines Phantoms für ex-vivo-MRT-Untersuchungen .....	49
3.5.3. MRT-Messung der ex-vivo-Phantome .....	50
3.5.4. Semi-Quantifizierung der ex-vivo-MRT-Messungen .....	51
3.6. TEM von atherosklerotischen Plaques.....	52
3.7. Magnetische-Partikel-Spektrometrie (MPS).....	53
3.7.1. Bluthalbwertszeitbestimmung von VSOP über MPS-Messungen im Blut.....	55
3.7.2. Nachweis und Quantifizierung der Nanopartikel in atherosklerotischen Geweben .....	55
3.8. In-vivo-Halbwertszeitbestimmungen der Nanopartikel mittels MRT .....	56
3.9. Nachweis von Eu-dotierten VSOP in Leber und atherosklerotischen Plaques über Laserablation induktiv gekoppelte Plasma Massenspektrometrie (LA-ICP-MS).....	58
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>61</b>
4.1. Eisenoxid-Nanopartikel .....	61
4.1.1. Synthese von elektrostatisch stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikeln	61
4.1.2. Größenbestimmung der neu synthetisierten elektrostatisch stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikel.....	64
4.1.3. Bestimmung der Relaxivität und des Zetapotentials .....	66
4.1.4. TEM der synthetisierten Nanopartikel .....	68
4.2. Bestimmung der Bluthalbwertszeit von VSOP im ApoE-/-Mausmodell mittels MPS .....	69
4.3. Nichtinvasive Bestimmung der Bluthalbwertszeit von elektrostatisch stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikel mittels UTE-Sequenz .....	70
4.4. Nachweis von VSOP mittels Berliner-Blau-Färbung in atherosklerotischen Plaques des ApoE-/-Mausmodells .....	72
4.5. Detektion von endogenem Eisen in atherosklerotischen Plaques von ApoE-/-Mäusen ohne Applikation von Eisenoxid-Nanopartikeln .....	74

4.6. Erste Korrelationsfärbungen zu endogenem Eisen innerhalb atherosklerotischer Plaques .....	77
4.7. Ex-vivo-MRT-Messungen zum Nachweis der Anreicherung der Eisenoxid-Nanopartikel .....	78
4.8. Semi-Quantifizierung der Eisenoxid-Nanopartikel-Akkumulation in ex-vivo-MRT-Messungen .....	80
4.9. In-vivo-MRT-Messungen der VSOP-Anreicherung in atherosklerotischen Plaques des ApoE-/-Mausmodells .....	82
4.10. Histologischer Nachweis von Nanopartikeln mittels TEM.....	84
4.10.1. Nähere Lokalisierung von VSOP in der Aortenwurzel mittels TEM....	87
4.11. Nachweis der Eisenoxid-Nanopartikel über MPS.....	88
4.12. Ergebnisse der LA-ICP-MS an Gewebeschnitten .....	94
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>99</b>
5.1. Synthese elektrostatisch stabilisierter Eisenoxid-Nanopartikel .....	99
5.2. Untersuchung der Eisenoxid-Nanopartikel auf Anreicherung in atherosklerotischen Plaques des ApoE-/-Mausmodells .....	104
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>119</b>
6.1. Deutsche Version .....	119
6.2. Englische Version .....	120
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>123</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>139</b>
<b>Publikationsliste .....</b>	<b>145</b>

# 1. Einleitung

---

Atherosklerose ist die wichtigste Ursache für kardiovaskuläre Erkrankungen, die noch vor Krebs die häufigste Todesursache weltweit darstellen [1]. Die wesentlichen Manifestationen der Atherosklerose sind die koronare Herzkrankheit, zerebrovaskuläre Erkrankungen und periphere arterielle Verschlusskrankheiten, die in akuten klinischen Komplikationen wie Herzinfarkt, Schlaganfall bzw. Durchblutungsstörungen der Gliedmaßen münden können. Im Jahr 2008 starben insgesamt 17,3 Millionen Menschen infolge kardiovaskulärer Erkrankungen, davon alleine 7,3 Millionen an den Folgen der koronaren Herzkrankheit und 6,2 Millionen an Schlaganfällen [2].

Um den klinischen Komplikationen präventiv entgegenwirken zu können, ist die frühe Diagnose atherosklerotischer Läsionen von enormer Wichtigkeit. Von besonderer Relevanz ist diesbezüglich eine nichtinvasive Bildgebung, da invasive Verfahren wie z. B. Röntgenangiographie oder Intravaskulärer Ultrasound (IVUS) eine zusätzliche Belastung darstellen und daher potentiell nicht für eine breite Anwendung geeignet sind [3]. Mittels gegenwärtig gebräuchlicher Verfahren wie Computertomographischer Angiographie (CTA) und Magnetresonanztomographie (MRA) ist die anatomische Darstellung der Gefäße in hoher räumlicher Auflösung möglich, welche die Diagnose von Stenosen innerhalb arterieller Gefäße erlaubt [4]. Die häufigste Ursache akuter klinischer Vorfälle resultiert allerdings aus der Ruptur atherosklerotischer Plaques, die oft lediglich eine moderate Stenosierung aufweisen und daher nicht von den erwähnten bildgebenden Modalitäten erkannt werden [5, 6].

Um diese atherosklerotischen Läsionen nichtinvasiv detektieren zu können, ist die Weiterentwicklung bildgebender Verfahren von besonderer Bedeutung. Die Magnetresonanztomographie (MRT) zeichnet sich unter den bildgebenden Verfahren durch eine hohe räumliche Auflösung, einen hervorragenden Weichteilkontrast und Vermeidung von Strahlenbelastung aus. Dadurch ist sie eine wichtige bildgebende Modalität hinsichtlich der Beurteilung kardiovaskulärer Erkrankungen [7].

Der Einsatz von Kontrastmitteln in der MRT sorgt für eine Verbesserung der Sensitivität [8] und erweitert dadurch das Spektrum hinsichtlich einer Früherkennung um ein Vielfaches. Die Entwicklung und Erforschung neuer Kontrastmittel wie z. B. von Eisenoxid-Nanopartikeln stellt hinsichtlich der Diagnose atherosklerotischer Plaques somit ein vielversprechendes und zukunftssträchtiges Aufgabengebiet dar. In der vorliegenden Arbeit wird die Synthese neuer elektrostatisch stabilisierter Eisenoxid-Nanopartikel sowie deren Untersuchung hinsichtlich einer Akkumulation in atherosklerotischen Plaques vorgestellt.

### 1.1. Atherosklerose

Atherosklerose ist eine chronische Erkrankung der mittleren und großen arteriellen Gefäßwände, die als dynamisch fortschreitender Prozess begriffen wird. Nachdem ältere Hypothesen die Entstehung im Wesentlichen auf die Akkumulation von Lipiden in der Gefäßwand zurückführten, wird Atherosklerose mittlerweile als progressive, komplexe, inflammatorische Erkrankung betrachtet [9].

Kennzeichnend sind asymmetrische, fokale Verdickungen der innersten Gefäßwand (Intima), die mit einer Verengung des Gefäßlumens einhergehen. Innerhalb dieser atherosklerotischen Läsionen, den atherosklerotischen Plaques, akkumulieren verschiedene Immunzellen, Lipide, Bindegewebelemente sowie prothrombotisches Material [10]. Akute Gefährdung geht von einer Ruptur, d. h. dem Aufbrechen der atherosklerotischen Läsionen, mit einer nachfolgenden Thrombose aus. Herzinfarkt und Schlaganfall sind in der Konsequenz die wichtigsten klinischen Komplikationen der Atherosklerose. Die Entwicklung kann über einen langen Zeitraum symptomlos verlaufen, bis die lebensbedrohlichen Manifestationen in fortgeschrittenem Alter plötzlich auftreten. Verschiedene Risikofaktoren erhöhen die Wahrscheinlichkeit an Atherosklerose bzw. kardiovaskulärer Krankheit zu erkranken. Bluthochdruck, Diabetes Mellitus Typ 2, Fehlernährung bzw. hoher Cholesterinspiegel, Adipositas, körperliche Inaktivität, Rauchen und übermäßiger Alkoholkonsum gehören zu den veränderbaren Risiken. Unbeeinflussbare Faktoren sind dagegen ein fortgeschrittenes Alter und eine genetische Disposition. Generell können erhöhte Lipid-Blutwerte eine gesteigerte Gefahr signalisieren. Ein erhöhter Cholesterin- und LDL-Plasmaspiegel (LDL; *low density lipoprotein*), sowie ein erniedrigter HDL-Spiegel (HDL; *high density lipoprotein*) begünstigen die Entstehung



---

von Atherosklerose [11]. Weitere Studien sehen einen Zusammenhang zwischen dem Bakterium *Chlamydia pneumonia* und der Atherosklerose [12, 13].

## 1.2. Entstehung und Progression der Atherosklerose

Die gesunde Endothelschicht der Arterien stellt die Barriere zum fließenden Blut dar. Über die Kontraktion der Arterien reguliert das Endothel den Gefäßtonus und hindert ferner Leukozyten und Thrombozyten aus dem Blut in die Gefäßwand einzuwandern. Diese antiatherogenen Funktionen sind vor allem auf das Enzym endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (*eNOS; endothelial Nitric synthase*) zurückzuführen, welches die vasoaktive Substanz Stickstoffmonoxid (NO) bildet [14]. Eine Störung der endothelialen Funktion ist ein initialer Schritt zur Entstehung der Atherosklerose. Verschiedene proatherogene Stimuli wie proinflammatorische Zytokine, reaktive Sauerstoffspezies (*Reactive Oxygen Species; ROS*), hohe Konzentrationen an oxidiertem LDL sowie eine Störung des laminaren Blutflusses können zu einer endothelialen Dysfunktion führen. Besonders in der Aortenwurzel, im Aortenbogen sowie in arteriellen Abzweigungen begünstigt ein nicht-laminarer Fluss die Entstehung atherosklerotischer Läsionen [15, 16]. Eine Dysfunktion des Endothels ist u. a. durch eine verminderte Bioverfügbarkeit von NO, erhöhte Permeabilität und Aktivierung des Endothels charakterisiert. Infolgedessen kommt es zur Akkumulation von Lipoproteinen bzw. LDL in der Gefäßwand, welches nachfolgend z. B. durch Oxidation modifiziert wird [17]. Die Aktivierung des Endothels führt zur Expression von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1 (*vascular adhesion molecule-1*) [18] und ICAM-1 (*intracellular adhesion molecule*), die eine Migration von Monozyten und T-Zellen aus dem Blutkreislauf in die Gefäßwand einleiten. Die Akkumulation von Monozyten in der Intima wird außerdem durch MCP-1 (*monocyte chemoattractan protein-1*) stimuliert, einem potenten chemotaktischen Faktor, der die Rekrutierung von Monozyten an Entzündungsherde fördert [19].

Nach der Migration in die Intima reifen die Monozyten unter Einwirkung von M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) zu Makrophagen [20, 21]. Über Scavenger Rezeptoren (*Scavenger receptor; SR-A*) nehmen die Makrophagen modifiziertes LDL und damit auch Cholesterin auf und es kommt zur Bildung von sogenannten Schaumzellen (*foam cells*) [22].

Ansammlungen solcher lipidgefüllter Makrophagen, sogenannter Fettstreifen (*fatty streaks*), die in geringerem Maße auch eingewanderte T-Zellen beinhalten, können sich schon in frühem Alter bilden und werden als die frühesten klinischen Manifestationen atherosklerotischer Läsionen beschrieben [23].

Das Fortschreiten der atherosklerotischen Läsionen wird durch eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Proteinasen, Gewebefaktor (*tissue factor*, *TF*) und ROS gefördert, die von den migrierten Leukozyten produziert werden.

Im weiteren Verlauf der Atherosklerose kommt es zur Proliferation und Migration von vaskulären glatten Muskelzellen (*Vascular smooth muscle cell*; *VSMC*) von der Media in die Intima [24]. Eingewanderte VSMCs produzieren unter atherogenen Stimuli vermehrt extrazelluläre Matrix-Moleküle wie Kollagene und Proteoglykane. Dies führt zur Bildung einer fibrösen Kappe (*fibrous cap*), welche die Plaque überdeckt und zum Lumen hin abgrenzt [9]. Generell wird durch den erhöhten Gehalt an extrazellulärer Matrix immer mehr LDL extrazellulär innerhalb der Plaques angereichert, da Apolipoprotein B, als ein Bestandteil von LDL, bevorzugt an Glykosaminoglykane (GAG) der Proteoglykane bindet [25]. Apoptose bzw. Nekrose von Schaumzellen, VSMCs und Endothelzellen führt zu einer zusätzlichen Akkumulation von Lipid, das sich in einem destabilisierenden nekrotischen Kern (*necrotic core*) innerhalb der Plaque ansammelt [24]. Der nekrotische Kern und die fibröse Kappe kennzeichnen das Stadium einer fortgeschrittenen Plaque [9].

### **1.3. Plaqueinstabilität und Komplikationen**

Verschiedene Mechanismen können zu einer Atherothrombose, also zu einer Bildung von Thromben im Kontext der Atherosklerose führen, die einem Herzinfarkt bzw. Schlaganfall vorausgehen [26]. Die häufigste Ursache ist eine Ruptur der atherosklerotischen Plaques. Aufgrund der Ruptur können prothrombotische Faktoren wie z. B. Gewebefaktor (*TF*), die sich innerhalb der atherosklerotischen Läsionen akkumuliert haben, in Kontakt mit Blut kommen und die Blutgerinnungskaskade initiieren, was zu einem Thrombus führen kann [27-30].

Die Stabilität atherosklerotischer Läsionen ist von deren Aufbau und Zusammensetzung abhängig. Eine stabile Plaque besitzt im Allgemeinen einen kleinen nekro-

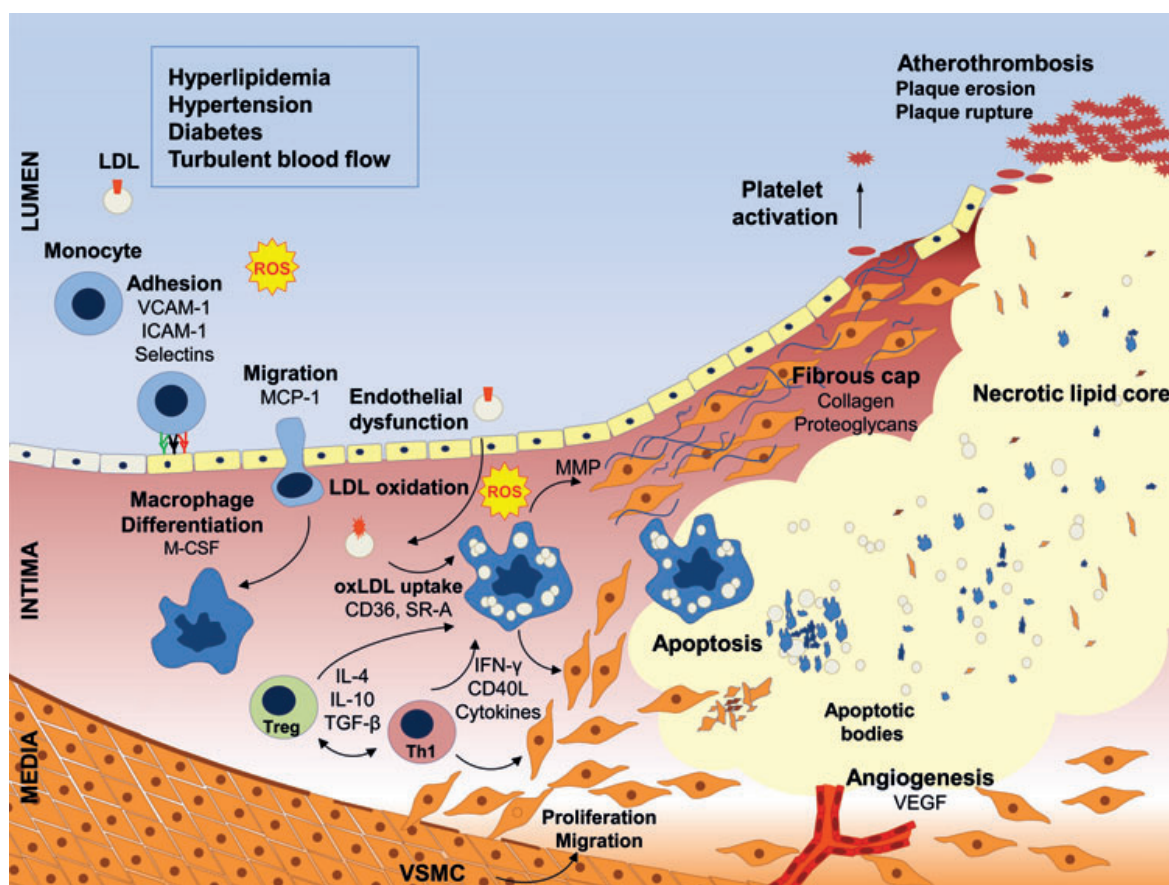
tischen Kern, der durch eine dicke fibröse Kappe vom Lumen getrennt ist [31], wohingegen komplizierte instabile atherosklerotische Läsionen davon abweichen und weitere unterschiedliche Merkmale aufweisen können. Mehrere Studien ergaben, dass Plaques mit einer dünnen fibrösen Kappe, einem vergrößerten nekrotischen Kern und einem hohen Gehalt an Makrophagen in besonderem Maße anfällig für eine Ruptur sind [9, 32-35]. Charakteristisch für eine dünne fibröse Kappe ist ein verminderter Gehalt an VSMCs und extrazellulärer Matrix [26]. Zur Schwächung der fibrösen Kappe könnten von Makrophagen sekretierte Matrix-Metalloproteinasen (MMP) beitragen [36]. MMPs degradieren extrazelluläre Matrix wie Kollagen und konnten bereits in Plaques nachgewiesen werden [37, 38]. Ferner inhibiert das von T-Zellen exprimierte Zytokin IFN- $\gamma$  (Gamma-Interferon) die Produktion neuer extrazellulärer Matrix, was ebenfalls zu einer Reduzierung der fibrösen Kappe beiträgt.

Eine weitere Komplikation kann eine intimale Kalzifizierung darstellen, die laut jüngerer Studien auf einen aktiv regulierten Prozess unter Beteiligung dedifferenzierter VSMCs zurückzuführen ist [39]. Der Nachweis von verschiedenen spezifischen Knochenproteinen innerhalb atherosklerotischer Plaques deutet auf Ähnlichkeiten zur Knochenbildung hin [40]. Bei der Kalzifizierung werden innerhalb der Läsionen Hydroxyapatit-Kristalle gebildet, die eine Destabilisierung der Plaque über eine verstärkte inflammatorische Antwort herbeiführen könnten [41]. Insgesamt wird die Rolle der Kalzifizierung bezüglich einer Begünstigung von Rupturen jedoch kontrovers diskutiert [42].

Weiterhin kann in fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques eine Neoangiogenese mittels kleiner Gefäße auftreten, die aus der Adventitia in die Plaque sprießen [24]. Diese Mikrogefäße sind fragil und weisen eine verstärkte Durchlässigkeit auf, wodurch es zu Blutungen innerhalb der Läsion und dadurch vermehrter Akkumulation an Lipid und Makrophagen kommen kann [43]. In der Folge vergrößert sich der nekrotische Kern, was zu einer erhöhten Rupturanfälligkeit der Plaque führen kann.

Ein weiterer Mechanismus, der die Bildung von Thromben laut pathologischer Untersuchungen mit geringerer Häufigkeit einleitet, ist die oberflächliche Erosion [26, 29, 44]. Erodierte Plaques sind durch einen hohen Gehalt an extrazellulärer Matrix (Typ III Kollagen, Versican und Hyaluronsäure) sowie VSMCs und geringen Akku-

mulationen an Makrophagen sowie eines Fehlens des Endothels charakterisiert [26, 45]. Die genauen Hintergründe, die zu einer Erosion führen können, sind noch nicht gänzlich aufgeklärt, eine Beteiligung von Hyaluronsäure, welche die Verdrängung des Endothels bzw. die Aggregation der Thrombozyten fördern könnte, wird vermutet [44].



**Abbildung 1.1: Schematischer Überblick über Schlüsselmechanismen der Atherosklerose bei der Entstehung atherosklerotischer Plaques.** Kontinuierliche Belastung durch Risikofaktoren kann eine endotheliale Dysfunktion verursachen, welche zu einer Anreicherung von Lipiden in der Intima, zur Expression von Adhäsionsmolekülen (VCAM-1, ICAM-1) und zur Sekretion von Chemokinen (MCP-1) führt. Dies fördert die Adhäsion und Transmigration von Leukozyten in die Gefäßwand. Die eingewanderten Monozyten differenzieren zu Makrophagen und internalisieren modifizierte Lipoproteine (oxLDL), die als Schaumzellen bezeichnet werden. Wechselwirkungen zwischen Makrophagen und anderen Leukozyten tragen zum atherogenen Prozess durch Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), Wachstumsfaktoren und Zytokinen bei. In der Folge wandern vaskuläre glatte Muskelzellen (VSMC) von der Media in die Intima ein und sekretieren extrazelluläre Matrixproteine, die eine fibröse Kappe bilden. Durch Apoptose der Zellen entsteht ein destabilisierender, lipidhaltiger, nekrotischer Kern. Eine potentielle Angiogenese sowie die Sekretion von MMP durch Makrophagen trägt weiterhin zur Destabilisierung der Plaque bei. Es kann zu einer Ruptur kommen. Die infolge der Ruptur exponierten prothrombotischen Faktoren kommen mit dem Blut in direkten Kontakt, was zu einer Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten und daraus resultierender Bildung eines Thrombus führt. ICAM-1: intracellular adhesion molecule; IFN- $\gamma$ , interferon-gamma; IL: interleukin; LDL: low-density lipoprotein; M-CSF: macrophage colony-stimulating factor; MCP-1: monocyte chemoattractant protein 1; MMP: matrix metalloproteinase; oxLDL: oxidized LDL; SR-A: scavenger receptor A; TGF- $\beta$ : transforming growth factor beta; VCAM-1: vascular adhesion molecule 1; VEGF: vascular endothelial growth factor; VSMC: vascular smooth muscle cells. Die Abbildung wurde mit freundlicher Genehmigung von A. Ludwig aus [46] übernommen.

## 1.4. Das ApoE-defiziente Mausmodell

Tiermodelle haben eine besondere Relevanz hinsichtlich der Erforschung, Behandlung und Diagnose von Erkrankungen. Gezielte genetische Veränderungen von Tieren bieten die Möglichkeit dem Krankheitsbild im Menschen besonders nahe zu kommen und so Krankheitsursachen realitätsnah zu erforschen.

Atherosklerose wurde bis Anfang der 1990er Jahre hauptsächlich anhand von Primaten [47], Schweinen [48] und Kaninchen [49] erforscht. Bei der Verwendung von Mausmodellen kommen diverse Vorteile gegenüber den genannten Organismen zum Tragen. Da das vollständige Genom der Maus entschlüsselt ist, besteht die Möglichkeit gezielt genetische Veränderungen vorzunehmen, die zu einem entsprechenden Phänotyp führen [50]. Mit Ausnahme der C57/BL6 Maus, die nach einer lang dauernden Fett-Diät atherosklerotische Läsionen in geringerem Maße ausbildet, sind die meisten Mausstämme normalerweise resistent gegenüber einer Entwicklung von Atherosklerose [51]. Anfang der 1990er Jahre wurde das ApoE-defiziente Mausmodell (ApoE<sup>-/-</sup>) vor dem C57/BL6-Hintergrund fast zeitgleich von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen generiert [52, 53]. Durch homologe Rekombination wurde das für das Protein Apolipoprotein E (ApoE) kodierende Gen inaktiviert. ApoE ist Bestandteil mehrerer Lipoproteine (VLDL, IDL, Untereinheiten von HDL und Chylomikronen) und fungiert als Ligand für Rezeptoren dieser Lipoproteine [54]. Über eine rezeptorvermittelte Aufnahme werden die Lipoproteine aus dem Blutplasma entfernt und der Leber zugeführt. Durch den *Knockout* des für das ApoE kodierenden Gens, erhöht sich der Cholesterinspiegel der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse um ein fünffaches, überwiegend durch erhöhte Konzentrationen an Cholesterin enthaltenden VLDL und Chylomikronen [51]. Gleichzeitig verringert sich die Plasmakonzentration an antiatherogenem HDL, so dass von einer Verschiebung des Plasma-Lipoproteinprofils gesprochen werden kann [54]. Diese Effekte lassen sich durch eine fettreiche Diät, wie z. B. der Western Typ Diät verstärken [51]. In der Konsequenz bilden ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse spontan atherosklerotische Plaques aus, die eine gute Vergleichbarkeit mit den humanen aufweisen und sich von *fatty streaks* bis hin zu komplexen atherosklerotischen Läsionen entwickeln [55]. In den letzten zwei Jahrzehnten wurde das ApoE<sup>-/-</sup>-Mausmodell in verschiedensten Forschungsrichtungen angewendet – mit 179 Veröffentlichungen allein im Zusammenhang mit Bildgebung im Jahr 2013 (PubMed). Wegen der genannten Eigenschaften wurde

das ApoE<sup>-/-</sup>-Mausmodell für die Untersuchungen der Nanopartikel-Anreicherungen in atherosklerotischen Läsionen ausgewählt.

## 1.5. Nichtinvasive bildgebende Modalitäten

Der Einsatz nichtinvasiver bildgebender Verfahren ermöglicht die Diagnose von Krankheiten und das Monitoring von Behandlungen ohne wesentliche Beeinträchtigung der Patienten. Es existieren verschiedene bildgebende Technologien, die sich in ihren Eigenschaften wie z. B. der räumlichen Auflösung oder der Sensitivität unterscheiden (Tabelle 1.1). Dabei nutzen alle bildgebenden Verfahren die Wechselwirkung eines externen energetischen Feldes mit dem jeweiligen Organismus [56]. In Abhängigkeit der Fragestellung wird die Modalität gewählt, die nach Abwägung der Vor- und Nachteile am geeignetsten erscheint. Während sich in der Vergangenheit *in-vivo*-Bildgebung größtenteils auf eine Darstellung der Anatomie beschränkte, aus der die Diagnose von Krankheiten oder Behandlungseffekte vergleichend abgeleitet wurden, ist es mittlerweile möglich, spezifische Moleküle nichtinvasiv darzustellen [57]. Für diese molekulare Bildgebung sind zumeist Kontrastmittel erforderlich, die auch als Bildgebungs sonden bezeichnet werden. So sind beispielsweise die Bildgebungsmodalitäten Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und *Single-Photon-Emission-computed-tomography* (SPECT) auf die Verwendung von radioaktiven Nukliden angewiesen, die eine sehr hohe Sensitivität liefern können. Im Gegensatz dazu ist die anatomische Darstellung sehr beschränkt, was eine Kombination mit anderen Verfahren wie der Computertomographie (CT) erfordert [57, 58]. Die Magnetresonanztomographie (MRT) hingegen zeichnet sich durch eine exzellente räumliche Auflösung bei der Darstellung von Weichteilgeweben aus, kann darüber hinaus molekulare Informationen liefern und benötigt keine schädigende Strahlung [8, 59]. Unter Verwendung von Kontrastmitteln sind auch in der MRT bestimmte Aspekte spezifisch darstellbar.

Im folgenden Abschnitt werden die Grundlagen der MRT näher erläutert, da diese Technik im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde.

**Tabelle 1.1: Überblick über verschiedene nichtinvasive Bildgebungsverfahren.** Modifiziert nach [57, 59].

Bildgebungsverfahren	Bildgenerierung	Auflösung	Sensitivität	Eindringtiefe	Kontrastmittel
MRT	Radiowellen	25-100 $\mu\text{m}$	$10^{-3}$ - $10^{-5}$ M	unbegrenzt	Gadolinium, Dysprosium, Eisenoxid-Partikel
CT	Röntgenstrahlen	50-200 $\mu\text{m}$	unzureichend charakterisiert	unbegrenzt	Iod
Ultrasound	Hochfrequenzschall	50-500 $\mu\text{m}$	unzureichend charakterisiert	mm bis cm	Mikroblasen ( <i>microbubbles</i> )
PET	$\gamma$ -Strahlung	1-2 mm	$10^{-11}$ - $10^{-12}$ M	unbegrenzt	$^{18}\text{F}$ , $^{11}\text{C}$ , $^{15}\text{O}$
SPECT	$\gamma$ -Strahlung	1-2 mm	$10^{-10}$ - $10^{-11}$ M	unbegrenzt	$^{99\text{m}}\text{Tc}$ , $^{111}\text{In}$ -Chelate
Fluoreszenztomographie	Licht im sichtbaren oder Nahinfrarotbereich	1 mm	unzureichend charakterisiert	<10 cm	Nahinfrarot-Fluorochrome

## 1.6. Magnetresonanztomographie (MRT)

### 1.6.1. Grundlagen der MRT

Elektronen, Protonen und Neutronen besitzen eine intrinsische Eigenschaft, den sogenannten Spin oder Eigendrehimpuls. Der Gesamtspin eines Atomkerns, kurz Kernspin, hängt von der Anzahl an Protonen und Neutronen ab. Im Grundzustand ist der Kernspin von Atomkernen mit gerader Protonen- und gerader Neutronenzahl immer 0, da die Spins von jeweils zwei gleichartigen entgegengesetzt ausgerichteten Nukleonen den energetisch niedrigsten Zustand darstellen. Atomkerne mit einer ungeraden Massenzahl dagegen besitzen einen Gesamtdrehimpuls und dadurch auch ein magnetisches Moment, das sich aus dem Spin und der positiven Ladung ergibt.

Im Besonderen sind Wasserstoffkerne ( $^1\text{H}$ ) mit einem einzelnen Proton im Atomkern für die Generierung von MR-Bildern geeignet, da sie im Vergleich zu  $^{31}\text{P}$ ,  $^{23}\text{Na}$  oder  $^{19}\text{F}$ , die ebenfalls über magnetische Momente verfügen, in Form von Wasser und Fett in großem Ausmaß im Körper präsent sind und zudem über ein größeres gyromagnetisches Verhältnis verfügen [60].



Elemente mit ungepaarten Protonen können als kleine Magnete oder magnetische Dipole mit Nord- und Südpol aufgefasst werden [61], die unter normalen Umständen (in Abwesenheit eines externen Magnetfeldes) in einem ungeordneten Zustand vorliegen und statistisch in alle Raumrichtungen gleich verteilt sind. Werden die Protonen einem externen Magnetfeld  $B_0$  ausgesetzt, so findet eine Ausrichtung in Richtung der z-Achse entlang des Magnetfeldes statt. Um die Richtungen der magnetischen Felder zu beschreiben, wird ein Koordinatensystem mit den drei orthogonalen Achsen x, y und z verwendet, wobei die z-Achse parallel zu  $B_0$  definiert wird [60]. Für ein einzelnes Proton gibt es aufgrund des Quantenphänomens nur 2 verschiedene Arten der Ausrichtung, die parallele (in Richtung des externen Magnetfeldes) oder die antiparallele (entgegengesetzt zum externen Magnetfeld). Der Zustand in Richtung des Feldes ist der energieärmere, wodurch in der Summe in einem Stoff mit hoher Protonenzahl immer einige wenige Protonen die parallele Ausrichtung bevorzugen (Abbildung 1.2). Als Konsequenz ergibt sich insgesamt eine geringe Nettomagnetisierung entlang des externen Magnetfeldes, die sogenannte Longitudinalmagnetisierung, die allerdings nicht messbar ist, da sie in der selben Ausrichtung wie die des externen Magnetfeldes verläuft. Das externe Magnetfeld wirkt sich des Weiteren auch auf den Spin der Protonen aus, indem es eine Richtungsänderung der Rotation bewirkt. Die Bewegung lässt sich mit der Bewegung eines Kreisels vergleichen, auf den eine äußere Kraft wirkt, die eine Ausweichbewegung induziert. Diese Bewegung wird als Präzession bezeichnet und erfolgt je nach Element mit einer charakteristischen Frequenz, der Larmorfrequenz ( $\omega_0$ ). Sie ist von der Stärke des externen Magnetfeldes und dem gyromagnetischen Verhältnis ( $\gamma_0$ ), einer für jedes Element kennzeichnenden Konstante, abhängig und lässt sich durch folgende Gleichung beschreiben:

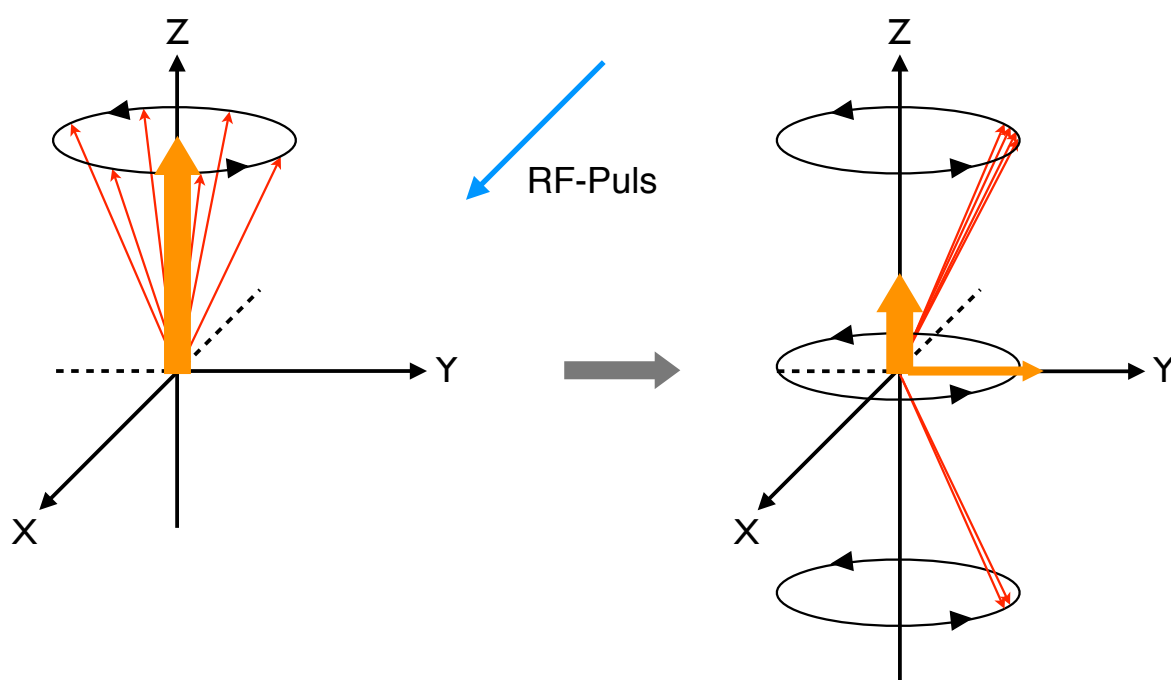
$$\omega_0 = \gamma_0 \times B_0$$

Je stärker demnach das externe Magnetfeld (in Tesla; [T]) ist, desto höher ist die Larmorfrequenz und somit auch das später daraus resultierende Signal [62]. Für Wasserstoff ( $^1\text{H}$ ) besitzt die Larmorfrequenz bei einer Feldstärke von einem Tesla einen Wert von 42, 574 MHz [61].

Wird zusätzlich ein kurzer Hochfrequenzimpuls (oder Radiofrequenzimpuls; RF-Impuls) mit der Larmorfrequenz (Resonanzfrequenz) von außen eingestrahlt, so

wirkt sich dies in mehrerlei Hinsicht auf die Ausrichtung der Protonen aus. Einerseits gelangen einige Protonen durch die Energieübertragung des RF-Impulses auf ein höheres Energieniveau und richten sich nun antiparallel zu  $B_0$  aus, wodurch die Longitudinalmagnetisierung abnimmt [63]. Andererseits bewirkt der RF-Impuls eine Synchronisierung der präzidierenden Protonen (Abbildung 1.2). Normalerweise verläuft die Präzession ungeordnet, so dass sich die magnetischen Momente aller Protonen in der Summe aufheben, d.h. in Richtung der xy-Ebene entsteht keine Magnetisierung.

Durch die Präzession in Phase addieren sich die magnetischen Momente der Protonen konstruktiv und es ergibt sich in der Summe ein magnetisches Moment in der xy-Ebene, die sogenannte transversale Magnetisierung. Durch die Präzession der transversalen Magnetisierung wird ein elektromagnetisches Wechselfeld induziert, welches als MR-Signal messbar ist.

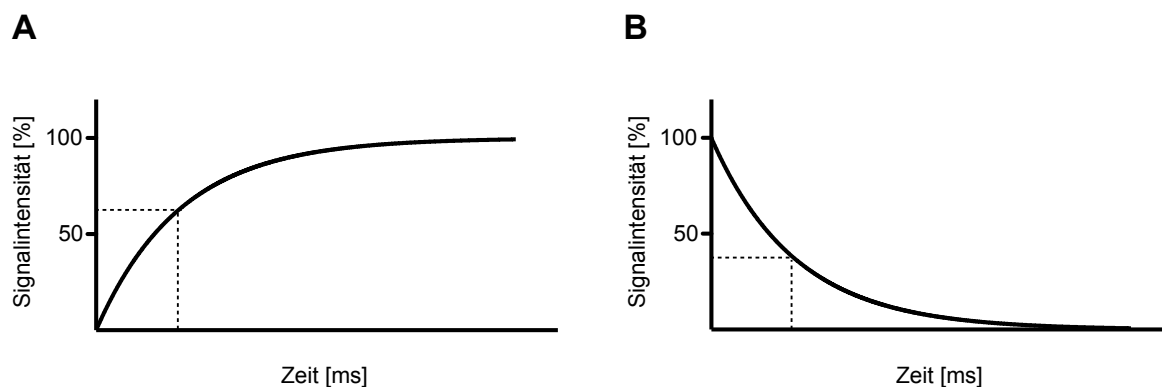


**Abbildung 1.2: Ausrichtung und Präzession der Protonen im externen Magnetfeld (links) und nach Einstrahlen eines Radiofrequenzimpulses (rechts).** Im externen Magnetfeld bildet sich eine longitudinale Magnetisierung entlang der z-Achse in Richtung des externen Magnetfeldes. Nach Einstrahlen eines RF-Pulses in der Larmorfrequenz der Protonen werden einige Protonen durch die Energieübertragung auf ein höheres Energieniveau gehoben und richten sich antiparallel aus, wodurch die Longitudinalmagnetisierung abnimmt. Des Weiteren bewirkt der RF-Impuls eine Präzession in Phase wodurch eine transversale Magnetisierung in xy-Ebene entsteht, die sich mit den präzedierenden Protonen bewegt. Modifiziert nach [64].

### 1.6.2. Relaxation

Nach Abschalten des RF-Impulses kehrt das Spin-System wieder in den Ausgangszustand zurück. Dieser Prozess wird Relaxation genannt [60]. Die Longitudinalmagnetisierung nimmt wieder zu, da die Protonen Energie an die Umgebung (Gitter) abgeben und dadurch wieder das energieärmere Niveau in Richtung des externen Magnetfeldes besetzen. Diese Relaxation wird auch als T1 (longitudinale Relaxationszeit) oder Spin-Gitter-Relaxation bezeichnet [65]. Zeitgleich nimmt die transversale Magnetisierung ab, da die magnetischen Momente außer Phase geraten und sich dadurch nach und nach gegenseitig wieder aufheben. Als Folge wird eine Abnahme des MR-Signals beobachtet, die auch als *free induction decay* (FID) bezeichnet wird [61]. Eine Komponente für diese sogenannte Dephasierung sind Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Magnetfeldern benachbarter Protonen, die zudem ungleich im Gewebe verteilt sind. Diese T2-Relaxationszeit wird deshalb auch Spin-Spin-Relaxation genannt [65]. Interne Feldinhomogenitäten des externen Feldes führen zusätzlich zu einer Dephasierung der Protonen, da die Larmorfrequenz abhängig von  $B_0$  ist (siehe oben). Diese Komponente kombiniert mit der Spin-Spin-Relaxation wird als T2\*-Relaxation bezeichnet [60]. T1- und T2-Relaxationsprozesse lassen sich durch exponentielle Kurven mit den jeweiligen Zeitkonstanten T1 und T2 beschreiben (Abbildung 1.3). T1 beschreibt den Zeitpunkt, an dem die Longitudinalmagnetisierung wieder 63% des Ausgangswertes beträgt, während T2 den Zeitpunkt beschreibt, zu dem noch 37% der transversalen Magnetisierung vorliegen [62]. Beide Zeitkonstanten sind von der physiochemischen Umgebung der Protonen abhängig, so dass Gewebe mit unterschiedlichen Wasser- und Fettgehalten aufgrund von unterschiedlichen T1- bzw. T2-Relaxationszeiten differenziert werden können. Flüssigkeiten haben eine lange T1- und lange T2-Zeit, während Fett eine kurze T1- und T2-Zeit aufweist.

Die unterschiedlichen Relaxationszeiten der Gewebe lassen sich durch geeignete Art der Messung bzw. Verwendung von unterschiedlichen Repetitionszeiten (*time to repetition*; TR) und Echozeiten (*time to echo*; TE) in ein gewebeabhängiges, unterschiedliches Messsignal überführen, so dass Bilder mit einem Gewebekontrast aufgenommen werden können.



**Abbildung 1.3: Exemplarische Relaxationskurven der longitudinalen (A) und transversalen (B) Magnetisierung und Veranschaulichung der Zeitkonstanten T1 und T2.** T1 ist die Zeit, bei der sich die longitudinale Magnetisierung zu 63% wieder erholt hat und T2 die Zeit, bei der noch 37% der transversale Magnetisierung vorhanden sind.

### 1.6.3. Kontrastmittel in der MRT

Neben den beschriebenen Möglichkeiten der Gewebedifferenzierung erlauben Kontrastmittel eine weitere Verbesserung des Kontrastes sowie eine gezielte Darstellung einzelner Gewebekomponenten und dynamischer Prozesse in der MR-Bildgebung [56]. Als Kontrastmittel eignen sich Substanzen, die sich modifizierend auf die Relaxationszeiten des Gewebes auswirken und dadurch den Bildkontrast verändern [66]. Sowohl paramagnetische Metallkomplexe wie Gadolinium-Chelate ( $Gd^{3+}$ ), als auch superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel wirken sich in unterschiedlichem Maße verkürzend auf T1-, T2- bzw. T2\*-Relaxationszeiten aus [67, 68]. Gadolinium besitzt sieben ungepaarte Elektronen, die bei Anlegen eines externen Magnetfeldes kleine lokale Magnetfelder bilden und dadurch T1 und T2 verkürzen [69, 70]. Es wird vor allem in vergleichsweise geringen Konzentrationen als T1-Kontrastmittel verwendet [71]. In einer T1-gewichteten Sequenz wirkt sich die Verkürzung als Signalzunahme, d. h. einem helleren Bild aus [72], da die Longitudinalmagnetisierung schneller relaxiert und somit zum Zeitpunkt der nächsten Anregung eine höhere Longitudinalmagnetisierung zur Anregung zur Verfügung steht (*positive Verstärkung; positive enhancement*).

Eisenoxid-Nanopartikel dagegen besitzen meist einen dominanten Effekt auf die T2- bzw. im Besonderen auf die T2\*-Relaxationszeit und werden primär in Verbindung mit T2- bzw. T2\*-gewichteten Sequenzen angewendet. Die superparamagnetischen Partikel wirken als kleine Magnete, die starke lokale Feldinhomogenität

ten verursachen und dadurch die Dephasierung beschleunigen [73, 74]. Dies führt zu einer schnelleren Relaxation der transversalen Magnetisierung. Das Signal ist dementsprechend niedriger. Man spricht von einer sogenannten negativen Verstärkung (*negative enhancement*). Obwohl Eisenoxid-Nanopartikel entsprechend ihrer vorherrschenden Anwendung als T2-Kontrastmittel bezeichnet werden [66, 71], besitzen sie zudem einen Einfluss auf die T1-Relaxation [75], so dass in geringen Konzentrationen bei T1-gewichteter Bildgebung eine Kontrasterhöhung möglich ist. In höheren Dosierungen überwiegt der T2-/T2\*-Effekt [76].

Die Fähigkeit eines Kontrastmittels Relaxationszeiten bzw. Relaxationsraten (Kehrwerte der Relaxationszeiten) zu beeinflussen, wird als Relaxivität mit der Einheit [ $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ] bezeichnet [69]. Je höher die jeweilige Relaxivität eines Kontrastmittels ist, desto größer ist der Einfluss auf die Relaxationszeiten und desto stärker ist der Kontrast [66]. Im Allgemeinen besitzen Eisenoxid-Nanopartikel größere Relaxivitäten als gadoliniumhaltige Kontrastmittel [74].

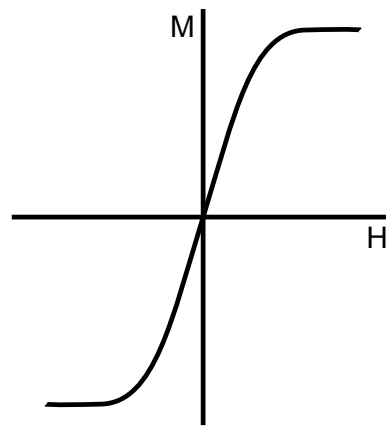
Allerdings bringt die Verwendung von gadoliniumhaltigen Kontrastmitteln Nachteile mit sich, da freies Gadolinium toxischen Einfluss auf Gewebe ausübt. Um diesen Effekt zu umgehen, wird es in Komplexen wie z. B. mit EDTA oder DTPA chelatiert [69]. Studien, die die Stabilität der  $\text{Gd}^{3+}$ -Chelate nach Applikation in Patienten untersuchen, gingen lange Zeit von einer ausreichenden Stabilität des Gadolinium-Komplexes und dadurch gewährleisteten Sicherheit in der klinischen Anwendung aus [77-79]. Dagegen haben *in-vitro*-Untersuchungen von einigen gadoliniumhaltigen Kontrastmitteln gezeigt, dass das Gadolinium den Komplex verlassen und folglich zu Schädigungen führen kann, sofern eine zeitnahe Ausscheidung der Gadolinium-Komplexe über die Nieren nicht gewährleistet ist [80]. Diese Schädigungen können sich als Nephrogene systemische Fibrose (NSF) manifestieren, die nach Gabe von gadoliniumhaltigen Kontrastmitteln bei Patienten mit einer chronischen Niereninsuffizienz festgestellt wurde [81, 82]. Somit muss besonders bei eingeschränkter Nierenfunktion auf die Anwendung stabiler gadoliniumhaltiger Kontrastmittel geachtet werden. Kritisch zu betrachten ist die Entwicklung von gadoliniumhaltigen Kontrastmitteln, die auf eine selektive Anreicherung in bestimmten Geweben streben, da dies einer schnellen Ausscheidung widerspricht.

## 1.7. Eisenoxid-Nanopartikel

### 1.7.1. Superparamagnetismus der Eisenoxid-Nanopartikel

Superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel haben aufgrund ihrer Eigenschaften eine besondere Relevanz im Bereich der MRT. Sie bestehen zumeist aus Magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), Maghemit ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) bzw. Mischformen aus beiden [76].

Sowohl Magnetite als auch Maghemite sind Kristalle aus den Elementen Eisen und Sauerstoff, die sich in einem klar geordneten System organisieren. Obwohl sich die magnetischen Eigenschaften von Magnetit und Maghemit unterscheiden, weisen beide eine ähnliche Kristallstruktur in Form eines kubisch inversen Spinells auf. Superparamagnetische Stoffe werden durch zwei Phänomene beschrieben, die sich aus der beschreibenden Hystereseurve ableiten (Abbildung 1.4).



**Abbildung 1.4: Hystereseurve für superparamagnetische Stoffe.** Die Magnetisierung (M) erreicht bereits bei geringen Feldstärken des externen Feldes (H) eine Sättigungsmagnetisierung. Nach Abschalten des externen Feldes verbleibt keine Remanenz.

Zum einen zeigen sie im Gegensatz zu ferromagnetischen Partikeln ausschließlich einen Magnetismus, wenn sie einem externen magnetischen Feld ausgesetzt sind und verlieren diesen wieder, sobald das Feld abgeschaltet ist [73]. Dementsprechend tritt keine Remanenz auf, was die Stabilität von Eisenoxid-Nanopartikel-Suspensionen ermöglicht, da in Abwesenheit eines Magnetfeldes keine magnetischen Interaktionen zwischen den Nanopartikeln auftreten [83].

Zum anderen erreicht der Superparamagnetismus eine Sättigungsmagnetisierung nach der auch eine gesteigerte Magnetfeldstärke keine Zunahme der Magnetisierung mehr verursachen kann. Superparamagnetismus tritt bei sehr kleinen Parti-

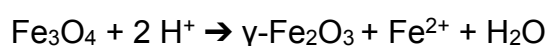
keln unterhalb einer bestimmten Größe auf, die als eine einzelne magnetische Domäne aufgefasst werden können. Der Superparamagnetismus zeichnet sich durch sehr hohe magnetische Momente aus, die aus der kristallinen Struktur der Nanopartikel resultieren, welche eine Ausrichtung benachbarter Spins erleichtert [84]. Im Kontext von Magnetresonanztomographie (MRT) verursachen diese starken magnetischen Momente der Partikel im Gewebe lokale Feldinhomogenitäten, wodurch eine rasche Dephasierung der Kernspins verursacht wird [84], was sich wiederum in einer verkürzten T2- bzw. T2\*-Relaxationszeit ausdrückt (siehe 1.6.3.). Relativ dazu wird die T1-Relaxation durch die meisten superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikel in deutlich geringerem Maße beeinflusst, kann aber bei bestimmten Partikeln in verschiedenen Anwendungen wie z. B. der Magnetresonanztomographie (MRA) dennoch genutzt werden (siehe 1.7.3.).

### 1.7.2. Synthese und Stabilisierung von Eisenoxid-Nanopartikeln

Es existieren verschiedene Strategien, um Eisenoxid-Nanopartikel zu synthetisieren. Neben der thermischer Zersetzung, der Mikroemulsion, der Hydrothermalsynthese und diversen anderen Methoden stellt die Mitfällung bzw. Kopräzipitation eine relativ effektive Möglichkeit zur Synthese dar [83, 85-87]. Diese Methode wurde zur Herstellung der Eisenoxid-Nanopartikel im Rahmen dieser Arbeit verwendet. Dabei werden Fe(II)- und Fe(III)-Salze in einem bestimmten stöchiometrischen Verhältnis in wässriger Lösung gemischt. Durch Zugabe einer Base (z. B. NaOH oder Ammoniak) kommt es zur Kondensation des Eisens in 3 Raumrichtungen. Infolgedessen wird ein Kristall aus Eisen- und Sauerstoffatomen gebildet, das sogenannte Magnetit. Die Reaktion lässt sich wie folgt zusammenfassen [88]:



Das entstandene Magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) besteht aus  $\text{Fe}^{2+}$  als auch  $\text{Fe}^{3+}$  und kann in Abhängigkeit vom pH und Temperatur in Anwesenheit von Sauerstoff zu Maghemit ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) oxidiert bzw. umgewandelt werden:

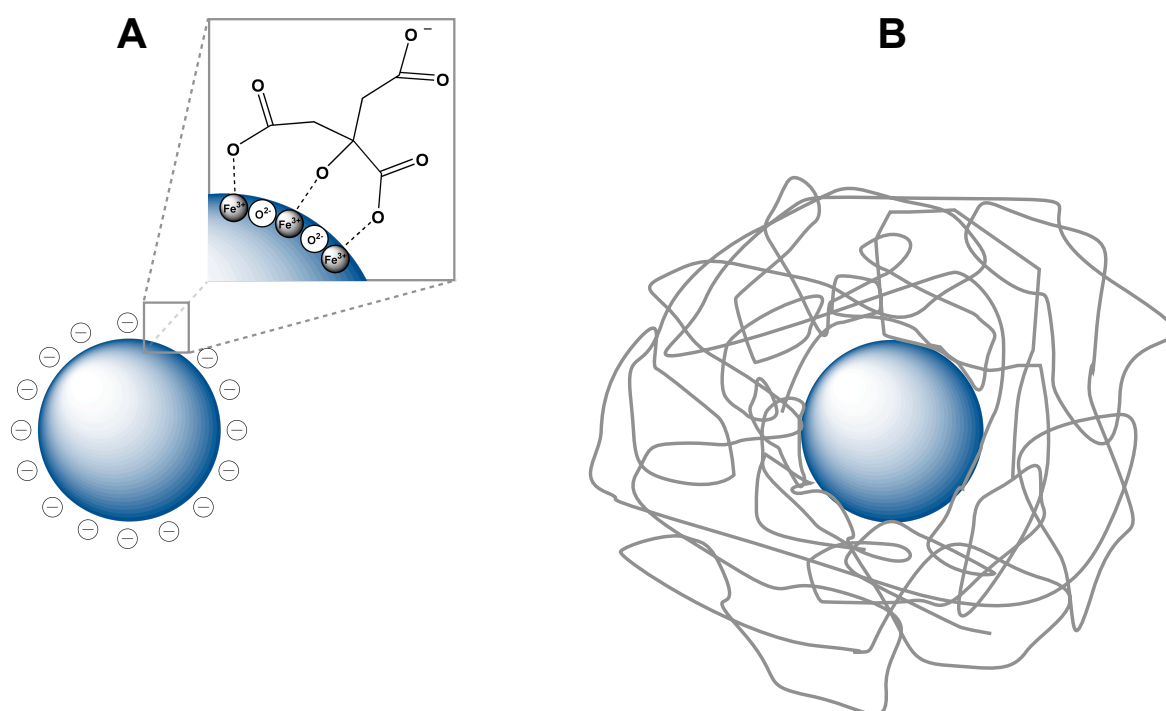


Im Unterschied zu Magnetit besteht Maghemit ausschließlich aus  $\text{Fe}^{3+}$ . Die Zugabe von organischen Säuren im Überschuss zum eingesetzten Eisen, wie es im Rahmen dieser Arbeit während der Beschichtung durchgeführt wurde, fördert eine Oxidation zu Maghemit. Die resultierenden Eisenoxid-Nanopartikel besitzen einen Kern, der aus einer Kombination von Magnetit und Maghemit besteht.

Insgesamt ist die Größe und Zusammensetzung der magnetischen Nanopartikel vom verwendeten Salz, dem  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ -Verhältnis, der Temperatur, dem pH-Wert und der Ionenstärke des Mediums abhängig. Bei festgelegten Synthesebedingungen lassen sich die Synthesen in einem gewissen Rahmen gut reproduzieren [85].

Um eine Anwendung von Eisenoxid-Nanopartikeln zu gewährleisten, ist deren Stabilität eine unerlässliche Prämisse [88]. Aufgrund von anziehenden Van-der-Waals-Kräften sind Eisenoxid-Nanopartikel bei neutralem pH grundsätzlich instabil und tendieren zur Aggregation [83, 89]. Über eine Beschichtung auf der Nanopartikeloberfläche kann diese Stabilität gewährleistet werden [76, 90-92]. In Abhängigkeit vom Beschichtungsmaterial werden Nanopartikel entweder sterisch, elektrostatisch [93] oder durch eine Mischung aus beidem stabilisiert [88] (siehe Abbildung 1.5). Polymere wie Dextran [94, 95], Carboxydextran, Gelatine [96] oder Polyethylenglycol (PEG) [97] bilden Schichten auf der Oberfläche der Nanopartikel, die eine sterische Abstoßung der Nanopartikel untereinander bewirken. Monomere Beschichtungen mit z. B. Citronensäure [98] oder Dimercaptobernsteinsäure (DMSA) [99] ermöglichen über elektrostatische Abstoßung ebenfalls stabile Nanopartikel-Suspensionen. Dabei können einige monomere Moleküle, wie etwa bei der Beschichtung mit Citronensäure, den Nanopartikeln eine Oberflächenladung verleihen, wodurch es zur repulsiven Abstoßung der Partikel untereinander kommt. Die Ladung resultiert bei der Citronensäure aus einer Carboxygruppe, die nicht an der Komplexbindung auf der Eisenoxidoberfläche beteiligt ist. In Abhängigkeit vom pH kann die Carboxygruppe ( $\text{COOH}$ ) deprotoniert werden ( $\text{COO}^-$ ), was eine negative Ladung auf der Partikeloberfläche bewirkt, die den Nanopartikeln Stabilität verleiht. In Abbildung 1.5 sind schematisch ein über Citronensäure elektrostatisch und ein sterisch stabilisiertes Eisenoxid-Nanopartikel dargestellt.





**Abbildung 1.5: Schematische Darstellung von elektrostatisch (A) und sterisch (B) stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikeln.** In dem vergrößerten Bildausschnitt des elektrostatisch stabilisierten Partikels (A) ist exemplarisch ein auf der Partikeloberfläche komplexiertes Citronensäuremolekül in einer möglichen Anordnung dargestellt. In dieser schematischen Darstellung gehen 2 Carboxygruppen und die Hydroxygruppe Bindungen mit den Eisenionen auf der Oberfläche der Kerne ein. Die dritte Carboxygruppe ragt in die Peripherie und ist in dieser Darstellung deprotoniert, woraus eine stabilisierende negative Ladung resultiert. Das sterisch stabilisierte Nanopartikel (B) ist durch ein Polymer beschichtet, was zu einem insgesamt vergrößerten Durchmesser führt.

In Folge der unterschiedlichen Beschichtung mit Polymeren/Monomeren ergeben sich Differenzen in Bezug auf den hydrodynamischen Durchmesser sowie den Charakter der Oberflächen. In Abhängigkeit von der Kerngröße werden Eisenoxid-Nanopartikel in der Literatur in zwei Klassen unterteilt. Partikel mit einem hydrodynamischen Durchmesser von über 50 nm werden als *Super Paramagnetic Iron Oxide* (SPIO), kleinere Partikel als *Ultrasmall SuperParamagnetic Iron Oxide* (USPIO) bezeichnet [100]. Mittlerweile existiert eine Vielzahl an verschiedenen Eisenoxid-Nanopartikeln, die sich hauptsächlich in der Größe und im Beschichtungsmaterial unterscheiden. Tabelle 1.2 gibt einen Überblick über einige wichtige Eisenoxid-Nanopartikel, die sich in klinischer Anwendung bzw. vorklinischer Prüfung befinden.

**Tabelle 1.2: Überblick über superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel in klinischer Anwendung bzw. vorklinischer Prüfung.** Modifiziert nach [87].

Eisenoxid-Nanopartikel	allgemeiner Name	Kern	Typ/Klasse	Kerngröße/ hydrodynamischer Durchmesser [nm]	Beschichtung	Anwendung
AMI-225	Ferumoxid, Feridex®, Endorem®	Fe <sup>3+</sup> /Fe <sup>2+</sup>	SPIO	5-6 80-150	Dextran	Leber, Milz, Knochenmark
SHU 555A	Ferucarbotran, Resovist®	Fe <sup>3+</sup> /Fe <sup>2+</sup>	SPIO	4,2 50-100	Carboxydextran	Leber, Milz, Knochenmark
AMI-227	Ferumoxtran-10 Sinerem®, Combidex®	Fe <sup>3+</sup> /Fe <sup>2+</sup>	USPIO	4-6 20-40	Dextran	MRA, Leber, Milz, Atherosklerose
P904	-	Fe <sup>3+</sup> /Fe <sup>2+</sup>	USPIO	4-6 21	Amino-Alkohol-Glukose-Derivat	MRA, Atherosklerose, Adipositas
SHU 555 C	Ferucarbotran, Supravist®	Fe <sup>3+</sup> /Fe <sup>2+</sup>	USPIO	3-4 20-30	Carboxydextran	MRA, Lymphknoten
Code 7228	Ferumoxytol, Feraheme®	Fe <sup>3+</sup> /Fe <sup>2+</sup>	USPIO	6-7 28-32	Carboxymethyldextran	MRA
MION-46 L	-	Fe <sup>3+</sup> /Fe <sup>2+</sup>	MION	4-6 8-20	Dextran	MRA, Lymphknoten, Tumor
VSOP	-	Fe <sup>3+</sup> /Fe <sup>2+</sup>	VSOP	4-6 7-11	Citronensäure	MRA

### 1.7.3. Kinetiken und Anwendungen von Eisenoxid-Nanopartikeln

Die Bluthalbwertszeiten von Eisenoxid-Nanopartikeln sind von ihrer jeweiligen Größe und Oberflächenbeschaffenheit abhängig. Generell werden Nanopartikel nach intravenöser Applikation durch das retikuloendotheliale System (RES) bzw. das mononukleare Phagozytensystem (MPS) aufgenommen [101]. Besonders die Kupfferschen Sternzellen der Leber, Makrophagen in der Milz und Monozyten aus dem Blut erkennen die Nanopartikel als Fremdkörper und sorgen für eine mehr oder weniger schnelle Entfernung aus dem Blut [76, 102-104]. Nach Injektion interagieren die Nanopartikel in unterschiedlichem Ausmaß mit Plasma-Proteinen aus dem Blut, die im Rahmen der sogenannten Opsonierung eine Aufnahme durch phagozytierende Zellen fördern und somit zu einer schnellen Entfernung der Nanopartikel aus der Blutzirkulation beitragen [105]. Insgesamt zirkulieren kleinere Nanopartikel vergleichsweise länger als große [106-108] und hydrophile länger als

---

hydrophobe Partikel [103]. Des Weiteren werden geladene Partikel schneller als ungeladene opsoniert und entfernt [105].

In der Praxis bedeutet das gewöhnlich längere Zirkulationszeiten von sterisch stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikeln im Vergleich zu den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten elektrostatisch stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikeln wie z. B. den *very small iron oxide particles* (VSOP). Aufgrund der bevorzugten Aufnahme des RES kam es zu ersten medizinischen Anwendungen von Eisenoxid-Nanopartikeln, nämlich der Darstellung der Leber [109], der Lymphknoten [110] und des Knochenmarks [111] mittels MRT. Bei diesen und den im Folgenden beschriebenen Anwendungen wurde jeweils der T2-/T2\*-Effekt der Nanopartikel mit T2- bzw. T2\*-gewichteten Sequenzen wie z. B. Gradientenechosequenzen genutzt. AMI-25 (Feridex®; *Advanced Magnetics, Inc., Cambridge, MA*), ein mit Dextran beschichteter SPIO, und SHU 555A (Resovist®; *Bayer Healthcare Pharmaceuticals*) (siehe Tabelle 1.2), mit Carboxydextran beschichtet, sind durch die FDA (*Food and Drug Administration*) zugelassene Kontrastmittel, die sich aufgrund ihrer Größe rasch im RES anreichern und deshalb zur Darstellung der Leber genutzt wurden [104, 112]. So konnten Lebererkrankungen wie das hepatozelluläre Karzinom (HZK) über einen erhöhten Kontrast in einer T2- und T2\*-MRT-Sequenz aufgrund eines geringeren *negative enhancements* im Vergleich zu gesundem Lebergewebe diagnostiziert werden. Dabei wird ausgenutzt, dass im Tumorgewebe im Gegensatz zum gesunden Lebergewebe keine Kupfferschen Sternzellen vorkommen, die normalerweise Nanopartikel in großem Ausmaß aufnehmen. Analog dazu konnten Milztumoren in Ratten mittels 100 nm großer SPIO visualisiert werden [113]. Milztumoren besitzen keine ständig anwesenden Makrophagen und können somit aufgrund des hell bleibenden Kontrastes im Vergleich zum gesunden Milzgewebe lokalisiert werden, welches die SPIO aufnimmt und in T2- bzw. T2\*-Sequenzen dementsprechend dunkel erscheint. Mit dem gleichen Kontrasteffekt konnten metastatische Lymphknoten, die keine Makrophagen aufweisen, mittels USPIO von gesunden, Makrophagen-reichen Lymphknoten mittels USPIO differenziert werden. Aufgrund ihrer geringen Größe können USPIO bzw. Nanopartikel unter 30 nm aus dem vasikulären System extravasieren und werden folgend auf lymphogenem Weg weitertransportiert, wo sie schließlich durch Makrophagen der Lymphknoten aufgenommen werden. Auf diese Weise konnten maligne axilläre Lymphknoten mit Hilfe von Sinerem® [114] und Lymphknotenmetastasen bei Patienten mit Speiseröhren-

krebs unter Verwendung von mit Dextran beschichteten USPIO von gesunden Lymphknoten diskriminiert werden [115].

Eine Anwendung, die den T1-Kontrast der Eisenoxid-Nanopartikel nutzt, ist die MR-Angiographie (MRA, *MR Angiography*), mit der nichtinvasiv die Gefäße in T1-gewichteten Sequenzen dargestellt werden. Dadurch wird eine Diagnose von Gefäß-assoziierten Krankheiten wie Stenosen der Carotiden oder intrakraniellen Aneurysmen ermöglicht [116]. Unter Verwendung von Eisenoxid-Nanopartikeln wird die T1-Zeit des Blutes verkürzt, wodurch die Gefäße hell erscheinen und dadurch den Kontrast im Vergleich zum umgebenden Gewebe stark erhöhen [117]. MRA mit Eisenoxid-Partikeln ist nur bei Injektion einer relativ geringen Dosis von Nanopartikeln mit hohem R1-/R2-Verhältnis möglich. Bei höheren Konzentrationen, wie sie z. B. bei der MR-Bildgebung von Atherosklerose bei Versuchstieren nötig ist, überwiegt der T2-/T2\*-Effekt der Partikel und das Blut erscheint in konventionellen Sequenzen dunkel.

Erstmals wurde eine MRA erfolgreich an Ratten mit MION-46 (dextranbeschichtete Eisenoxid-Nanopartikel) durchgeführt [118]. Anschließend wurden MRAs an humanen Patienten unter Verwendung von Ferumoxtran-10 zur Darstellung von Thorax und Abdomen [119], sowie zur Verbesserung von 3D-MRA demonstriert [120]. Später konnte das Vermögen zu MRA auch anhand von *very small iron oxide nanoparticle* (VSOP) elektrostatisch stabilisierte Eisenoxid-Nanopartikel mit vergleichsweise kürzeren Halbwertszeiten gezeigt werden [121].

#### **1.7.4. Eisenoxid-Nanopartikel und MR-Bildgebung von atherosklerotischen Plaques**

Sterisch stabilisierte Eisenoxid-Nanopartikel konnten bereits zur Darstellung von atherosklerotischen Plaques mittels MRT-Bildgebung angewendet werden. Wie bei den zuvor beschriebenen Anwendungen wurde dabei der T2-/T2\*-Effekt der Eisenoxid-Nanopartikel ausgenutzt. So wurde eine Anreicherung von SPIO in Gefäßwänden von Patienten festgestellt, die im Nachhinein als atherosklerotische Läsionen identifiziert werden konnten [122]. Ursprünglich sollten Lymphknotenmetastasen der Patienten evaluiert werden. In weiteren Studien wurde eine Aufnahme von USPIO in humanen Plaques gezeigt [123, 124]. Weiterhin wurden Eisenoxid-Nanopartikel mittels MRT im Atherosklerosemodell des Kaninchens und der

Maus nachgewiesen. Erstmals wurden USPIO im Jahr 2000 in Plaques des Watanabe Kaninchenmodells demonstriert [125]. Es folgten Arbeiten mit anderen sterisch stabilisierten Partikeln wie Sinerem® (Ferumoxtran-10) [106, 126], P904 [127], MION-47 [128] und mit Mannan beschichteten Partikeln [129].

Im ApoE<sup>-/-</sup>-Mausmodell wurden SPIO (Feridex) in atherosklerotischen Plaques mittels Berliner-Blau-Färbung nachgewiesen, allerdings ohne MRT-Bildgebung [130]. Später konnten auch Anreicherungen von USPIO Sinerem® (Ferumoxtran-10; Guerbet AMAG Pharmaceuticals) [131, 132] und P904 (Guerbet) mittels MRT in atherosklerotischen Plaques dargestellt werden. Eine MRT-Bildgebung erfolgte jeweils frühestens 24 Stunden nach intravenöser Injektion. Im Unterschied zu den oben beschriebenen sterisch stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikeln konnte 2011 eine Anreicherung von VSOP im ApoE<sup>-/-</sup>-Mausmodell gezeigt werden [133]. Nach zweimaliger Injektion von jeweils 300 µmol Fe/kg wurde die MRT-Bildgebung 48 Stunden nach der ersten, bzw. 24 Stunden nach der zweiten Partikel-Applikation durchgeführt.

In den beschriebenen Arbeiten zum unspezifischen *Imaging* von Atherosklerose wurden die Eisenoxid-Nanopartikel durchweg hauptsächlich in Makrophagen der atherosklerotischen Läsionen lokalisiert. Makrophagen sind ein inflammatorisches Kennzeichen von atherosklerotischen Gefäßveränderungen (siehe 1.2.). Bei Patienten mit instabiler Angina Pectoris und nicht-transmuralem Herzinfarkt wurden vermehrt atherosklerotische Plaques mit einem großen Makrophagengehalt vorgefunden [34]. Dies unterstreicht die Anwendung der Eisenoxid-Nanopartikel als Marker für instabile atherosklerotische Läsionen.

Im Kontext der Atherosklerose-MRT-Bildgebung wurden neben den bereits beschriebenen unspezifischen Eisenoxid-Nanopartikeln auch funktionalisierte, spezifische Eisenoxid-Nanopartikel angewendet. Durch Kopplung verschiedener Moleküle an die Beschichtung bzw. Hülle der Eisenoxid-Nanopartikel können gezielt atherosklerotische Strukturen angesteuert werden.

Beispiele für verwendete Moleküle sind Antikörper oder spezifische Liganden von Rezeptoren. So wurden mit Polyethylenglykol (PEG) beschichtete und dadurch stabilisierte USPIO mit einem Peptid konjugiert, welches spezifisch von auf Endothelzellen vorkommenden VCAM-1 gebunden wird (*vascular cell adhesion molecule-1*). Nach Injektion in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden die Partikel in Endothelzellen und

Makrophagen innerhalb atherosklerotischer Plaques lokalisiert [134, 135]. Außerdem konnten über funktionalisierte USPIO atherosklerotische Läsionen des ApoE<sup>-/-</sup>-Mausmodells über den *scavenger receptor A* (SR-A) markiert werden. Dafür wurden USPIO ebenfalls über PEG mit einem für SR-A spezifischen Peptid gekoppelt [136].

## 1.8. Zielstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten zunächst verschiedene elektrostatisch stabilisierte Eisenoxid-Nanopartikel synthetisiert werden. Dies sollte durch Beschichtung der Partikel mit verschiedenen monomeren Säuren während der Synthese realisiert werden, wodurch Nanopartikel mit einem vergleichbaren, kleinen hydrodynamischen Durchmesser sowie unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften entstehen sollten. Um eine potentielle klinische Anwendung zu gewährleisten, sollten die Beschichtungsmoleküle biokompatibel sein und möglichst geringe Kosten verursachen. Als Referenz sollten die etablierten *very small iron oxide nanoparticles* (VSOP) dienen, die aufgrund einer Beschichtung mit Citronensäure auf der Oberfläche eine negative Ladung aufweisen, wodurch elektrostatische Stabilisierung erreicht wird.

Nach erfolgreicher Synthese neuer elektrostatisch stabilisierter Nanopartikel sollten diese in einem zweiten Schritt hinsichtlich ihrer Affinität zu atherosklerotischen Läsionen evaluiert werden. Als Modell sollte das ApoE<sup>-/-</sup>-Mausmodell verwendet werden. Der Nachweis der Nanopartikel sollte anfänglich im Wesentlichen mittels histologischer Berliner-Blau-Färbung erfolgen. Bei potentieller Anreicherung innerhalb der atherosklerotischen Plaques sollte eine weitere Methode erarbeitet werden, die einen quantitativen bzw. semi-quantitativen Vergleich der unterschiedlichen Anreicherungen erlaubt. Nach Möglichkeit sollte abschließend *ex-vivo*- bzw. optimalerweise *in-vivo*-MRT-Bildgebung durchgeführt werden, um eine Akkumulation des vielversprechendsten Partikel-Kandidaten in atherosklerotischen Läsionen des ApoE<sup>-/-</sup>-Modells zu dokumentieren.

## 2. Material

---

### 2.1. Geräte

7T Pharmascan 70/16	Bruker Biospin
Anästhesiegerät	Völker
Eindeckelautomat CV 5030	Leica
Färbeautomat 30 Autostainer XL	Leica
Feinwaage TE 214S	Sartorius
Gewebeeinbettautomat TP 1020	Leica
Icon 1T	Bruker Biospin
ICP-Element XR	Thermo Scientific
Kryostat 2800 Frigocut-E	Leica
Laser-Ablationsgerät <i>New Wave 213</i>	ESI
Magnet (40x40x20 mm; Magnetisierung: N42)	RoHS
Maus-Kopfspule RAPID (20 mm Durchmesser)	Biomedical
Mauskörperspule Icon	Bruker Biospin
Mikroskop <i>Axio Observer.Z1</i>	Zeiss
Mikrotiterplatten-Spektralphotometer <i>Power Wave XS2</i>	BioTek
Mikrotom RM 2125 RT	Leica
MPS-Gerät	Bruker Biospin
MR-Spektrometer <i>nq40 NMR analyzer</i>	Bruker Biospin
Paraffinautomat EG 1150 H	Leica
pH-Meter PB-11	Sartorius
Präparationsmikroskop SZ-STU1	Olympus
<i>Small animal and gating system</i>	SA Instruments
Spritzenpumpe	Alaris
TEM ( <i>TECNAI G2 20 S-Twin</i> )	FEI-Company
TEM EM906	Zeiss

Ultraschallbad RK 106	Sonorex
UV-Lampe	Benda
<i>Vivaflow</i> 200 Filter	Satorius
Wasserbad HI 1210	Leica
Zentrifuge 5810R	Eppendorf
<i>Zetasizer Nano ZS</i>	Malvern

## 2.2. Software

<i>Adobe Photoshop</i>	Version 10.0.1
<i>Gen5</i>	Version 1.07.5
<i>GraphPad Prism</i>	Version 5.0a
<i>ImageJ</i>	Version 1.46 r
<i>iWork Pages</i>	9
<i>Microsoft Office</i>	2004
<i>minispec</i>	Version 2.5.1
Osirix	Version 3.7.1
<i>Paravision</i>	Version 4.0
<i>SAM PC Monitor</i>	Version 8.02
<i>Visage</i>	Version 7.1
<i>Zetasizer</i>	Version 6.20

## 2.3. Sonstige Materialien

96-well Platten	Becton Dickinson
Atmungskissen	Graseby
EDTA-Monovetten	Sarstedt
EKG-Elektroden	Healthcare
Epon	Serva
Falcon-Röhrchen	BD
Gefaltete Einweg-Kapillarzelle	Malvern



Kanülen	BD Microlance
Mikrotomklingen	Feather
NMR-Rörchen	VWR
Obketträger Super Frost®Plus	Thermo scientific
Paraffin	Thermo Scientific
Paraffinkassetten	Leica
PCR-Gefäße	Applied Biosystems
Pipettenspitzen	Eppendorf
Spritzen	Braun
Spritzenfilter (0,2 µm)	Sartorius
Ultramikroküvette	Hellma Analytics
Zentrifugal Filter Einheiten (30kDa)	Amicon

## 2.4. Chemikalien und Substanzen

4-Amino-5-hydroxynaphthalin-2,7-disulfonsäure Mononatriumsalz, 85%	Aldrich
Aceton	Merck
Citronensäure ≥ 99,0%	Sigma-Aldrich
Diaminobenzidin (DAB)	Sigma
DL-Weinsäure, puriss. p.a.	Fluka
Eisen(II)-chlorid-tetrahydrat, Reagent Plus® 98,0%	Sigma-Aldrich
Eisen(III)-chlorid-hexahydrat, puriss.pa. Reagent, ≥99,0%	Sigma-Aldrich
Eisenstammlösung	Roth
Ethanol	Merck
Etidronsäure, 60%ige Lösung	Aldrich
Europium(III)-chlorid-hexahydrat, 99,5% <i>trace metal basis</i>	Aldrich
Formalin-Lösung (10% v/v)	J. T. Baker
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck
HCl	Merck
Isofluran (Forene 100% v/v)	Abbot
Kaliumhexacyanoferrat (II)-trihydrat	Merck

L-Äpfelsäure, puriss., ≥99,5% (T)	Fluka
<i>Low-Melting</i> Agarose	Sigma
Maleinsäure, puriss., ≥99,0% (HPLC)	Fluka
Mannitol, ≥98,0%	Sigma-Aldrich
<i>meso</i> -2,3-dimercaptobernsteinsäure (DMSA), 98,0%	Sigma
NaOH	Merck
<i>Neo-Mount</i> ®	Merck
Tatronsäure, ≥97,0%	Sigma-Aldrich
<i>Tissue Tek</i> ® O.C.T. Compound	Sakura
<i>trans</i> -Aconitsäure, 98,0%	Alfa Aesar
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (99%)	Sigma
Tween 20	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Sigma
Xylol	J. T. Baker

## 2.5. Puffer, Medien und Zusätze

Citrat-Puffer: 10 mM Tri-Natriumcitrat-Dihydrat; 0,05% Tween 20, pH 6,0	Sigma
FCS	Sigma
HEPES-Puffer: 10 mM HEPES; pH 7,4	Sigma
Isotonische Kochsalzlösung	Sigma
Kernechtrot	Merck
PBS	Gibco
Western Typ Diät	Altromin
Ziegenserum	Sigma

## 2.6. Kit-Systeme

Avidin/Biotin <i>Blocking Kit</i>	Vector Laboratories
ABC-Komplex	Vector Laboratories

## 2.7. Antikörper

Primärantikörper:

Rabbit-Anti-Ferritin Leichte Kette abcam®

Sekundärantikörper:

Ziege-Anti-Kaninchen-Biotin abcam®

## 2.8. Versuchstiere und Haltung

Alle Versuchstiere wurden von der Firma Taconic M&B (Dänemark) bezogen. Für die Untersuchungen zur Anreicherung der Nanopartikel in atherosklerotischen Plaques wurden männliche ApoE-defiziente (ApoE<sup>-/-</sup>)-Mäuse mit dem Stammnamen B6.129P2-Apoe<sup>tm1Unc</sup>N11 (C57BL/6-Hintergrund) in einem Alter von 8 Wochen bestellt. Ab diesem Alter wurden die Tiere zur Etablierung des Tiermodells zunächst zwischen 8 und 20 Wochen mit der Western Typ Diät (Altromin) gefüttert, die 0,21% Cholesterin und 21% Schweinefett enthält. Durch Fütterung mit dieser etablierten Fett-Diät wird die Entwicklung von Atherosklerose in den Gefäßen der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse beschleunigt [51]. Nach Auswertung der atherosklerotischen Plaques wurde eine Fütterungszeit von 16 Wochen für alle folgenden Versuche gewählt, die ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden also in einem Alter von 24 Wochen untersucht.

Für die Bestimmungen der Halbwertszeiten der Eisenoxid-Nanopartikel sowie zur Überprüfung der unspezifischen Anreicherung der Partikel in den Gefäßwänden wurden männliche C57BL/6-Wildtyp-Mäuse ebenfalls von Taconic M&B bestellt. Bis zu den Untersuchungen wurde diese Kontrollgruppe einer normalen Diät unterzogen. Die Versuche mit den C57BL/6-Mäusen erfolgte ebenfalls in einem Alter von insgesamt 24 Wochen.

Alle Tiere wurden unter standardisierten und kontrollierten Bedingungen gehalten (Temperatur  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , relative Luftfeuchtigkeit  $60 \pm 5\%$  und Tag-Nacht-Rhythmus für jeweils 12 Stunden). Die Tiere hatten Zugang zu entkeimtem Trinkwasser und dem jeweils oben beschriebenen Futter *ad libitum*. Alle Experimente wurden durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin (LAGeSo) unter dem Tierversuchvorhaben G0168/09 genehmigt.



## 3. Methoden

---

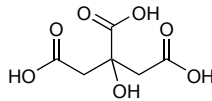
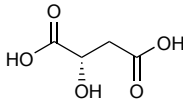
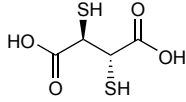
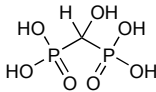
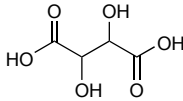
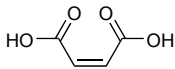
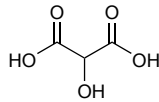
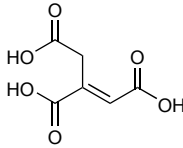
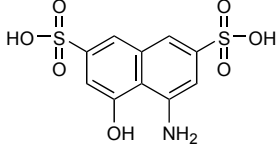
### 3.1. Synthese von elektrostatisch stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikeln mit monomeren Säuren

Die Synthese der verschiedenen Eisenoxid-Nanopartikel erfolgte in zwei Syntheseschritten nach einer modifizierten Methode nach Pilgrimm [137] bzw. Kang *et al.* [138]. Aus patentrechtlichen Gründen können hier nicht alle Modifikationen detailgetreu aufgeführt werden. Die Nanopartikel wurden durch eine Kopräzipitation (siehe 1.7.2.) von Eisen(II)-chlorid und Eisen(III)-chlorid in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:2 unter alkalischen Bedingungen synthetisiert. Als Base dienten NaOH (1,5 M) bzw. Ammoniumhydroxid (28%ige Lösung). Zunächst wurden Eisen(III)-chlorid und Eisen(II)-chlorid sukzessive unter Rühren bis zum vollständigen Lösen in eine saure Lösung unter einer inerten Atmosphäre gegeben. Anschließend erfolgte die Bildung der Partikel-Kerne durch Zugabe von NaOH für 30 min unter Rühren. Die entstandenen unbeschichteten Magnetitkerne wurden in einem zweiten Schritt mit der jeweiligen monomeren Säure beschichtet. Für die verschiedenen Beschichtungen mit den monomeren Säuren wurden jeweils separate Partikelsynthesen durchgeführt. Bei einer erfolgreichen Stabilisierung wurden die Synthesen mindestens einmal wiederholt, um eine gewisse Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. Bezogen auf die Stoffmenge wurde mit Ausnahme der DMSA-Partikel jeweils ein Überschuss des Beschichtungsstoffes im Verhältnis zum eingesetzten Gesamteisen verwendet. In der Konsequenz ergibt sich dadurch ein saurer pH (im Bereich von 3) bei dem ein großer Teil der Carboxygruppen der monomeren Säuren protoniert ist. Für Carboxygruppen konnte gezeigt werden, dass eine Beschichtung im Bereich der Halbäquivalenzpunkte (für schwache Säuren gilt:  $\text{pH} = \text{pK}_s$ ) einer maximalen Adsorption der monomeren Säuren auf den unbeschichteten Eisenoxidoberflächen führt [139]. Für die Beschichtung der Eisenoxid-Nanopartikel wurden die in Tabelle 3.1. aufgeführten Stoffe auf ihre Fähigkeit zur Bildung von stabilen, elektrostatisch stabilisierten Na-

nopartikeln überprüft. Die Bedingungen der einzelnen Beschichtungsexperimente wurden der jeweiligen Substanz angepasst und werden im Folgenden einzeln aufgeführt (3.1.1.-3.1.9.).

Für die Europium-dotierten VSOP wurden 5% (w/w) des Eisen(III)-chlorids durch Europium(III)-chlorid ersetzt. Alle anderen Syntheseschritte sowie die Beschichtung mit Citronensäure erfolgten analog zu den für VSOP beschriebenen (siehe 3.1.1.).

Tabelle 3.1: Übersicht über die monomeren Säuren, die zur Beschichtung bzw. Stabilisierung während der Synthese der elektrostatisch stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikel eingesetzt wurden.

Molekül	Chemische Struktur
Citronensäure	
L-Äpfelsäure	
<i>meso</i> -2,3-Dimercaptobernsteinsäure (DMSA)	
Etidronsäure	
DL-Weinsäure	
Maleinsäure	
Tartronsäure	
<i>trans</i> -Aconitsäure	
4-Amino-5-hydroxy-naphthalin-2,7-disulfonsäure	

### 3.1.1. Beschichtung von Eisenoxid-Nanopartikeln mit Citronensäure (VSOP)

Zu 420 ml der vorher synthetisierten Eisenoxid-Nanopartikel-Suspension (siehe 3.1.) mit einem Eisengehalt von 0,404 mol/L wurde eine Lösung aus 20,06 g Citronensäure ( $\geq 99,0\%$ ) und deionisiertem Wasser bei RT unter Rühren hinzugefügt. Innerhalb von 22 min wurde die Lösung auf 75°C erhitzt und bei dieser Temperatur für weitere 30 min gerührt. Anschließend wurde die Suspension für 40 min magnetisch separiert. Der Überstand (Fraktion 1; (F1)) wurde verworfen und das Präzipitat in 100 ml deionisiertem Wasser resuspendiert. Es folgte eine erneute Magnetseparation für 40 min. Folgend bildete sich eine dunkle Suspension (F2), die abgenommen und für 10 min bei RT bei 3939 x g zentrifugiert wurde. Anschließend wurde die F2 über Ultrafiltration mit einem 100 kDa Filter (*Vivaflow* 200 Filter; PES) und folgend mit einem 30 kDa Filter (*Vivaflow* 200 Filter; PES) mit deionisiertem Wasser bis zu einer Leitfähigkeit von  $\leq 10\mu\text{S}$  gewaschen und auf ein Volumen von ca. 20 ml konzentriert. Das Präzipitat wurde erneut in 100 ml deionisiertem Wasser resuspendiert. Die resultierende Suspension wurde einer Magnetseparation für 40 min unterzogen und der Überstand abgenommen (F3). Nach einer Zentrifugation bei RT und 3112 x g folgte eine Reinigung über Ultrafiltration mit einem 100 kDa Filter (*Vivaflow* 200 Filter; PES) und anschließend mit einem 30 kDa Filter (*Vivaflow* 200 Filter; PES) mit deionisiertem Wasser bis zu einer Leitfähigkeit von  $\leq 10\mu\text{S}$  und eine Konzentrierung auf ein Volumen von ca. 20 ml. Das restliche Präzipitat wurde verworfen. Die VSOP wurden von Monika Ebert hergestellt.

Nach der Charakterisierung der Fraktionen (3.2.1.-3.2.5.) wurde die F3 (534 mM Fe) für die *in-vivo*-Experimente ausgewählt.

### 3.1.2. Beschichtung von Eisenoxid-Nanopartikeln mit L-Äpfelsäure

Zu 210 ml der vorher synthetisierten Eisenoxid-Nanopartikel-Suspension mit einem Eisengehalt von 0,404 mol/L wurde eine Lösung aus 11,17 g L-Äpfelsäure ( $\geq 99,5\%$ ) und 40 ml deionisiertem Wasser bei RT unter Rühren hinzugefügt. Anschließend wurde der pH-Wert gemessen (pH 3,8) und daraufhin eine Lösung, bestehend aus 5,77 g L-Äpfelsäure und 20 ml deionisiertem Wasser unter Rühren zugefügt. Der pH-Wert wurde gemessen (pH 2,7) und das resultierende Gemisch unter Rühren für 30 min auf 60°C erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurde die Sus-



pension für 45 min magnetisch separiert. Hierfür wurde die Suspension auf einen Magneten platziert. Der Überstand (F1) wurde mit einer Pipette abgenommen und verworfen. Das zurückbleibende Präzipitat wurde in 100 ml deionisiertem Wasser resuspendiert und für 45 min magnetisch separiert. Der Überstand (F2) wurde abgenommen, bei 3112 x g für 10 min bei RT zentrifugiert, durch Ultrafiltration (*Vivaf-low* 200 Filter; 30 kDa PES) bis zu einer Leitfähigkeit  $\leq 10\mu\text{S}$  gewaschen und bis auf ein Volumen von ca. 20 ml konzentriert. Das Präzipitat der magnetischen Separation wurde erneut in 100 ml deionisiertem Wasser resuspendiert und einer magnetischen Separation für 45 min unterzogen. Der Überstand (F3) wurde abgenommen und der pH mit 1,5 N NaOH-Lösung auf 7,0 eingestellt. Die resultierende Suspension wurde bei 3112 x g für 10 min bei RT zentrifugiert, durch Ultrazentrifugation bis zu einer Leitfähigkeit  $\leq 10\mu\text{S}$  gewaschen und auf ein Volumen von ungefähr 20 ml konzentriert. Die zuvor beschriebenen Schritte wurden mehrere Male wiederholt bis weitere Fraktionen (F4-F6) erhalten wurden. Nach erneutem Resuspendieren und magnetischer Separation wurden keine weiteren Partikel in Suspension erhalten.

Nach der Charakterisierung der Fraktionen (3.2.1.-3.2.5.) wurde die F4 (55 mM Fe) für die *in-vivo*-Experimente ausgewählt.

### 3.1.3. Beschichtung von Eisenoxid-Nanopartikeln mit Etidronsäure

Zu 104 ml der synthetisierten Eisenoxid-Nanopartikel-Suspension mit einem Eisengehalt von 0,404 mol/L Fe, wurden 2,5 ml einer 60%igen Etidronsäure-Lösung tröpfchenweise unter Rühren bei RT hinzugefügt. Der pH-Wert der Suspension wurde gemessen (3,4). Anschließend wurde die Suspension unter Rühren für 30 min auf 60°C erhitzt. Nach Ablauf der 30 min wurde so lange gewartet, bis die Suspension RT erlangt hatte. Anschließend wurde die Suspension für 10 min magnetisch separiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen (F1) und verworfen. Das Präzipitat wurde in 50 ml deionisiertem Wasser resuspendiert und der pH der Suspension wurde mit 1 N NaOH auf pH 6,5 eingestellt. Nach einer Magnetseparation für 10 min wurde der Überstand abgenommen (F2) und verworfen. Das Präzipitat wurde erneut mit 50 ml deionisiertem Wasser resuspendiert und der pH mit 1 N NaOH auf 7,5 eingestellt. Nach einer Magnetseparation für 10 min wurde erneut der Überstand abgenommen (F3) und verworfen.

Wieder wurde das Präzipitat mit 50 ml deionisiertem Wasser resuspendiert und der pH anschließend mit 1 N NaOH auf 8,5 eingestellt. Nach einer Magnetseparation für 10 min gingen Eisenoxid-Partikel in Suspension, die dekantiert wurde (F4). Die beschriebenen Schritte wurden so oft wiederholt, bis keine Partikel mehr in Suspension gingen. Dabei wurden weitere Fraktionen gewonnen (F5-F6). Alle Fraktionen (F4-F6) wurden bei 3112 x g für 10 min bei RT zentrifugiert und durch Ultrafiltration mit einem 100 kDa PES-Filter (*Vivaflow 200*) bis zu einer Leitfähigkeit  $\leq 10\mu\text{S}$  gewaschen und konzentriert.

Nach der Charakterisierung der Fraktionen (3.2.1.-3.2.5.) wurde die F5 (73 mM Fe) für die *in-vivo*-Experimente ausgewählt.

#### **3.1.4. Beschichtung von Eisenoxid-Nanopartikeln mit DL-Weinsäure**

Zu 52 ml der vorher synthetisierten Eisenoxid-Nanopartikel-Suspension mit einem Eisengehalt von 0,404 mol/L Fe wurde eine Lösung aus 1,3 g Weinsäure (puriss. p.a.) und 10 ml deionisiertem Wasser bei RT unter Rühren hinzugefügt. Die Suspension wurde unter Rühren für 30 min auf 60°C erhitzt. Nach Ablauf der 30 min wurde so lange gewartet, bis die Suspension RT erlangt hatte. Anschließend wurde die Suspension magnetisch für 20 min separiert. Der Überstand (F1) wurde verworfen und das zurückbleibende Präzipitat wurde in 75 ml deionisiertem Wasser resuspendiert. Der pH wurde mit 1 N NaOH-Lösung auf 7,0 eingestellt und die Suspension wurde für 20 min magnetisch separiert. Der Überstand (F2) wurde dekantiert und das zurückbleibende Präzipitat erneut für 20 min magnetisch separiert. Der Überstand (F3) wurde abpipettiert. Die Suspensionen F2 und F3 wurden bei 3112 x g für 10 min (RT) zentrifugiert und über Ultrazentrifugation mit einem 30 kDa PES Filter (*Vivaflow 200*) bis zu einer Leitfähigkeit  $\leq 10\mu\text{S}$  gewaschen und auf ein Volumen von ungefähr 30 ml (F2) und 17,5 ml (F3) konzentriert.

Nach der Charakterisierung der Fraktionen (3.2.1.-3.2.5.) wurde die F2 (78 mM Fe) für die *in-vivo*-Experimente ausgewählt.

#### **3.1.5. Beschichtung von Eisenoxid-Nanopartikeln mit *trans*-Aconitsäure**

Zu 104 ml der vorher synthetisierten Eisenoxid-Nanopartikel-Suspension mit einem Eisengehalt von 0,404 mol/L Fe wurden 3,65 g *trans*-Aconitsäure (98,0%) bei RT unter Rühren hinzugefügt. Anschließend wurde die Suspension unter Rühren

für 30 min auf 60°C erhitzt. Nach Ablauf der 30 min wurde so lange gewartet, bis die Suspension RT erlangt hatte. Nun wurde die Suspension für 20 min magnetisch separiert. Der Überstand (F1) wurde abpipettiert und verworfen. Das Präzipitat wurde in 75 ml deionisiertem Wasser resuspendiert und der pH wurde mit 1 N NaOH-Lösung auf 7,0 eingestellt. Der Überstand (F2) wurde dekantiert und das Präzipitat erneut mit 75 ml deionisiertem Wasser resuspendiert. Der pH wurde mit 1 N NaOH auf 7,0 eingestellt. Die bisherigen Schritte wurden mit einem pH von 8,0 (F3) wiederholt. Eine vierte Fraktion (F4) wurde nach Resuspendierung mit deionisiertem Wasser ohne den pH einzustellen (F4) gewonnen. Die Suspensionen wurden bei 3112 x g für 5 min (RT) zentrifugiert und über Ultrazentrifugation mit einem 100 kDa PES Filter (*Vivaflow 200*) bis zu einer Leitfähigkeit  $\leq 10\mu\text{S}$  gewaschen und auf ein Volumen von ungefähr 20 ml (F2) und 17,5 ml (F3) konzentriert. Die Suspensionen wurden bei 4°C im Kühlschrank gelagert und waren nicht stabil bei einem pH von 7,5.

### **3.1.6. Beschichtung von Eisenoxid-Nanopartikeln mit 4-Amino-5-hydroxynaphthalin-2,7-disulfonsäure**

Zu 104 ml der vorher synthetisierten Eisenoxid-Nanopartikel-Suspension mit einem Eisengehalt von 0,404 mol/L Fe wurden 4,2 g 4-Amino-5-hydroxynaphthalin-2,7-disulfonsäure-monohydrat (85%) bei RT unter Rühren hinzugefügt. Anschließend wurde die Suspension unter Rühren für 30 min auf 60°C erhitzt. Nach Ablauf der 30 min wurde so lange gewartet, bis die Suspension RT erlangt hatte. Es folgte eine magnetische Separation für 10 min. Der Überstand (F1) wurde abgenommen und verworfen. Das Präzipitat wurde in 60 ml deionisiertem Wasser resuspendiert und der pH mit 1 N NaOH auf 7,0 eingestellt. Nach einer magnetischen Separation für 10 min wurde der Überstand (F2) abgenommen und verworfen. Erneut wurde das Präzipitat in 60 ml resuspendiert und für 10 min magnetisch separiert. Die beschriebenen Schritte wurden mehrere Male wiederholt, ohne dass Eisenoxid-Nanopartikel in Suspension gingen.

### **3.1.7. Beschichtung von Eisenoxid-Nanopartikeln mit Tartronsäure**

Zu 52 ml der vorher synthetisierten Eisenoxid-Nanopartikel-Suspension mit einem Eisengehalt von 0,404 mol/L Fe wurden 0,5 g Tartronsäure ( $\geq 97,0\%$ ) bei RT unter

Rühren hinzugefügt. Anschließend wurde die Suspension unter Rühren für 30 min auf 60°C erhitzt. Nach Ablauf der 30 min wurde so lange gewartet, bis die Suspension RT erlangt hatte. Die Suspension wurde für 20 min magnetisch separiert und der Überstand (F1) abgenommen und verworfen. Das Präzipitat wurde mit 100 ml deionisiertem Wasser resuspendiert und der pH wurde mit 1 N NaOH-Lösung auf 7,0 eingestellt. Der Überstand (F2) wurde mit einer Pipette abgenommen und verworfen. Das Präzipitat wurde erneut mit 100 ml deionisiertem Wasser resuspendiert und die Suspension wurde für 20 min magnetisch separiert, der pH mit 1 N NaOH-Lösung auf 7,0 eingestellt. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Die beschriebenen Schritte wurden mehrere Male wiederholt, ohne dass Eisenoxid-Nanopartikel in Suspension erhalten wurden.

### **3.1.8. Beschichtung von Eisenoxid-Nanopartikeln mit *meso*-2,3-Dimercaptobernsteinsäure (DMSA)**

Für die Erstellung von DMSA-stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikeln wurde für die Beschichtung im Gegensatz zu den anderen organischen Säuren (siehe 3.1.1.-3.1.7.) kein Überschuss im Verhältnis zum eingesetzten Gesamteisen verwendet (siehe 3.1.). DMSA ist ein starker Chelator und könnte bei hoher Konzentration die gebildeten Partikel reaktiv auflösen. Aus diesem Grund wurden im Verhältnis zur Masse des insgesamt bei der Partikelsynthese verwendeten Eisens (Eisen(II)-chlorid und Eisen(III)-chlorid) 5% DMSA (98,0%) nach Fauconnier *et al.* während der Beschichtung hinzugegeben [99].

104 ml synthetisierte Nanopartikel-Suspension mit einem Eisengehalt von 0,404 mol/L wurden ohne Zugabe von DMSA magnetisch separiert, um überschüssige Salze zu entfernen. Das Präzipitat wurde mit 80 ml deionisiertem Wasser resuspendiert. Nun wurde eine Lösung aus 0,403 g DMSA (98,0%) und 40 ml deionisiertem Wasser unter Rühren bei RT zugefügt. Der pH wurde gemessen (5,7) und daraufhin tröpfchenweise mit 6 N HCL auf 3,0 eingestellt. Die Suspension wurde bei RT für zwei Stunden gerührt und die Nanopartikel wurden 4 mal durch magnetische Separation (jeweils 45 min) gewaschen. Dabei wurde jeweils der Überstand abgenommen, verworfen und das Präzipitat mit 100 ml deionisiertem Wasser resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension mit 1,5 N NaOH auf pH 7,0 eingestellt und für 45 min magnetisch separiert. Der Überstand (F1)

wurde mit einer Pipette abgenommen, bei 3112 x g für 10 min bei RT zentrifugiert, durch Ultrafiltration (*Vivaflow* 200 Filter; 30 kDa PES) bis zu einer Leitfähigkeit  $\leq 10\mu\text{S}$  gewaschen und auf ein Volumen von ungefähr 20 ml konzentriert. Anschließend wurde das Präzipitat in 100 ml deionisiertem Wasser resuspendiert, der pH mit 1,5 N NaOH auf 7,0 eingestellt und der Überstand (F2) dekantiert. Erneut wurde durch Ultrafiltration (*Vivaflow* 200 Filter; 30 kDa PES) bis zu einer Leitfähigkeit  $\leq 10\mu\text{S}$  gewaschen und bis zu einem Volumen von ungefähr 20 ml konzentriert. Die beschriebenen Schritte wurden mehrere Male wiederholt, so dass sechs weitere Fraktionen (F3-F8) erhalten wurden.

Nach der Charakterisierung der Fraktionen (3.2.1.-3.2.5.) wurde die F6 (97 mM Fe) für die *in-vivo*-Experimente ausgewählt.

### **3.1.9. Beschichtung von Eisenoxid-Nanopartikeln mit Maleinsäure**

Zu 52 ml der vorher synthetisierten Eisenoxid-Nanopartikel-Suspension mit einem Eisengehalt von 0,404 mol/L Fe wurde eine Lösung aus 2,0 g Maleinsäure ( $\geq 99,0\%$ ) und 10 ml deionisiertem Wasser bei RT unter Rühren hinzugefügt. Anschließend wurde die Suspension für 30 min auf 60°C erhitzt. Nach Ablauf der 30 min wurde so lange gewartet, bis die Suspension RT erlangt hatte und die Suspension wurde für 20 min magnetisch separiert. Der Überstand (F1) wurde abgenommen und verworfen. Das Präzipitat wurde in 75 ml deionisiertem Wasser resuspendiert. Auch nach mehreren magnetischen Separationen und nach Einstellen des pH Wertes auf 7,0, 10,0 und 3,0 konnten keine stabile Nanopartikel in Suspension generiert werden. Für das Einstellen des pH-Wertes wurden 1,5 N NaOH bzw. 3 N HCL benutzt.

## **3.2. Charakterisierung der Eisenoxid-Nanopartikel**

### **3.2.1. Messung der hydrodynamischen Größe per *Zetasizer* (dynamische Lichtstreuung)**

Der hydrodynamische Durchmesser der elektrostatisch stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikel wurde mit dem Gerät *Zetasizer Nano ZS* der Firma Malvern Instruments (Herrenberg, Deutschland) über dynamische Lichtstreuung bestimmt. Hier-

für wurden 60 µl in eine Ultramikroküvette (105.251.005-QS, 3 x 3 mm) der Firma Hellma Analytics (Mühlheim, Deutschland) pipettiert und anschließend bei 23°C sowie einem Messwinkel von 173° bezüglich der Größe gemessen. Die Größenbestimmung wurde jeweils bei einer Eisenkonzentration von 1 mM in HEPES-Puffer (10 mM, pH 7,4) durchgeführt. Relevant waren insbesondere die Anzahlverteilungen. Als Software diente *Zetasizer*.

### 3.2.2. Bestimmung des Zetapotentials

Das Zetapotential, mit dem man Aussagen über die Ladung des zu untersuchenden Stoffes treffen kann, wurde ebenfalls mit dem Gerät *Zetasizer Nano ZS* der Firma Malvern Instruments (Herrenberg, Deutschland) erfasst. Jeweils 1 ml der jeweiligen Nanopartikel-Suspension in einer Konzentration von 1 mM Fe (in HEPES-Puffer, 10 mM, pH 7,4) wurde vorsichtig mit einer 1 ml Spritze in eine gefaltete Einweg-Kapillarzelle (Malvern) eingeführt, wobei genau darauf geachtet wurde Luftblasenentstehung zu vermeiden. Für die Bestimmung wurde die Methode „Smulochowski“ im Zetapotential-Modus der Software *Zetasizer* gewählt. Aus vier durchgeführten Messungen wurde jeweils der Mittelwert gebildet.

### 3.2.3. Bestimmung der Relaxivitäten

Die T1- und T2-Relaxationszeiten der verschiedenen elektrostatisch stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikel wurden mit einem MR-Spektrometer *nq40 NMR analyzer* (40 MHz, 0,94 T) der Firma Bruker BioSpin (Karlsruhe, Deutschland) bestimmt. In Abhängigkeit der Eisenkonzentration wurden die Relaxivitäten separat durch Anpassen der Relaxationsraten (Relaxationszeit<sup>-1</sup>) an eine lineare Funktion ermittelt. Die Messungen für die jeweilige Konzentration wurden in einem Volumen von 1 ml in NMR-Proberöhrchen (5 mm x 203 mm, dünnwandig) der Firma VWR bei einer konstanten Temperatur von 37°C durchgeführt. Hierfür wurden die Proben in einem Wasserbad bei 40°C vorgewärmt. Die Proben wurden jeweils in deionisiertem Wasser verdünnt und in den Konzentrationen 0,5 mM, 1,0 mM und 1,5 mM Fe gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der Software *the minispec*.

### **3.2.4. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) der synthetisierten Eisenoxid-Nanopartikel**

Die Eisenoxid-Nanopartikel wurden mittels High Resolution Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) mit dem *TECNAI G2 20 S-Twin* (FEI-Company, Hillsboro OR, USA) analysiert. Hierfür wurden wenige Mikroliter verdünnter Eisenoxid-Nanopartikel-Suspension auf ein mit Kohlenstoff beschichtetes Kupfergitter aufgetragen und vor dem Messen luftgetrocknet. Die Messungen wurden von Herrn Sören Selve von der Technischen Universität Berlin (Berlin, Deutschland) in der Zentraleinrichtung Elektronenmikroskopie durchgeführt.

### **3.2.5. Bestimmung der Eisenkonzentrationen**

Um die Eisenkonzentration der Nanopartikel zu bestimmen, wurden sie mit 6 N HCL-Lösung aufgelöst und das  $\text{Fe}^{2+}$  mit Wasserstoffperoxid (30%) zu  $\text{Fe}^{3+}$  oxidiert. Hierfür wurde eine Lösung aus HCL und  $\text{H}_2\text{O}_2$  im Verhältnis 1000:1 verwendet, mit der auch eine Standardreihe (0,5-6 g/L) aus einer Eisen-Stammlösung (20 g/L) hergestellt wurde. Anhand der Standardreihe wurde eine Eichgerade erstellt, über die letztendlich die Eisenkonzentrationen der Proben bestimmt wurden. Die Proben bzw. Standardlösungen wurden 1:100 mit der HCL- $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung versetzt und bei RT 30 min zum vollständigen Lösen/Oxidieren inkubiert. Anschließend wurden die Proben in die Vertiefungen einer 96-well Platte (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) pipettiert und im Mikrotiterplatten-Spektralphotometer *Power Wave XS2* der Firma BioTek (Bad Friedrichshall, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 410 nm (Absorptionsmaximum von  $\text{Fe}^{3+}$ ) gemessen. Die Partikellösungen wurden vor dem Aufschluss in der Regel 1:10 bzw. 1:20 verdünnt und die Messungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Auswertung der Eisenbestimmungen erfolgte mit der Software *Gen5*.

### **3.2.6. Auswahl der Fraktionen und Konzentrierung der Nanopartikel-Suspensionen**

Nach Bestimmung der Eisenkonzentration (3.2.5), des hydrodynamischen Durchmessers (3.2.1) und der Relaxivität (3.2.3) wurden pro Ansatz jeweils die Fraktionen gewählt, die hinsichtlich ihrer hydrodynamischen Größe die höchsten Über-

einstimmungen mit VSOP aufwiesen. Um die gewünschte Dosis von 500  $\mu\text{mol Fe/kg}$  in die Versuchsmäuse injizieren zu können, war eine Konzentrierung einzelner Fraktionen notwendig. Mit 30 kDa-Amicon-Filtern aus regenerierter Zellulose (Millipore) wurde bei RT für mindestens 10 min mit einem maximalen Ausgangsvolumen von 4 ml mit einer Tischzentrifuge 5415D (Eppendorf) bei 1000 x g zentrifugiert. Anschließend erfolgte eine Eisenbestimmung (3.2.5) sowie die Formulierung der Partikel (3.2.7).

### **3.2.7. Formulierung der Nanopartikel**

Alle synthetisierten Nanopartikel wurden für die *in-vivo*-Versuche mit 6% Mannitol (w/v) (Sigma) formuliert. Anschließend wurden alle Nanopartikel-Lösungen mit Spritzenfilter aus Cellulose (Sartorius, 0,2  $\mu\text{m}$ ) sterilfiltriert und nochmals einer Eisenbestimmung (siehe 3.2.5.) unterzogen, der eine Größenbestimmung mittels dynamischer Lichtstreuung im *Zetasizer* folgte (siehe 3.2.1.), um unerwünschte Aggregationen der resultierenden formulierten Nanopartikel-Suspensionen ausschließen zu können. Die Eisenkonzentrationen der einzelnen Fraktionen für die *in-vivo*-Versuche waren nach Konzentrierung und Formulierung: 150 mM für VSOP, 174 mM für Etidronsäure-, 186 mM für Weinsäure-, 166 mM für Äpfelsäure- und 131 mM für DMSA-Eisenoxid-Nanopartikel.

## **3.3. Tierversuche**

### **3.3.1. Injektion und Gewebeentnahme**

Die männlichen ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden nach 16-wöchiger Western Typ Diät (beginnend in einem Alter von acht Wochen) bezüglich der Eisenoxid-Partikel-Anreicherung untersucht. Um unspezifische Anreicherungen der Nanopartikel in gesunden Gefäßwänden zu untersuchen, wurden C57/Bl6-Mäuse (Wildtyp) entsprechend im Alter von 24 Wochen analysiert. Nachdem die Tiere unter Verwendung eines Anästhesiegeräts (Völker) mit 1-2%haltigem Isofluran-Sauerstoff-Gemisch anästhetisiert worden waren, erfolgte die intravenöse Applikation (Schwanzvene) der jeweiligen Nanopartikel-Suspension in einer Dosis von 500  $\mu\text{mol Fe/kg}$ . Drei Stunden nach Kontrastmittelgabe (siehe Bestimmung der Halbwertszeiten 4.3.)



---

wurden die Mäuse unter Anästhesie zunächst mit 20 ml eiskaltem PBS perfundiert, um das Blut zu entfernen. Anschließend wurde das Gewebe mit 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Die Perfusion erfolgte mit Hilfe einer Spritzenpumpe (A-laris), die eine kontrollierte Perfusion gewährleistet mit einer Geschwindigkeit von 170 ml/h. Durch die Perfusion wird eine bestmögliche Fixierung des Gewebes gewährleistet. In der Folge wurden die Aorta mit abgehenden Gefäßen (Truncus brachiocephalicus bzw. Carotis dextra, Subclavia dextra, Carotis sinistra und Subclavia sinistra), Leber, Milz, Niere und Lunge entnommen und in 4% PFA nachfixiert. Bis zu den nachfolgenden Experimenten wurden die Organe bei 4°C gelagert.

### **3.3.2. Blutentnahme**

Zur Bestimmung der Blutzirkulationszeiten (Halbwertszeiten) der VSOP in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Kontrastmittelgabe Blut entnommen. Die Blutentnahme erfolgte unter Anästhesie mit 1-2%haltigem Isofluran-Sauerstoff-Gemisch über eine Herzpunktion. Das Blutvolumen lag zwischen 0,8 und 1,2 ml. Nach Entnahme wurde das Blut in sterile EDTA-Monovetten (Sarstedt) überführt und bis zur Messung bei 4°C gelagert. Die Tiere wurden unmittelbar im Anschluss an die Blutentnahme perfundiert (siehe 3.3.1.).

## **3.4. Histologie**

### **3.4.1. Behandlung von Gewebe für Paraffinschnitte**

Die in 4% PFA fixierten Gewebe wurden mit Hilfe des Gewebeeinbettautomats TP 1020 von Leica bearbeitet. Dabei wurde folgendes Programm eingesetzt (Tabelle 3.2):

**Tabelle 3.2: Programm des Gewebeeinbettautomats zur Bearbeitung der Gewebe für die Erstellung von Paraffinschnitten.**

Lösung	Inkubationszeit [min]
70%iges Ethanol	60
70%iges Ethanol	60
80%iges Ethanol	60
90%iges Ethanol	60
96%iges Ethanol	60
100%iges Ethanol	60
100%iges Ethanol	60
70% Ethanol, 30% Xylol	60
Xylol	60
Xylol	60
Paraffin	60
Paraffin	60

### 3.4.2. Anfertigung von Paraffingewebeschnitten

Die Paraffingewebeschnitte wurden aus den zuvor erstellten Paraffinblöcken mit einem Mikrotom (RM 2125 RT; Leica) erstellt. In Abhängigkeit der Färbung wurde die Dicke der Schnitte im Bereich zwischen 5 und 10  $\mu\text{m}$  gewählt. Es wurden mit Teflon beschichtete Mikrotomklingen (S 35; *Feather*) verwendet. Für die Berliner-Blau-Färbung zum Nachweis der Eisenoxid-Nanopartikel wurden durchgehend Konsekutivschnitte von Aorta, Truncus brachiocephalicus und der Aortenwurzel angefertigt, um später potentielle Korrelationsfärbungen anfertigen zu können. Nach dem Schneiden am Mikrotom wurden die Schnitte vorsichtig mit einem Pinsel in ein 40°C warmes Wasserbad überführt. Abschließend wurden die Schnitte auf beschichtete Objektträger (Super Frost®Plus; *Thermo Scientific*) aufgezogen und über Nacht bei 37°C im Trockenschrank getrocknet.

### 3.4.3. Histologische Färbungen

#### 3.4.3.1. Berliner-Blau-Färbung

Um die Eisenoxid-Nanopartikel innerhalb der Plaques nachzuweisen, wurde jeder fünfte Schnitt des atherosklerotischen Gewebes Berliner-Blau gefärbt. Es wurden Schnittdicken von 5 µm und 10 µm verwendet. Die zuvor deparaffinierten (2 x für 10 min Xylol; 2 x für 5 min 100%iges Ethanol; 5 min 95%iges Ethanol; 5 min 80%iges Ethanol; 5 min 70%iges Ethanol; 2 x 5 min deionisiertes Wasser) Schnitte wurden 5 min in 200 ml 1%iger Kaliumhexacyanoferrat (II)-Lösung inkubiert, in die nach Ablauf der 5 Minuten 10 ml 6 N HCL zugegeben wurde [140]. Die Schnitte wurden in der angesäuerten 1%igen Kaliumhexacyanoferrat (II)-Lösung weitere 25 min inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit deionisiertem Wasser gewaschen und mit 0,1% Kernechtrot-Aluminiumsulfat-Lösung (Merck) für 30 sek gegengefärbt. Nach zweimaligem Waschen für 5 min wurden die Schnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe (2 x 5 min 70%iges Ethanol; 5 min 80%iges Ethanol; 5 min 95%iges Ethanol; 10 min 100%iges Ethanol und 2 x 10 min in Xylol) dehydriert. Abschließend wurden die gefärbten Schnitte mit dem wasserfreien Eindeckmedium *Neo-Mount*® (Merck) eingedeckelt.

Für die *in-situ*-Färbung der Aorta samt abgehender Gefäße wurde das mit Formalin fixierte Gewebe wie oben beschrieben für die gleiche Zeit (30 min) in einer Petrischale angefärbt. Es wurden zwischen 40 und 60 ml der 1%igen Kaliumhexacyanoferrat(II)-Lösung verwendet. Nach 30 min wurde die Färbereaktion gestoppt, indem das Gewebe in eine Petrischale mit PBS überführt wurde. Dieses Vorgehen wurde wiederholt, so dass insgesamt dreimal in PBS-Puffer gewaschen wurde. Das Gewebe wurde ausschließlich mit Plastikpinzetten bearbeitet, um Verunreinigungen durch eisenhaltige Pinzetten ausschließen zu können. Anschließend wurde das Gewebe in Einbettmedium zum Kryoschneiden (*Tissue Tek*® *O.C.T. Compound*; Sakura) eingebettet und bei -20°C im Gefrierschrank gelagert. Die Gefäße wurden mit einem Kryostat (2800 Frigocut-E; Leica) in 10 µm dünne Schnitte geschnitten. Es wurden für Kryogewebe geeignete Mikrotomklingen (C 35; *Feather*) mit einer Teflonbeschichtung verwendet. Nach dem Aufziehen auf Objektträger (*Super Frost*®Plus; *Thermo Scientific*) wurden die Schnitte zweimal für 5 min mit deionisiertem Wasser inkubiert, um das Eindeckmedium zu entfernen. Anschließend wurden die Schnitte 30 sek in 0,1% Kernechtrot-Aluminiumsul-

fat (Merck) gegengefärbt, zweimal in deionisiertem Wasser gewaschen und mit wasserlöslichem Eindeckmedium (Aquatex®; Merck) eingedeckelt.

### **3.4.3.2. Movat-Färbung**

Die Movat-Färbung differenziert verschiedene Komponenten des Bindegewebes bzw. der extrazellulären Matrix. Im Unterschied zum Standard-Protokoll des Herstellers (Morphisto) wurden die Färbezeiten der einzelnen Lösungen leicht variiert (siehe unten) und die Verhoeffsche Lösung zur Färbung von Zellkernen ausgelassen. Die zuvor deparaffinierten Schnitte (siehe 3.4.3.1.) wurden zunächst für 30 sek in 3%iger Essigsäure und anschließend für 25 min in Alcianblau (Morphisto) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in deionisiertem Wasser (jeweils 1 min) folgte eine einminütige Färbung in Eisen(II)-chlorid und eine zehnminütige Differenzierung in Leitungswasser. Anschließend wurden die Schnitte kurz in Essigsäure (1%, 10 sek) eingetaucht und für 15 min in 2%iger Phosphorwolframsäure gefärbt. Einer erneuten Inkubation in 1%iger Essigsäure schlossen sich 2 Schritte in 100%igem, unvergälltem Ethanol (jeweils 90 sek) an. Für 15 min wurde das Kollagen in Safron du Gatinais angefärbt. Abschließend wurden die Schnitte mit einer aufsteigenden Ethanolreihe (siehe 3.4.3.1.) dehydriert, in Xylol inkubiert (zweimal für 5 min) und mit wasserfreiem Eindeckmedium (*Neo-mount*®; Merck) eingedeckelt.

### **3.4.3.3. Von Kossa-Färbung**

Die von Kossa-Färbung ist ein indirekter Nachweis für Kalzium. Hierbei wird Kalzium in den Karbonaten und Phosphaten gegen Silberionen ausgetauscht, die anschließend zu metallischem Silber reduziert werden. Dieser Vorgang wird durch kurzwelliges bzw. Licht im UV-Bereich gefördert. Im Ergebnis sind bräunliche bis schwarze Färbungen an Orten von Kalzium-Ablagerungen zu erkennen. Nachdem die Schnitte deparaffiniert wurden (siehe 3.4.3.1.), folgte eine Inkubation in 5%iger wässriger Silbernitratlösung unter Einwirkung von UV-Licht (UV-Lampe von Benda) für 30 min. Die Schnitte wurden folgend in deionisiertem Wasser gewaschen und in 5%iger Natriumthiosulfatlösung für 2 min fixiert. Einem anschließenden Waschschrift (1 min) folgte die Gegenfärbung mit 0,1% Kernechtrot-Aluminiumsulfat (Merck) für 30 sek. Nach zweimaligem Waschen in deionisiertem Wasser wurden die Schnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe (siehe 3.4.3.1.) dehydriert,

---

zweimal für 5 min in Xylol inkubiert und mit wasserfreiem Eindeckmedium (*Neo-mount*®; Merck) eingedeckelt.

#### 3.4.4. Immunhistochemische Färbungen

Für Korrelationsfärbungen zu detektiertem Eisen innerhalb der atherosklerotischen Plaques wurden immunhistochemische Färbungen von in Paraffin eingebetteten Schnitten angefertigt. Zunächst wurden die Schnitte in Xylol deparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe für die folgende Antikörperbehandlung zugänglich gemacht (siehe 3.4.3.1.). Es folgte eine Antigendemaskierung mit einem Citrat-Puffer (10 mM Trinatriumcitrat-Dihydrat; 0,05% Tween 20, pH 6,0) durch kurzes Erhitzen in der Mikrowelle, wodurch sich die Formaldehyd-Vernetzung der Proteine partiell auflöst, was eine verbesserte Zugänglichkeit der Proteine zur Folge hat. Danach folgte der Peroxidase-Block (PBS + 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) für 30 min. Nach kurzem Waschen in demineralisiertem Wasser, schloss sich eine Inkubation in PBS und 0,1% Triton X-100 für 15 min an. Anschließend erfolgte der Avidin-Block (Vector Laboratories) für 15 min und nach kurzem Waschen der Biotin-Block (Vector Laboratories) für 15 min. Daraufhin wurden für eine Stunde unspezifische Bindungsstellen des sekundären Antikörpers mit PBS, 1% BSA und 10% Ziegen Serum geblockt. Über Nacht wurde mit dem primären Antikörper (in PBS, 10% FCS) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte zuerst für 15 min mit PBS und 0,1% Triton x-100 gewaschen. Um den primären Antikörper zu detektieren, wurde ein mit Biotin gekoppelter sekundärer Antikörper verwendet, der in PBS-Puffer mit 10% FCS in einer Verdünnung von 1:200 verwendet wurde. Es wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem für 10 min in PBS gewaschen wurde, erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit dem ABC-Komplex (Vector Laboratories) in 10 mM Na-Phosphatpuffer, 140 mM NaCl, pH 7,5. Einem kurzen Waschschrift schloss sich die Färbung mit Diaminobenzidin (DAB) nach Angaben des Herstellers an. Nach einigen Minuten wurde die Reaktion mit PBS abgestoppt und mit Mayers Hämalaun-Lösung (Merck) für 20 sek gegengefärbt. Abschließend wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe wieder dehydriert und nach Inkubation in Xylol (zweimal für 5 min) mit wasserfreiem Eindeckmedium (*Neo-mount*®; Merck) eingedeckelt.

### 3.5. Magnetresonanztomographie

#### 3.5.1. *In-vivo*-MRT

Die Anreicherung der VSOP in der Aortenwurzel von ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde *in vivo* am Kleintier-MRT (7T Bruker Pharmascan) gemessen. Hierfür wurden die Tiere mit einer Mischung aus Isofluran (1-2%) und Sauerstoff unter Verwendung eines Anästhesiegeräts (Völker) narkotisiert und in einer 38 mm Volumenspule (RF-Spule) platziert. Die Körpertemperatur wurde mit Hilfe eines wasserdurchfluteten Wärmebetts bei 37°C konstant gehalten.

Zur Detektion der VSOP wurde eine T2\*-gewichtete Gradientenechosequenz (*Fast Low-Angle Shot*; FLASH) mit relativ langer Echozeit verwendet (siehe Tabelle 3.3). Die Messungen wurden zunächst vor Injektion (*prescan*), als auch 3 Stunden nach intravenöser (i.v.) Injektion von 500 µmol Fe/kg VSOP durchgeführt, um einen Effekt der VSOP in der Aortenwurzel bzw. den atherosklerotischen Plaques in der Aortenwurzel detektieren zu können.

Die Messungen wurden atmungsgetriggert und EKG-getriggert durchgeführt, um durch Atmungs- und Herzbewegungen verursachte Bewegungsartefakte zu vermeiden [141]. Dadurch wurde die Datenakquisition jeweils in der gleichen Atemperiode (Ausatmung) und Herzphase (Endsystole) durchgeführt, da hier die Herzbewegung minimal ist. Hierfür wurde einerseits ein Atmungskissen (Graseby) am Rücken der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse und andererseits selbstklebende EKG-Elektroden (Healthcare) an den Pfoten der Tiere angebracht. Das Monitoring von Atmung und Herzfrequenz erfolgte über die Software (SA Instruments, Inc.), wobei darauf geachtet wurde, dass die Atmung in einem konstanten Bereich um die 80 Züge pro Minute lag.

Zur Planung der Messung erfolgte zunächst die Aufnahme einer Tri-Pilot-Sequenz zur Lokalisierung der Aorta bzw. der Aortenwurzel (Tabelle 3.3). Anschließend wurde mit einer CINE-Sequenz, die Bilder einer Schnittebene durch das Herz in mehreren Herzphasen aufnimmt, die optimale Herzphase für die folgende Messung bestimmt. In der Herzphase, in der das Blut in der Aorta hell erschien und die Artefakte aufgrund der Herzbewegung oder des Blutflusses am geringsten waren, wurde schließlich die FLASH-Sequenz in der Schnittebene der Aortenwurzel, also senkrecht zur Aorta, akquiriert.

**Tabelle 3.3: Sequenzen mit jeweiligen Parametern der *in-vivo*-Messung zur Akkumulation von VSOP in der Aortenwurzel.**

Parameter	Tri-Pilot	CINE	FLASH
TE [ms]	2,2	2,5	5,3
TR [ms]	100	8	10,3
FOV [cm]	6,0	6,0	3,0
flip angle [°]	30	15	30
Auflösung [µm]	234 x 234	312 x 312	117 x 117
Mittlungen	2	6	16
Schichtdicke [µm]	1000	1000	500

### 3.5.2. Erstellen eines Phantoms für *ex-vivo*-MRT-Untersuchungen

Für *ex-vivo*-MRT-Untersuchungen wurden die präparierten und anschließend fixierten Aorten (siehe 3.3.1.) mit abgehenden Gefäßen von ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen sowie Bl6/C57-Mäusen verwendet. Die Gefäße wurden hierfür in Agarose eingebettet, das als Trägermedium diente. Zunächst wurden die Gefäße unter dem Präparationsmikroskop vorsichtig von Fettgewebe befreit, da es die Entstehung von Luftblasen begünstigt und dadurch die Ergebnisse verfälschen kann. Luftblasen führen in T2- bzw. T2\*-gewichteten Gradientenecho-Sequenzen ebenso zu Signal-Auslöschungen wie superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel. Daher wurde eine zuvor in PBS gelöste 3%ige und *Low Melting* Agarose (Sigma) für 30 min im Ultraschallbad entgast und dann vorsichtig über das Herz mit einer 2 ml Spritze und 27 G Kanüle in die Gefäße injiziert. Die LM-Agarose wurde im Ultraschallbad auf eine Temperatur von 40°C erwärmt, um einen flüssigen Zustand zu gewährleisten. Die mit LM-Agarose perfundierten Gefäße wurden nachfolgend für 15 min in ein mit 25 ml LM-Agarose gefülltes Becherglas (50 ml) überführt, um die Agarose gleichmäßig innerhalb der Gefäße zu verteilen. Die Agarose wurde unter Rühren bei einer konstanten Temperatur bei 40°C gehalten. Nun erfolgte die Überführung in ein 15 ml Falcon-Röhrchen, das kurz zuvor ebenfalls vorsichtig mit der entgasten LM-Agarose befüllt wurde. Um das Gewebe besser platzieren zu können, sowie eine Luftblasenentstehung zu vermeiden, wurde das Falcon-Röhrchen aufgeschnitten, so dass es von oben zugänglich war (Abbildung 3.1). Zuletzt wurden entstandene Luftbläschen vorsichtig mit einer Pinzette unter dem Präparati-

onsmikroskop entfernt. Das Phantom wurde bis zur Messung mind. 20 min stehen gelassen, um die *LM*-Agarose erstarren zu lassen.



**Abbildung 3.1:** Exemplarische Abbildung eines in 3%iger *LM*-Agarose erstellten Phantoms von Herz, Aorta und abgehenden Gefäßen einer ApoE<sup>-/-</sup>-Maus in einem oben aufgeschnittenen 15 ml Falcon-Röhrchen. Im Lumen des Aortenbogens sind die atherosklerotischen Plaques in weißem Kontrast zu erkennen.

### 3.5.3. MRT-Messung der *ex-vivo*-Phantome

Die Messungen der *ex-vivo*-Phantome (siehe 3.5.2.) der atherosklerotischen Gefäße der zuvor i.v. injizierten ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse erfolgte mit dem 7T Pharmascan 70/16 (Bruker BioSpin MRI GmbH, Ettlingen, Deutschland). Der Scanner ist mit aktiv abgeschirmten Gradientenspulen (300 mT/m, Anstiegszeit 80  $\mu$ s) ausgestattet. Für die Messungen wurde eine Mauskopfspule (RAPID Biomedical, Würzburg, Deutschland) mit einem Durchmesser von 20 mm verwendet.

Um das Gewebe zu lokalisieren und im optimalen Messbereich zu platzieren wurde zunächst ein Tri-Pilot-Scan durchgeführt. Anschließend wurde eine 3D-Flash Sequenz mit geringer Auflösung, gefolgt von einer 3D-Flash-Sequenz mit hoher Auflösung ausgeführt (Tabelle 3.4).



**Tabelle 3.4: MRT-Sequenzen mit Parametern der *ex-vivo*-Messungen zur Evaluierung der Anreicherung der Eisenoxid-Nanopartikel in der Aortenwurzel.**

Parameter	Tri-Pilot	3D-FLASH	highres 3D-Flash
TE [ms]	5	6	6
TR [ms]	200	30	30
FOV [cm]	5	1.92 x 1.92 x 1.92	1.92 x 1.92 x 1.92
flip angle [°]	30	35	30
Auflösung [µm]	312 x 312	125 x 125	75 x 100
Mittlungen	1	2	6
Schichtdicke [µm]	2000	250	100

#### 3.5.4. Semi-Quantifizierung der *ex-vivo*-MRT-Messungen

Um die Anreicherung der verschiedenen Eisenoxid-Nanopartikel in den atherosklerotischen Gefäßen zu evaluieren und untereinander vergleichen zu können, wurden semi-quantitative Auswertungen der *ex-vivo*-Messungen im Bereich der Aortenwurzel vorgenommen. In der 3D-FLASH-Sequenz erzeugen die superparamagnetischen Nanopartikel im Vergleich zum nicht markierten Gewebe eine Minderung des Signals. Mit Hilfe der Software *Visage 7* bestand die Möglichkeit, einen beliebigen Gewebebereich für die Quantifizierung in der benötigten Ausrichtung heranzuziehen. Da die ersten atherosklerotischen Läsionen in der Aortenwurzel der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse auftreten und dort mit zuverlässiger Konstanz zu erwarten sind, wurde dieser Bereich für die Auswertung herangezogen. Anhand einer Messung wurde ein bestimmter Schwellenwert (Grauwert) bei der ersten Messung festgelegt. Dunkle Voxel unterhalb dieses Wertes wurden als Partikelanreicherung gewertet. Da es bei jeder Messung zu geringfügigen Abweichungen kommt, z. B. aufgrund einer minimalen Veränderung bei der Platzierung der Spule oder bei der Abstimmung des Messgerätes, wurde der Schwellenwert relativ zum Signal der umgebenden Agarose ermittelt und dieser relative Wert auf die Vergleichsmessungen angewandt. Durch Normierung war somit eine direkte Vergleichbarkeit der Schwellenwerte gewährleistet. Der Schwellenwert besaß eine Signalintensität von 67% im Verhältnis zur umliegenden Agarose. Alle Voxel, die unterhalb dieses bestimmten Schwellenwerts lagen, wurden innerhalb der Gefäßwand im Bereich der Aortenwurzel addiert. Die Anzahl der Voxel unterhalb des Schwellenwerts, d. h.

dunkle Voxel wurde relativ zur Fläche des Gefäßes gemessen. Pro Partikel wurden 5 Tiere gemessen und je Maus wurden 5 aufeinanderfolgende Schnitte der Aortenwurzel ausgewertet. Für die statistische Berechnungen wurde zunächst eine einfaktorielle ANOVA (*analysis of variance*) durchgeführt, um Unterschiede unter den Gruppen zu evaluieren. Um einzelne Gruppen untereinander zu vergleichen wurde anschließend der Tukey-Test mit Hilfe der *GraphPad Prism* Software benutzt.

### **3.6. TEM von atherosklerotischen Plaques**

Für die Transmissionselektronenmikroskopie der atherosklerotischen Plaques wurde die hierfür erforderliche Gewebe-Fixierung angewendet. Drei Stunden nach i.v. Injektion von jeweils 500  $\mu\text{mol Fe/kg}$  Nanopartikeln unter Anästhesie durch ein 1-2%-haltiges Isofluran-Sauerstoff-Gemisch (siehe 3.3.1.), wurden die ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse mit 20 ml Kakodylatpuffer (0,1 M, pH 7,2) perfundiert, um das Blut vollständig aus dem Körper zu entfernen. Im Anschluss wurde die Perfusion unter einem Abzug mit 20 ml Glutaraldehyd (2,5%, in 0,1 M Kakodylatpuffer, pH 7,2) zur Fixierung fortgeführt. Die Perfusion wurde mit einer Spritzenpumpe (Alaris) und einer Geschwindigkeit von 170 ml/h durchgeführt. Herz, Aorta mit abgehenden Gefäßen sowie Leber wurden vorsichtig herauspräpariert und in 2,5% Glutaraldehyd (in 0,1 M Kakodylatpuffer, pH 7,2) bei 4°C postfixiert.

Nachdem die Proben in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert wurden, erfolgte das Einbetten in Epon (Serva). Für einen generellen Überblick wurden zunächst Semidünnschnitte (0,5  $\mu\text{m}$ ) angefertigt, die einer Färbung nach Richardson unterzogen wurden. Parallel zu den Semidünnschnitten erfolgte dann die Erstellung von Ultradünnschnitten (70 nm) zur Evaluierung der Eisenoxid-Nanopartikel. Alle Schnitte wurden in einer 1%-igen Lösung für 1,5 h osmiert. Eine Schnittfixierung mit Schwermetall, die den Kontrast in biologischem Gewebe verbessert, wurde auf einigen Ultradünnschnitten durchgeführt. Das Einbetten und Schneiden des Gewebes wurde von Frau Petra Schrade durchgeführt (Charité Berlin, Elektronenmikroskopie am CVK). Gleichzeitig wurden Parallelschnitte ohne Schnittfixierung unter dem TEM analysiert, um potentielle Unterschiede der Schwermetallfixierung hinsichtlich der Identifizierung der Eisenoxid-Nanopartikel zu untersuchen. Für die Identifikation der Eisenoxid-Nanopartikel innerhalb der atherosklerotischen

Plaques, wurden letztendlich ausschließlich nicht kontrastierte Schnitte benutzt, da auf diesen Schnitten der Eigenkontrast der Eisenoxid-Nanopartikel zur eindeutigen Identifikation genutzt werden konnte. Auf Schnitten, die einer Behandlung mit Schwermetall unterzogen wurden, überlagerte diese Schnittfixierung den Kontrast der Eisenoxid-Nanopartikel, so dass diese nicht eindeutig detektiert werden konnten. Die Analyse der Gewebe erfolgte auf einem Zeiss EM906 (Oberkochen, Deutschland). Resultierende Negative wurden eingescannt und mit *ImageJ* sowie *Adobe Photoshop* bearbeitet.

### 3.7. Magnetische-Partikel-Spektrometrie (MPS)

Nachweis sowie Quantifizierung der vier verschiedenen *in vivo* untersuchten Eisenoxid-Nanopartikel innerhalb der atherosklerotischen Plaques erfolgte über die Magnetische-Partikel-Spektrometrie (MPS) [142]. Für die Messungen wurde ein kommerziell erhältliches MPS-Gerät (Bruker BioSpin MRI GmbH) benutzt. MPS detektiert spezifisch die nichtlineare magnetische Resonanz von magnetischen Nanopartikeln, die einem oszillierenden magnetischen Feld ausgesetzt werden. Biologisches Gewebe und paramagnetisches Eisen aus dem Blut tragen nicht zu einem MPS-Signal bei.

Die aus den ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen entnommenen Gewebeproben mit atherosklerotischen Plaques wurden für die MPS-Messungen in 0,1 ml PCR-Gefäße (Applied Biosystems) überführt. Für die MPS-Messungen wurden das atherosklerotische Gewebe aus den *ex-vivo*-Messungen eingesetzt (siehe 3.5.2.-3.5.4.). Dafür wurde das verbliebene Formalin vorsichtig entfernt, um das Gewebe möglichst exakt in der Spitze des PCR-Gefäßes zu positionieren, da dort die Messungen am verlässlichsten sind.

Während der Messung wurde die jeweilige Probe einem magnetischen Wechselfeld ( $B_{\text{excit}} = 25 \text{ mT}$ ) mit einer festen Anregungsfrequenz ( $f_{\text{excit}}$  of 25 kHz) ausgesetzt. Die nichtlineare Magnetresonanz wurde für 10 sek mit einer Magnetkopfspule (*pickup coil*) (Sensitivität:  $5 * 10^{12} \text{ AM}^2$ ) gemessen, die das PCR-Gefäß an seiner Spitze eng umschließt. Durch gradiometrische Anordnung und Filterung der Magnetkopfspule ist dessen fundamentale Anregungsfrequenz stark unterdrückt, wodurch ein störfreies Signal der Proben zu detektieren ist.

Die MPS-Spektren der magnetischen Nanopartikel wurden durch Fourier-Transformation der Signalamplituden unter Berücksichtigung der ungeraden Spektralkomponenten (ungerade Vielfache der Frequenz  $f_{\text{excit}}$ ) erhalten. Sämtliche MPS-Messungen wurden bei 37°C durchgeführt. Für die Quantifizierung der Nanopartikel-Anreicherung in atherosklerotischem Gewebe sowie der Halbwertszeitbestimmung der VSOP wurde der Moment der dritten Harmonischen ( $\mu_{A3}$ ) des MPS Spektrums jeder Gewebeprobe auf die  $\mu_{A3}$  Amplitude einer Referenzmessung von Nanopartikeln mit bekanntem Eisengehalt normiert. Im Einzelnen wurden die magnetischen Momente der Eisenoxid-Nanopartikel mit einem Volumen von jeweils 10  $\mu\text{l}$  bestimmt. Da die Eisenkonzentration der Eisenoxid-Nanopartikel vorher bestimmt wurde (siehe 3.2.5.), konnte einerseits die Masse an Eisen in den Referenzmessungen der Partikel bezogen auf das eingesetzte Volumen berechnet werden. Andererseits diente der Zusammenhang zwischen dieser berechneten Eisenmasse und dem ermittelten magnetischen Moment als Normierung für die Quantifizierung bzw. als Normierung für die folgenden MPS-Messungen der atherosklerotischen Plaques. Die Referenzen (Nanopartikel) wurden unter den selben Bedingungen wie das atherosklerotische Gewebe gemessen. Während der Messung der Gewebeproben lagen die Nanopartikel in einem fixiertem Zustand vor, was eine freie Beweglichkeit beeinträchtigen könnte. Eine mögliche eingeschränkte Beweglichkeit der Nanopartikel, könnten sich auf deren MPS-Signalintensitäten auswirken.

Da die Partikel in wässriger Suspension, also in Flüssigkeit gemessen wurden, war es notwendig die magnetischen Momente bzw. die MPS-Signale der Referenzmessungen zusätzlich in einem immobilisierten Zustand zu ermitteln, um potentielle Differenzen der Signalintensitäten zwischen flüssigem und immobilisiertem Zustand zu untersuchen. Hierzu wurden 5  $\mu\text{l}$  der Partikel-Suspensionen über Nacht mit einer Spatelspitze Gips inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Messung zur Bestimmung der magnetischen Momente unter den gleichen Bedingungen.

Die MPS-Messungen wurden zusammen mit Dr. Frank Wiekhorst an der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt (PTB) in Berlin durchgeführt.

### 3.7.1. Bluthalbwertszeitbestimmung von VSOP über MPS-Messungen im Blut

Zur Bestimmung der Halbwertszeiten wurden jeweils 5 verschiedenen ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen nach i.v. Gabe von VSOP (500 µmol Fe/kg) unter Anästhesie durch 1-2%-haltiges Isofluran-Sauerstoff-Gemisch nach verschiedenen Zeiten Blut abgenommen und in mit EDTA beschichteten Monovetten (3 ml; Sarstedt) gesammelt (siehe 3.3.2.). Die Blutentnahme erfolgte jeweils nach 10 min, 30 min, 90 min und nach 180 min über eine Herzpunktion. Als Nullwert diente entnommenes Blut einer ApoE<sup>-/-</sup>-Maus ohne Injektion von VSOP. Das Blut wurde für die MPS-Messungen aus den EDTA-Monovetten in PCR-Gefäße überführt. Es wurden jeweils 80 µl Blut für die Messungen verwendet. Über die Normierung zur VSOP-Referenzmessung, in der nur VSOP mit bekanntem Eisengehalt gemessen wurde, konnte die Eisenmasse von VSOP zu den verschiedenen Zeitpunkten im Blut bestimmt werden. Eine entsprechende Kinetik zur Bestimmung der Halbwertszeit der VSOP wurde mit *GraphPad Prism* berechnet, indem die Eisenmassen in Abhängigkeit der Zeit aufgetragen wurden. Anschließend wurden die Messpunkte mit Hilfe einer exponentiellen Gleichung ( $y = y_0 * (-k * x)$ ) über einen nichtlinearen Fit (*one phase decay*) angepasst, über den die Halbwertszeit bestimmt wurde. Das Plateau wurde gleich Null gesetzt. K ist die Zeitkonstante des Zerfalls, x ist die Zeit in Minuten.

### 3.7.2. Nachweis und Quantifizierung der Nanopartikel in atherosklerotischen Geweben

Bei der MPS-Messung wurden pro Tier jeweils Aortenbogen, Aortenwurzel und Truncus brachiocephalicus in ihrer Gesamtheit gemessen. Dabei wurde jeweils die gleichen Bereiche atherosklerotischen Gewebes vorsichtig präpariert, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Nach den *ex-vivo*-Messungen (3.5.2.-3.5.4) wurde das Gewebe vorsichtig mit einem Skalpell aus den Agarose-Phantomen herausgetrennt. Die restliche LM-Agarose wurde mit erwärmtem (40°C) PBS-Puffer entfernt. Bis zu den MPS-Messungen wurde das Gewebe in PFA (4%) aufbewahrt. Alle Präparationen für die MPS-Messungen wurden mit einer eisenfreien Augenschere und einer Pinzette aus Titan sowie einem Skalpell aus Keramik ausgeführt, um möglichen Abrieb des Bestecks mit potentiell magnetischen Eigenschaften

auszuschließen, da das die MPS-Messung verfälschen würde. Pro Gruppe wurde das atherosklerotische Gewebe dreier Tiere analysiert.

### **3.8. *In-vivo*-Halbwertszeitbestimmungen der Nanopartikel mittels MRT**

Die nichtinvasiven Bestimmungen von Halbwertszeiten der elektrostatisch stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikel wurden mit Hilfe des ICON-MRTs (Bruker) durchgeführt. Die Bluthalbwertszeit bzw. Blutzirkulationszeit von Kontrastmitteln kann anhand von MRT-Messungen ermittelt werden. Hierbei wird nach einer Leermessung (*prescan* ohne Kontrastmittel) nach (post) Injektion des Kontrastmittels mit entsprechenden Sequenzen die Helligkeit z. B. im Herzen gemessen. Über die Zeit wird eine Abnahme der Helligkeit gemessen. Dabei unterscheiden sich die Kinetiken in Abhängigkeit von Art und Dosis der Kontrastmittel. Im Falle der Eisenoxid-Nanopartikel ist eine Blutzirkulationsmessung mittels MRT bisher lediglich mit geringen Dosierungen möglich. Eisenoxid-Nanopartikel haben neben ihren starken T<sub>2</sub>\*/T<sub>2</sub>\*-Effekten auch Auswirkungen auf die T<sub>1</sub>-Relaxivitäten (siehe 1.6.3.). Dieser T<sub>1</sub>-Effekt bewirkt in T<sub>2</sub>-gewichteten MRT-Sequenzen nach Injektion zunächst eine Helligkeitszunahme im Bereich des Herzens. Über die Zeit verringert sich die Konzentration der Eisenoxid-Nanopartikel im Blut, so dass es zu einer sukzessiven Abnahme der Helligkeit kommt. Über die Helligkeitsabnahme kann die Halbwertszeit bestimmt werden. Bei höheren Dosierungen überwiegt allerdings der T<sub>2</sub>\*-Effekt und statt einer Helligkeitszunahme wird das Bild direkt nach Injektion im Bereich des Herzens dunkel [121]. Eine Bestimmung der Halbwertszeit bei höheren Dosierungen ist mit Sequenzen wie FLASH, die aufgrund ihrer kurzen Meßzeit bei geringen Dosierungen benutzt werden, nicht möglich.

Mit Hilfe der *Ultra short TE* (UTE)-Sequenz kann diese Problematik umgangen werden. UTE-Sequenzen ermöglichen das Messen mit sehr kurzen Echozeiten (TE) im Bereich von Mikrosekunden. Dadurch kann auch bei hohen Dosierungen des Kontrastmittels noch ein ausreichendes Messsignal erzielt werden. Der T<sub>2</sub>\*-Effekt der Partikel auf das Signal ist aufgrund der sehr kurzen Messzeit (TE) nach dem Einstrahlen des RF-Pulses noch gering. Für die Halbwertszeitmessungen der verschiedenen Eisenoxid-Nanopartikel wurde pro Partikel jeweils eine ApoE<sup>-/-</sup>-Maus nach Injektion (500 µmol Fe/kg) im Icon MRT mit der UTE-Sequenz gemes-

sen. Vor und direkt nach Injektion wurden jeweils alternierend UTE-Sequenzen mit verschiedenen TE-Zeiten (siehe Tabelle 3.5) gemessen. Der benutzte Flipwinkel der UTE-Sequenz von  $90^\circ$ , verbunden mit der kurzen Pulswiederholzeit TR verursachen eine starke T1-Gewichtung der Bilder. Nur das kontrastmittelhaltige Blut verursacht noch ein nennenswertes Signal bei der Messung, während der restliche Bereich des Gewebes dunkel erscheint. Bei der Auswertung wurde über die unterschiedlichen Signale bei verschiedenen TE-Zeiten die  $T2^*$ -Relaxationszeit des Blutes über die Gleichung:  $S_0 * e^{-TE/T2^*}$  und einem nicht-linearen Fit bestimmt. Über die  $T2^*$ -Werte konnte die Relaxationsrate  $R2^*$  bestimmt werden ( $R2^*=1/T2^*$ ). Im Folgenden wurden die Halbwertszeit der Eisenoxid-Nanopartikel über einen Fit der Formel:

$R2^*(t) = R2^*(\text{Blut}) + R2^*(\text{Kontrastmittel}) * C_0(\text{kontrastmittel}) * 2^{-t/HWZ}$  mit den Fit-Parametern Halbwertszeit und  $R2^*(\text{Kontrastmittel})$  bestimmt.  $C_0$  steht für die Konzentration des Kontrastmittels zum Zeitpunkt 0,  $t$  für den Messzeitpunkt und HWZ für die Halbwertszeit. Die Bestimmungen erfolgten unter der Annahme, dass es einen linearen Zusammenhang zwischen der Kontrastmittelkonzentration im Blut und dessen Beeinflussung der transversalen Magnetisierung bzw. den  $T2^*$ -Zerfall gibt. Dieser lineare Zusammenhang wird als Relaxivität der Kontrastmittel beschrieben. Die Auswertung der Messung zur Bestimmung der Halbwertszeiten wurde von Dr. Carsten Warmuth durchgeführt.

Für die Messungen wurden die Tiere wie beschrieben narkotisiert (siehe 3.5.1.). Über ein Wasserbad, das direkt an die Körperspule angeschlossen war, konnte eine konstante Körpertemperatur von  $37^\circ\text{C}$  beibehalten werden. Als Spule diente eine Mauskörperspule von Bruker Biospin. Die Atmung wurde während der gesamten Messung über die Monitoring-Software (SA Instruments, Inc.) überwacht. Hierzu wurde ein Atmungskissen (Graseby) auf dem Rücken der Tiere angebracht. Nach Injektion wurden über einen Zeitraum von etwa 180 min alternierend die in Tabelle 3.5 beschriebenen Sequenzen aktiviert. Für die Auswertung wurde jeweils die maximale Signalintensität im Herzen bestimmt.

**Tabelle 3.5: UTE-Sequenzen mit jeweiligen Parametern zur Halbwertszeitbestimmung der synthetisierten Eisenoxid-Nanopartikel.** Die Sequenzen unterscheiden sich nur durch die verschiedenen Echozeiten (TE).

Parameter	UTE [100 $\mu$ s]	UTE [800 $\mu$ s]	UTE [1600 $\mu$ s]
TE [ $\mu$ s]	100	800	1600
TR [ms]	4	4	4
FOV [cm]	6,0	6,0	6,0
flip angle [°]	90	90	90
Auflösung [ $\mu$ m]	469	469	469
Mittlungen	1	1	1
Aufnahmezeit [min]	2:13	2:13	2:13
Schichtdicke [mm]	60	60	60

### **3.9. Nachweis von Eu-dotierten VSOP in Leber und atherosklerotischen Plaques über Laserablation induktiv gekoppelte Plasma Massenspektrometrie (LA-ICP-MS)**

Um die VSOP histologisch eindeutig nachweisen zu können, wurde während der Synthese der Magnetitkerne das Lanthanoid Europium(III)-chlorid-hexahydrat hinzugefügt (siehe 3.1.). Im Verhältnis zum eingesetzten Eisen(III) wurden 5% Europium(III) (w/w) verwendet, welches in den Eisenoxid-Kern eingebaut wurde. Da Europium im Körper nicht vorkommt, kann es als idealer Nachweisindikator für VSOP dienen. Europium verfügt über fluoreszierende Eigenschaften, über die ein histologischer Nachweis der VSOP mittels Mikroskopie ermöglicht werden sollte. Ursprünglich war dies auch der Anlass, Europium in den Kern der VSOPs zu integrieren. Um auf histologischen Schnitten die Fluoreszenz des Europiums nutzen zu können, sind jedoch weitere Schritte wie z. B. die Verwendung von sogenannten Antennen, die einen Komplex mit dem Europium bilden unabdingbar. Die Antennen werden durch das Anregungslicht angeregt und übertragen den angeregten Zustand auf das Lanthanoid. Bis zum Ende dieser Dissertation konnten diese Hürden in einem separaten Projekt nicht einwandfrei ausgeräumt werden, so dass ein histologischer Nachweis über das Europium mittels Fluoreszenzmikroskopie noch nicht möglich war.



Eine andere Methode, Europium auf histologischen Präparaten nachzuweisen, stellt die Laserablation induktiv gekoppelte Plasma Massenspektrometrie (LA-ICP-MS) dar. Dabei wird auf beschichteten Objektträgern haftendes Gewebe mit Hilfe eines fokussierten Laserstrahls abgetragen und in die Gasphase überführt. Die in einem Aerosol befindlichen ablatierten Partikel werden mit Hilfe von Argon direkt in das heiße Plasma einer ICP-MS transportiert, wo eine Ionisierung der Elemente zwecks Elementanalyse durchgeführt wird [143]. Die angeregten Ionen werden sukzessiv dem Massenspektrometer-Detektor zugeführt und können letztendlich auf dem Objektträger orts aufgelöst zugeordnet werden. Elemente können aufgrund ihres Masse/Ladungs-Verhältnisses eindeutig identifiziert werden. Mit Hilfe der LA-ICP-MS können mehrere Elemente sowie verschiedene Isotope der einzelnen Elemente gleichzeitig auf einem Objektträger analysiert werden.

Unter Verwendung von Europium, bzw. dessen Einbau in die Eisenoxidkerne der VSOP, sollte die Anwendbarkeit der LA-ICP-MS hinsichtlich des spezifischen Nachweises von VSOP in histologischen Paraffinschnitten untersucht werden. Das für die Versuche genutzte Laserablationssystem *New Wave 213* (ESI, Portland, USA) besitzt folgende Eigenschaften, mit denen das Gewebe Linie nach Linie abgetragen wurde: Wellenlänge von 213 nm, Laserenergie von 35%, Repetitionsfrequenz 20 Hz, Spotgröße des Lasers zwischen 6 und 30  $\mu\text{m}$ . Die Objektträger befanden sich in einer ungekühlten Kammer. Das Laserablationssystem wurde direkt an das ICP Sektorfeld-Massenspektrometer gekoppelt (Element XR, Thermo Fisher Scientific; Plasma Quelle 1350 W, Plasmagas 15 L  $\text{min}^{-1}$  Argon, Hilfsgas 1.0 L  $\text{min}^{-1}$  Argon, Transportgas 0,6 L  $\text{min}^{-1}$  Argon, Massen Auflösung  $m/\Delta m$ : 300, *Sample* Zeit 2 ms).

Für die Verifizierung der Methode wurden zunächst Schnitte von Lebern mit der LA-ICP-MS untersucht, da Eisenoxid-Nanopartikel vorwiegend durch die Leber aus dem Blut aufgenommen werden (siehe 1.7.3.). Bei Lebern von ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen, denen Eu-dotierte VSOP, normale VSOP (ohne Europium) und keine Partikel verabreicht worden waren, wurden die Elemente Eisen (<sup>57</sup>Fe) und Europium (<sup>153</sup>Eu) analysiert. Auf die gleiche Weise wurden anschließend Schnitte mit atherosklerotischen Läsionen untersucht. Für Eisen wurde das Isotop 57 gewählt, da es im Gegensatz zum Isotop 56 während der Messungen zu weniger Interferenzen mit anderen Elementen kommt.

Die Eigenschaften des Laserstrahls für den Abtrag der Leberschnitte waren eine Spotgröße von 150  $\mu\text{m}$  (Überlappung 25  $\mu\text{m}$ ), eine Scan-Geschwindigkeit von 150  $\mu\text{m s}^{-1}$ , 20 Hz und 32% Energie. Für die Untersuchung von atherosklerotischen Plaques wurden die Messparameter variiert (siehe 4.12.). Die Größe des Laserspots betrug 15  $\mu\text{m}$  bzw. 8  $\mu\text{m}$ , (Überlappung 5  $\mu$  bzw. 2  $\mu\text{m}$ ), Scan-Geschwindigkeit: 15  $\mu\text{m s}^{-1}$  bzw. 8  $\mu\text{ms}^{-1}$ .

Für die Untersuchungen mit der LA-ICP-MS wurde in Paraffin eingebettetes Gewebe wie unter 3.4.1.-3.4.2. beschrieben in einer Dicke von 5-10  $\mu\text{m}$  auf beschichteten Super Frost® Plus (Thermo scientific) Objektträgern verwendet.

Die LA-ICP-MS Messungen wurden von Frau Dr. Larissa Müller an der Bundesanstalt für Materialforschung -prüfung (BAM; Berlin) durchgeführt.

## 4. Ergebnisse

---

### 4.1. Eisenoxid-Nanopartikel

Generell existieren zwei grundlegend unterschiedliche Methoden, um Eisenoxid-Nanopartikel zu stabilisieren (siehe 1.7.2.). Sterisch stabilisierte Eisenoxid-Nanopartikel sind mit einer Hülle aus Polymeren beschichtet, die über eine räumliche Abschirmung die Aggregation der Partikel verhindert. Alternativ können Eisenoxid-Nanopartikel-Suspensionen jedoch auch über elektrostatische Abschirmung stabilisiert werden. Dabei sorgen kleine monomere Moleküle wie z. B. Citronensäure auf der Partikeloberfläche über eine resultierende Oberflächenladung für eine gegenseitige Abstoßung und gewährleisten so die Stabilität der Suspension. Diese Ladung kann sowohl positiv als auch negativ sein und ist abhängig von dem für die Beschichtung verwendeten Molekül.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten mehrere mit unterschiedlichen Molekülen beschichtete, elektrostatisch stabilisierte Eisenoxid-Nanopartikel mit einer negativen Ladung synthetisiert werden. Im Anschluss war geplant alle stabilen Nanopartikel auf eine potentielle Anreicherung in atherosklerotischen Plaques des ApoE<sup>-/-</sup>-Mausmodells zu untersuchen.

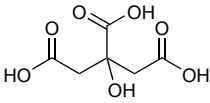
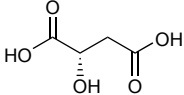
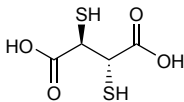
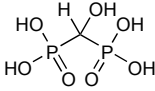
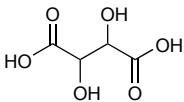
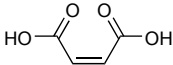
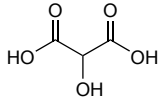
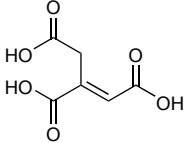
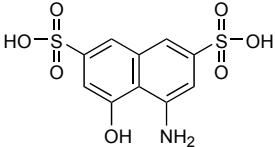
#### 4.1.1. Synthese von elektrostatisch stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikeln

Um Eisenoxid-Nanopartikel elektrostatisch zu stabilisieren, sind möglichst starke koordinative Bindungen auf der Oberfläche notwendig. Über diese Fähigkeit verfügen im Besonderen Carboxygruppen [90, 98, 144], aber auch Phosphonat- und Sulfonatgruppen [145], die mit den Eisenatomen der Partikelkerne eine koordinative Bindung eingehen können. Die Affinität zur Oberfläche der Eisenoxid-Nanopartikel wird besonders beim Auftreten mehrerer solcher Gruppen in einem Molekül durch den auftretenden Chelateffekt erhöht [144, 146]. Zudem muss für die Verwendbarkeit in biologischen Systemen das auf der Oberfläche koordinierte Molekül bei neutralem pH eine Ladung bereitstellen, die für die Abschirmung der Parti-

kel untereinander sorgt und somit die Stabilität der Nanopartikel gewährleistet. Für die Ladung ist eine weitere funktionelle Gruppen wie z. B. eine Carboxygruppen erforderlich, die nicht auf der Partikeloberfläche koordiniert, sondern nach außen ragt. Die Carboxygruppen der verwendeten monomeren Säuren sind bei neutralem pH teilweise deprotoniert, was zu einer negativen Oberflächenladung der Partikel führt.

Die verschiedenen Stoffe wurden in Abhängigkeit ihrer potentiellen Bindungsaffinität zu Eisenoxidoberflächen ausgesucht. Weitere Kriterien waren die Biokompatibilität sowie die Kosten der jeweiligen Stoffe. Tabelle 4.1. zeigt die Ergebnisse der Versuche zur Synthese von stabilen Eisenoxid-Nanopartikel-Suspensionen unter Verwendung der verschiedenen Monomere.

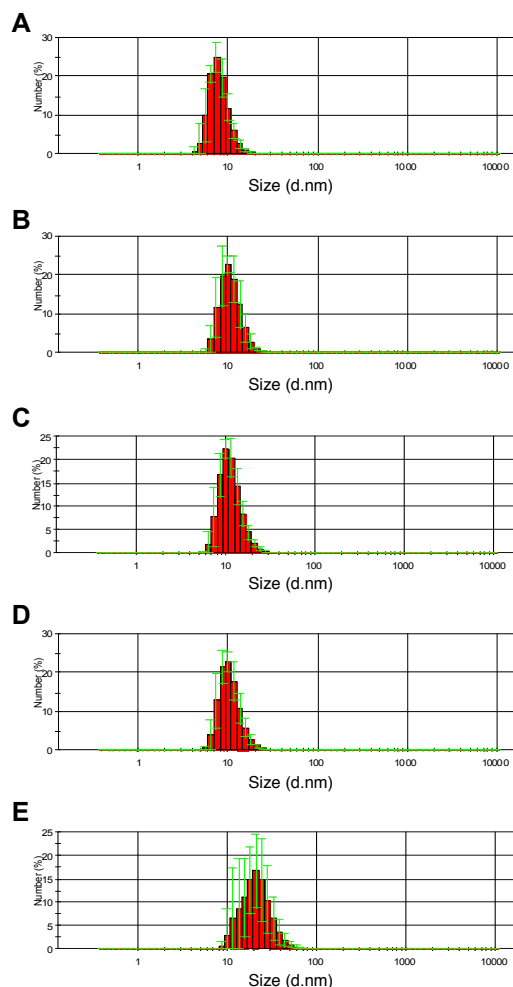
**Tabelle 4.1: Ergebnisse der Synthesen von elektrostatisch stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikeln nach Beschichtung mit aufgeführten Stoffen.**

Molekül	Stabil	Instabil	Struktur
Citronensäure	+		
L-Äpfelsäure	+		
<i>meso</i> -2,3-Dimercaptobernsteinsäure (DMSA)	+		
Etidronsäure	+		
DL-Weinsäure	+		
Maleinsäure		-	
Tartronsäure		-	
<i>trans</i> -Aconitsäure		-	
4-Amino-5-hydroxynaphthalin-2,7-disulfonsäure		-	

Insgesamt konnten neben den schon etablierten VSOP (mit Citronensäure) 4 weitere elektrostatisch stabilisierte Eisenoxid-Nanopartikel durch Beschichtung mit den monomeren Säuren Äpfelsäure, DMSA, Etidronsäure und Weinsäure synthetisiert werden. Dagegen resultierten die Beschichtungen der Eisenoxid-Kerne mit Maleinsäure, Tartronsäure, *trans*-Aconitsäure sowie der 4-Amino-5-hydroxynaphthalin-2,7-disulfonsäure nicht in stabilen Nanopartikel-Suspensionen. Pro Partikelansatz ergeben sich im Falle der stabilen Nanopartikel in der Regel mehrere verschiedene Fraktionen nach der jeweiligen Magnetseparation (siehe 3.1.1.-3.1.9.). Es wurden jeweils die Fraktionen mit den größten Übereinstimmungen hinsichtlich der hydrodynamischen Größe ausgewählt, um eine Vergleichbarkeit bei den *in-vivo*-Experimenten zu gewährleisten (siehe 3.2.6.). In der folgenden Charakterisierung der unterschiedlich beschichteten Nanopartikel sind jeweils lediglich die Fraktionen aufgeführt, die relevant für die anschließenden *in-vivo*-Versuche waren.

### **4.1.2. Größenbestimmung der neu synthetisierten elektrostatisch stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikel**

Die unter 3.2.1. beschriebenen Größenmessungen der neu synthetisierten elektrostatisch stabilisierten Partikel ergaben die in Abbildung 4.1 dargestellten hydrodynamischen Größenprofile. Aufgeführt sind jeweils die Fraktionen, die aufgrund ihrer ähnlichen Größe für die folgenden Tierexperimente ausgewählt wurden.



**Abbildung 4.1: Exemplarische Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers von VSOP (A), Etidronsäure- (B), Weinsäure- (C), Äpfelsäure- (D) und Dimercaptobernsteinsäure- (E) Eisenoxid-Nanopartikeln mittels dynamischer Lichtstreuung.** Während die ersten vier (A-D) Nanopartikel eine vergleichbare Größe und Größenverteilung zeigen, sind die mit Dimercaptobernsteinsäure (E) beschichteten Nanopartikel insgesamt größer und weisen zudem eine breitere Verteilung auf. Dargestellt sind jeweils die Anzahlverteilungen (*Number*) der Messungen der Partikelfraktionen, die in den *in-vivo*-Versuchen eingesetzt wurden.

Alle Partikel zeigen eine relativ enge Größenverteilung und keine Aggregationen (kein Signal über 100 nm) in der Anzahlverteilung, als auch in der Volumenverteilung (nicht gezeigt). Die VSOP sind im Vergleich mit einer Größenverteilung zwischen 6,5 und 10,5 nm etwas kleiner, während Etidronsäure- (8,7-13,5 nm), Weinsäure- (8,7-13,5 nm) und Äpfelsäure-Nanopartikel (7,5-11,7 nm) ein ähnliches hydrodynamisches Größenprofil aufweisen. Die DMSA-Nanopartikel haben eine breitere Verteilung und sind auch insgesamt deutlich größer (13,5-28,2 nm). Wie in Abbildung 4.1 ersichtlich, handelt es sich bei den verschiedenen Fraktionen jeweils nicht um eine exakt begrenzte Größe, sondern vielmehr um eine Größenverteilung. Viele Veröffentlichungen geben lediglich einen Wert für die Größe an, wo-

bei es sich meist um das Maximum handelt. Tabelle 4.2 listet sowohl den maximalen Peak, als auch die halbmaximale Breite der verschiedenen Partikel auf. Die halbmaximale Breite bezieht sich auf die Größenbereiche, die prozentual mindestens die Hälfte des maximalen Wertes aufweisen.

**Tabelle 4.2: Hydrodynamischer Durchmesser (halbmaximale Breite und Maximum) der verschieden beschichteten elektrostatisch stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikel.** Angegeben sind jeweils die Fraktionen, die die größten Gemeinsamkeiten im Größenprofil aufwiesen und die für die folgenden *in-vivo*-Experimente benutzt wurden.

Nanopartikel	halbmaximale Breite [nm]	Maximum [nm]
VSOP	6,5 - 10,5	7,5
Etidronsäure	8,7 - 13,5	10,1
Weinsäure	8,7 - 13,5	10,1
Äpfelsäure	7,5 - 11,7	10,1
DMSA	13,5 - 28,2	21,0

#### 4.1.3. Bestimmung der Relaxivität und des Zetapotentials

Die Partikel wurden des Weiteren durch die Bestimmung des Zeta-Potentials (3.2.2.) und der Relaxivitäten (siehe 3.2.3.) charakterisiert. Die Relaxivitäten der Partikel sind ein Maß für die Fähigkeit T1- bzw. T2-Relaxationszeiten zu beeinflussen (siehe 1.6.3.). Je höher die jeweilige Relaxivität, desto größer der Kontrast in einer entsprechend gewichteten MRT-Messung. Tabelle 4.3 listet die Ergebnisse diesbezüglich auf.



**Tabelle 4.3: T1- und T2-Relaxivitäten, deren Verhältnis sowie das Zetapotential der verschiedenen Eisenoxid-Nanopartikel.**

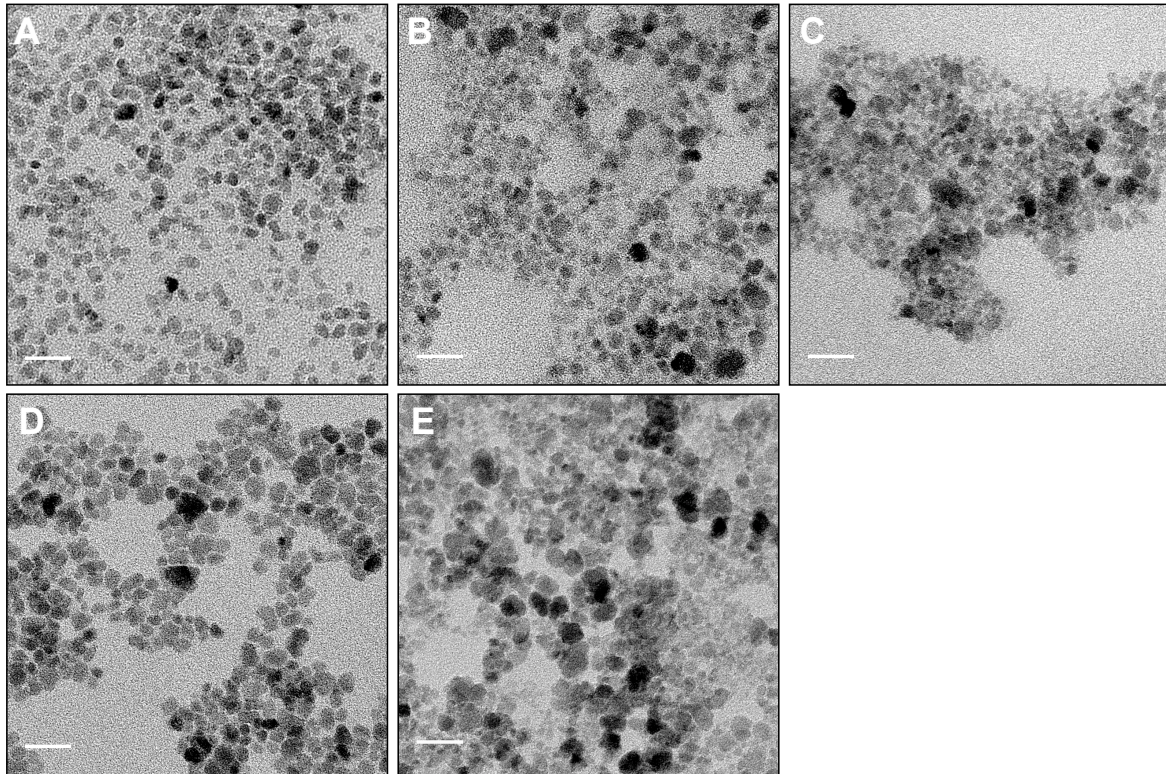
Nanopartikel	T1 Relaxivität [mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	T2 Relaxivität [mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	T2/T1	Zetapotential [mV]
VSOP	20	52	2,6	-24,7 ± 3,8
Etidronsäure	13	44	3,4	-35,9 ± 6,0
Weinsäure	11	36	3,4	-26,8 ± 0,6
Äpfelsäure	25	103	4,1	-26,5 ± 1,2
DMSA	26	197	7	-40,2 ± 3,4

Die Partikel weisen jeweils unterschiedliche T1- und T2-Relaxivitäten auf, wobei die T2-Relaxivitäten bei allen Partikeln um ein vielfaches höher liegen. Das Verhältnis zwischen den T1- und T2-Relaxivitäten ist bei VSOP, Etidronsäure-, Weinsäure- und Äpfelsäure-Nanopartikeln in etwa vergleichbar. Die mit Dimercaptobornsteinsäure beschichteten Partikel besitzen einen deutlich höheren Wert, was durch die im Vergleich sehr hohe T2-Relaxivität begründet ist. Diese wiederum ergibt sich wahrscheinlich aus dem größeren Durchmesser der Partikel. Neben der Größe sind die Relaxivitäten auch von der Kristallstruktur der Nanopartikel abhängig. So weisen Maghemite aufgrund eines höheren Fe<sup>3+</sup>-Anteils generell höhere Relaxivitäten im Vergleich zu Magnetiten auf. Während der Beschichtung kommt es zur Oxidation der Magnetitkerne, die unter Anwesenheit von Luftsauerstoff zu Maghemit umgesetzt werden (siehe 1.7.2.). Größere Relaxivitäten bei gleicher Größe sind demnach wahrscheinlich auf unterschiedliche Maghemit-Anteile der Nanopartikel zurückzuführen.

Das Zeta-Potential bzw. elektrische Potential ist ein Maß für die Ladung der Partikel an deren Oberfläche. Alle untersuchten elektrostatisch stabilisierten Partikel sind bei neutralem pH (siehe 3.2.2.) negativ geladen, wobei die VSOP eine geringere negative Ladung im Vergleich zu den größeren DMSA-Partikeln aufweisen. Wie in 4.1. beschrieben sorgt die negative Ladung durch elektrostatische Abstoßung der Nanopartikel untereinander für die Stabilität der Nanopartikel-Suspensionen.

#### 4.1.4. TEM der synthetisierten Nanopartikel

Die Nanopartikel wurden ferner über TEM-Mikroskopie charakterisiert. Über TEM-Bilder sind bei hohen Auflösungen einzeln voneinander getrennte Nanopartikel erkennbar.



**Abbildung 4.2:** Elektronenmikroskopiebilder von VSOP (A), Etidronsäure-Nanopartikeln (B), Weinsäure-Nanopartikeln (C), Äpfelsäure-Nanopartikeln (D) und Dimercaptobernsteinsäure-Nanopartikeln (E). Die Aufnahmen bestätigen in allen Fällen die erfolgreiche Synthese von Eisenoxid-Nanopartikeln mit den verschiedenen Beschichtungen. Maßstabsbalken: 20 nm.

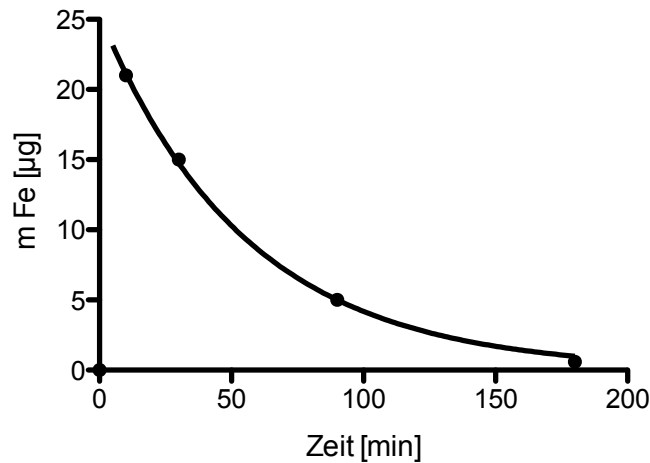
Abbildung 4.2 verifiziert die Synthese von Eisenoxid-Nanopartikeln mit den 5 verschiedenen Beschichtungen. Durch den Eigenkontrast im TEM sind die Eisenoxid-Kerne der Nanopartikel jeweils gut zu erkennen. Weiterhin ist ersichtlich, dass bei allen 5 Nanopartikeln eine Verteilung bezüglich der Größe vorliegt. Des Weiteren sind geringfügige Unterschiede hinsichtlich der Kerngröße zwischen den verschiedenen beschichteten Nanopartikeln erkennbar. Die Größenverteilung der DMSA-Partikel ist breiter als die der anderen untersuchten Partikel. Außer den DMSA-Nanopartikeln liegen alle Kerne in einem Größenbereich unter 20 nm. Im Vergleich bestätigten sich die Größenmessungen mittels dynamischer Lichtstreuung (siehe 4.1.2.), wobei der hydrodynamische Durchmesser der Partikel bestimmt wurde.

---

Generell liefern diese Messungen größere Durchmesser als die tatsächlich vorliegenden Kerndurchmesser, da sich in in wässrigen Lösungen Hydrathüllen um die Partikel bilden.

#### **4.2. Bestimmung der Bluthalbwertszeit von VSOP im ApoE<sup>-/-</sup>-Mausmodell mittels MPS**

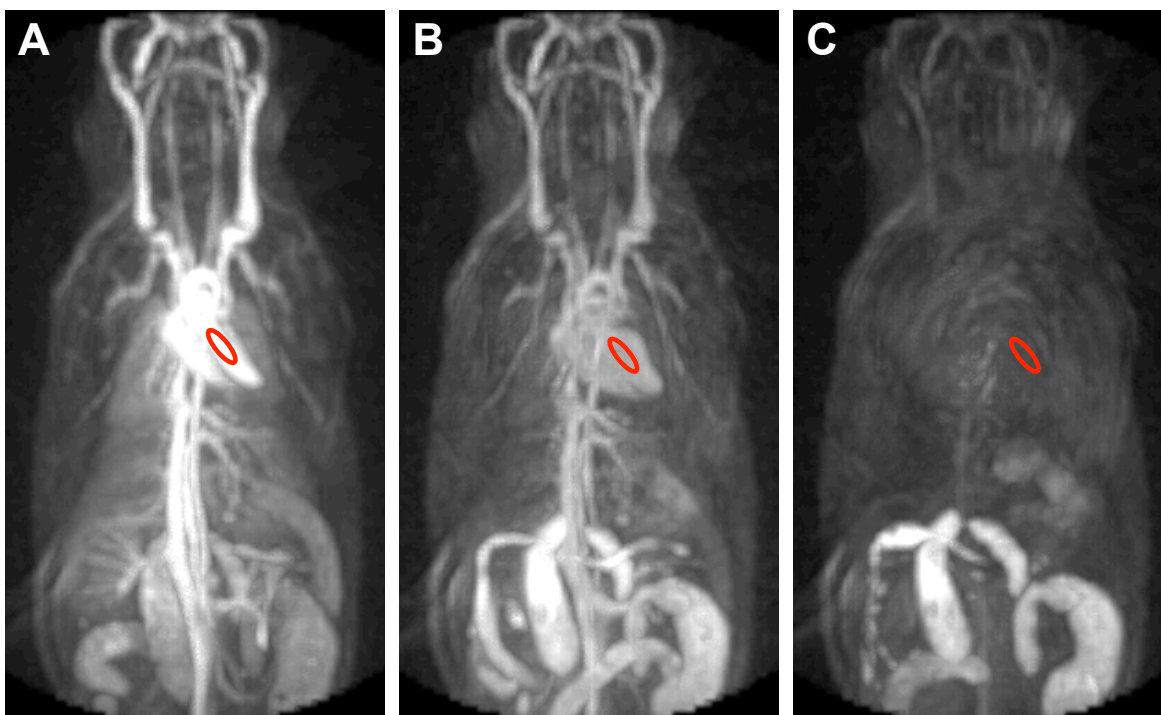
Für die Versuche zur Anreicherung in atherosklerotischen Läsionen wurde zunächst die Bluthalbwertszeit der VSOP analysiert. Die VSOP sollten als Referenz für die anderen elektrostatisch stabilisierten Eisenoxid-Partikel dienen, da diese schon zuvor im Kaninchenmodell nachgewiesen wurden [147]. Eisenoxid-Nanopartikel zirkulieren dosisabhängig unterschiedlich lange und die Zirkulationsdauer hängt darüber hinaus stark vom Organismus ab. In kleinen Organismen wie z. B. Mäusen zeigen die Partikel eine kurze, in großen wie z. B. im Menschen eine vergleichsweise längere Halbwertszeit. Um den optimalen Zeitpunkt für die Analyse der atherosklerotischen Plaques zu ermitteln, musste zuerst die Halbwertszeit der Partikel bestimmt werden, wobei idealerweise zu diesem Zeitpunkt der Großteil der Partikel nicht mehr zirkulieren sollte. Dazu wurden VSOP mit einer Dosis von 500 µmol Fe/kg i.v. injiziert, woraufhin wie unter 3.3.2. beschrieben zu verschiedenen Zeiten nach der Injektion Blut abgenommen wurde. Mittels MPS-Messungen (siehe 3.7.1.) wurden die Eisenmassen im Blut 10 min, 30 min, 90 min und 180 min nach i.v. ermittelt und daraus eine Halbwertszeit für die VSOP im ApoE<sup>-/-</sup>-Mausmodell über einen nichtlinearen Fit bestimmt (siehe Abbildung 4.3). Die ermittelte Halbwertszeit für die VSOP betrug 38,5 min. Zur Halbwertszeitbestimmung mittels MPS benötigt man relativ hohe Tieranzahlen. Im Laufe dieser Arbeit wurde eine nichtinvasive Methode mittels MRT-Messungen entwickelt, über die Halbwertszeitbestimmungen der anderen elektrostatisch stabilisierten Eisenoxid-Partikel realisiert werden konnten (Abbildung 4.3).



**Abbildung 4.3: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Bluthalbwertszeitmessung von VSOP über MPS.** Auf der y-Achse sind die gemessenen Eisenmassen in Abhängigkeit der Zeit aufgetragen. Jeder Punkt entspricht der Blutabnahme bei einer anderen ApoE<sup>-/-</sup>-Maus. Die Kurve wurde mit einem nicht-linearen Fit (*one phase decay*) angepasst.

### 4.3. Nichtinvasive Bestimmung der Bluthalbwertszeit von elektrostatisch stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikel mittels UTE-Sequenz

Nachdem die Halbwertszeit für VSOP in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen bereits bestimmt war, sollte sie ebenso für die neu synthetisierten Eisenoxid-Nanopartikel ermittelt werden. Durch MRT-Messungen der Signalintensitäten im Herzen über die Zeit mit Hilfe der UTE-Sequenz (siehe 3.8.), konnte erstmals bei relativ hohen Dosierungen (500 µmol Fe/kg) die Halbwertszeit mittels eines nichtinvasiven Verfahrens bestimmt werden. Dabei wurde die T2\*-Relaxationszeit des Blutes über Variationen der TE-Zeit bestimmt und daraufhin eine Halbwertszeitbestimmung durchgeführt (siehe 3.8.). Exemplarisch zeigt Abbildung 4.4 die UTE-Messungen mit einer TE von 0,1 µs unmittelbar nach Injektion (A), nach 90 min (B) und nach 180 min (C). Unmittelbar nach Injektion verursachen die Eisenoxid-Partikel das stärkste Signal durch Verkürzung der T1-Relaxationszeit des Blutes (A). Nach und nach verringert sich mit der Zeit die Konzentration der Partikel im Blut (B), so dass der Einfluss auf die T1-Relaxationszeit und dementsprechend die Signalintensität abnimmt. Sobald die Partikel aus der Blutzirkulation geklärt sind, erzeugen die Gefäße bzw. das Herz kein nennenswertes Signal mehr (C).



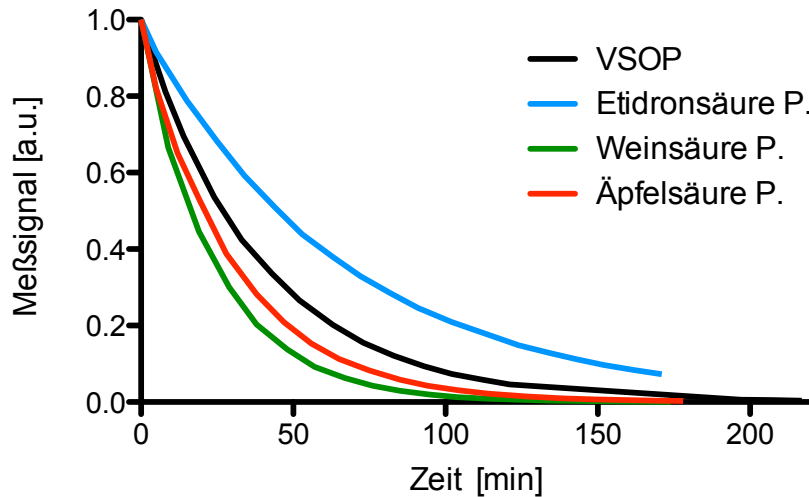
**Abbildung 4.4: Exemplarische MRT-Messungen nach Akquisition einer modifizierten UTE-Sequenz in einer ApoE<sup>-/-</sup>-Maus unmittelbar nach Injektion von 500 µmol Fe/kg VSOP (A), nach 90 min (B) und nach 180 min (C) i.v. Injektion.** Abgebildet sind ausschließlich Messungen mit einer TE-Zeit (0,1 µs). In rot sind exemplarisch Herzregionen markiert, die zur Bestimmung der Signalintensitäten des Blutes benutzt wurden, woraus nachfolgend die Halbwertszeiten ermittelt wurden. Direkt nach Injektion sind die Effekte der VSOP auf die T1-Relaxation des Blutes am stärksten (A). 90 min nach i.v.-Gabe hat das Signal im Herzen bereits stark abgenommen (B) und ist nach 180 min nicht mehr nennenswert (C).

Nach Bestimmung der T2\*-Relaxationszeiten über einen Fit konnte die Halbwertszeit von VSOP, Etidronsäure-, Weinsäure- und Äpfelsäure-Partikeln bestimmt werden (Abbildung 4.5). Etidronsäure-Partikel zeigten mit 45:26 min die längste Halbwertszeit, gefolgt von VSOP (27:23 min), von Äpfelsäure-Partikeln (20:56 min) und Weinsäure-Partikeln (16:48 min). Wie erwartet zeigten damit alle monomer beschichteten Partikel eine relativ kurze Blutzirkulationszeit. Im Vergleich mit der Halbwertszeitbestimmung der VSOP mittels MPS (4.2.) wurde per MRT eine geringere Zeit ermittelt. Generell weisen Halbwertszeitbestimmungen zwischen den Tieren eine hohe Varianz auf. Die Abweichungen der Ergebnisse der beiden Methoden liegen somit in einem akzeptablen Bereich.

Aufgrund der ermittelten Halbwertszeiten wurde die Zeitspanne zwischen Injektion und Analyse der Mäuse zu möglichen Anreicherungen in atherosklerotischen Läsionen auf 3 Stunden festgelegt. Nach dieser Zeit ist der Großteil aller 4 Partikel aus dem Blutkreislauf entfernt und lediglich ein äußerst geringer Anteil der Partikel



(<  $1/16$ ) zirkuliert noch. Für eine Anwendung der Bildgebung könnte die Untersuchungszeit noch reduziert bzw. optimiert werden, was aber nicht Gegenstand dieser Arbeit war.

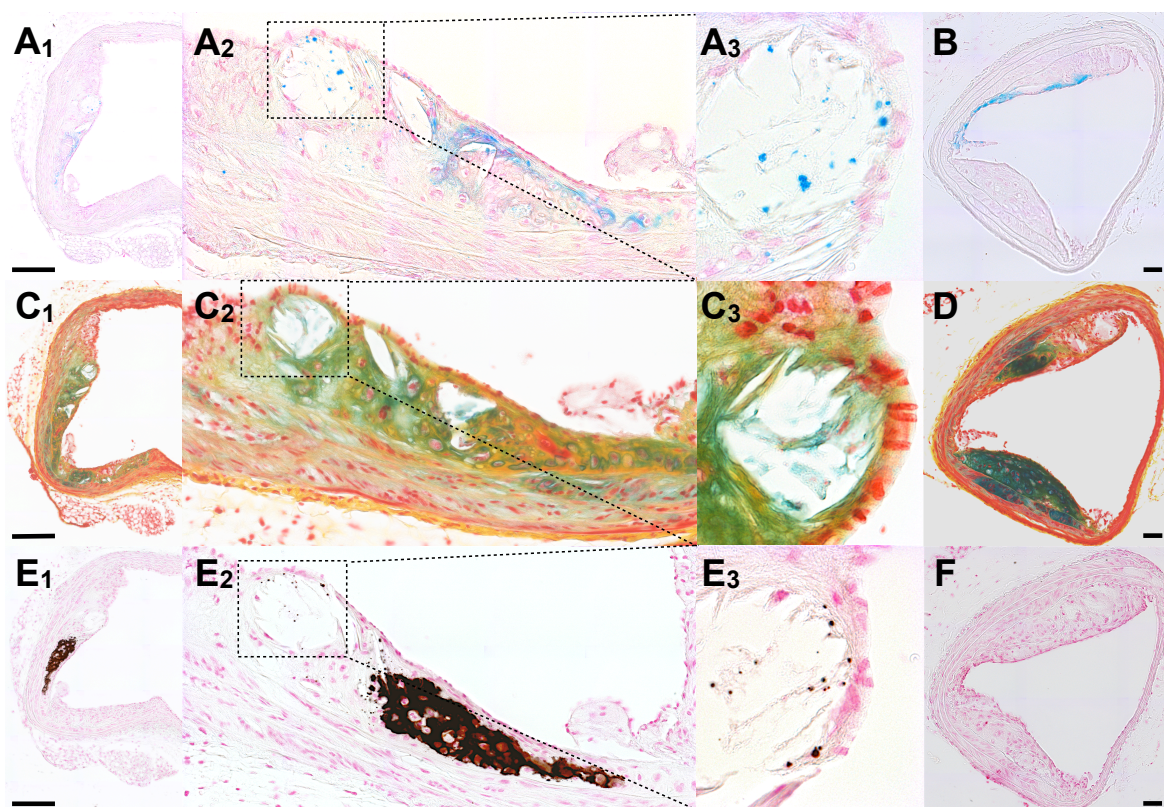


**Abbildung 4.5: Messsignal im Herzen nach i.v. Injektion von jeweils 500  $\mu\text{mol Fe/kg}$  VSOP, Etidronsäure-, Weinsäure- und Äpfelsäure-Eisenoxid-Nanopartikel in Abhängigkeit der Zeit.** Die dargestellten Messsignale bzw.  $R2^*$ -Relaxivitäten des Blutes ergeben sich aus UTE-Messungen mit variierenden Echozeiten TE und wurden über einen Fit angepasst. Aus den Messungen lassen sich die jeweiligen Halbwertszeiten der Partikel ableiten. Pro Partikel wurde jeweils eine ApoE<sup>-/-</sup>-Maus gemessen.

#### 4.4. Nachweis von VSOP mittels Berliner-Blau-Färbung in atherosklerotischen Plaques des ApoE<sup>-/-</sup>-Mausmodells

Anfänglich sollte die Anreicherung der synthetisierten Eisenoxid-Nanopartikel in atherosklerotischen Plaques des ApoE<sup>-/-</sup>-Modells histologisch durch Berliner-Blau-Färbung nachgewiesen werden (siehe 3.4.3.1.). Um Eisenoxid-Partikel innerhalb atherosklerotischer Läsionen nachzuweisen, ist dies die etablierte histologische Methode und findet in diversen Studien vielfach Anwendung (siehe 5.2.). Als Referenz für die Anreicherung sollte VSOP dienen, da diese schon in atherosklerotischen Läsionen des Kaninchenmodells primär durch Berliner-Blau-Färbung nachgewiesen werden konnten [147]. Dementsprechend wurden die Versuche zur Affinität der Plaques mit VSOP begonnen. 3 Stunden nach i.v. Injektion von 500  $\mu\text{mol Fe/kg}$  VSOP wurden die Tiere perfundiert und anschließend die Aorta mit abgehenden Gefäßen entnommen (siehe 3.3.1.). Nach der Einbettung in Paraffin (siehe 3.4.2.) wurden konsekutive Schnitte angefertigt und Berliner-Blau gefärbt

(3.4.3.1.). In gleicher Weise wurde ein Kontrolltier, d. h. eine ApoE<sup>-/-</sup>-Maus ohne VSOP-Gabe, analysiert. Innerhalb der atherosklerotischen Plaques wurden blau angefärbte, für Eisen positive Bereiche festgestellt. Die erste Kontrolle hingegen zeigte keine Eisen-Blaufärbungen innerhalb der Plaques (nicht gezeigt). Diese mutmaßlichen Ablagerungen von VSOP sollten in der Folge durch verschiedene Färbungen mit Bestandteilen des Plaques korreliert werden. Im Genaueren wurde eine modifizierte Movat-Färbung (3.4.3.2.), die das Bindegewebe bzw. die extrazellulär Matrix differenziert, sowie eine von Kossa-Färbung für den Nachweis von Hydroxylapatit durchgeführt (3.4.3.3.). Abbildung 4.6 zeigt exemplarische Berliner-Blau-Färbungen mit den beiden genannten Korrelationsfärbungen.



**Abbildung 4.6: Exemplarische Berliner-Blau-Färbung (A1-A3, B), Movat-Färbung (C1-C3, D) und von Kossa-Färbung (E1-E3, F) im Aortenbogen (A, C, E) und im Truncus brachiocephalicus (B, D, F) einer mit VSOP injizierten ApoE<sup>-/-</sup>-Maus.** Die Eisenablagerungen korrelieren mit verstärkter Kollagen-Expression (gelbe Bereiche in B), sowie mit sauren Bestandteilen der Extrazellulär-Matrix (blau-grüne Bereiche in B). Des Weiteren geht eine verstärkte Verkalkung des Plaques mit den eisen-positiven Bereichen einher. Maßstäbe: A1, C1, E1: 200 µm; B, D, F: 50 µm.

Die Bereiche der vermeintlichen Partikel-Anreicherung korrelierten in Färbungen von Parallelschnitten in der Movat-Färbung mit verschiedenen Bestandteilen des Bindegewebes (Abbildung 4.6). So werden in der Movat-Färbung Kollagene gelb,

saure bzw. sulfatierte Bestandteile der extrazellulären Matrix blau und Zellen rot angefärbt. Einerseits konnten Kollagene und saure bzw. sulfatierte Bestandteile der extrazellulären Matrix mit den eisenpositiven Bereichen korreliert werden (A-C-E). In diesen Arealen des Plaques konnte außerdem ein erhöhter Grad an gebildetem Hydroxylapatit nachgewiesen werden (E). Hydroxylapatit ist ein Kristall bestehend aus Phosphaten und Kalzium und wird im Kontext der Atherosklerose als Anzeichen der Verkalkung des Gewebes begriffen.

In anderen Färbungen (B, D, F) korrelierten die eisenpositiven Bereiche andererseits nicht mit Komponenten der Extrazellulärmatrix, sondern mit zellulären Bereichen (rot in D). Die korrespondierende von Kossa-Färbung zeigte keinerlei Hydroxylapatit im entsprechenden Parallelschnitt an gleicher Stelle (F).

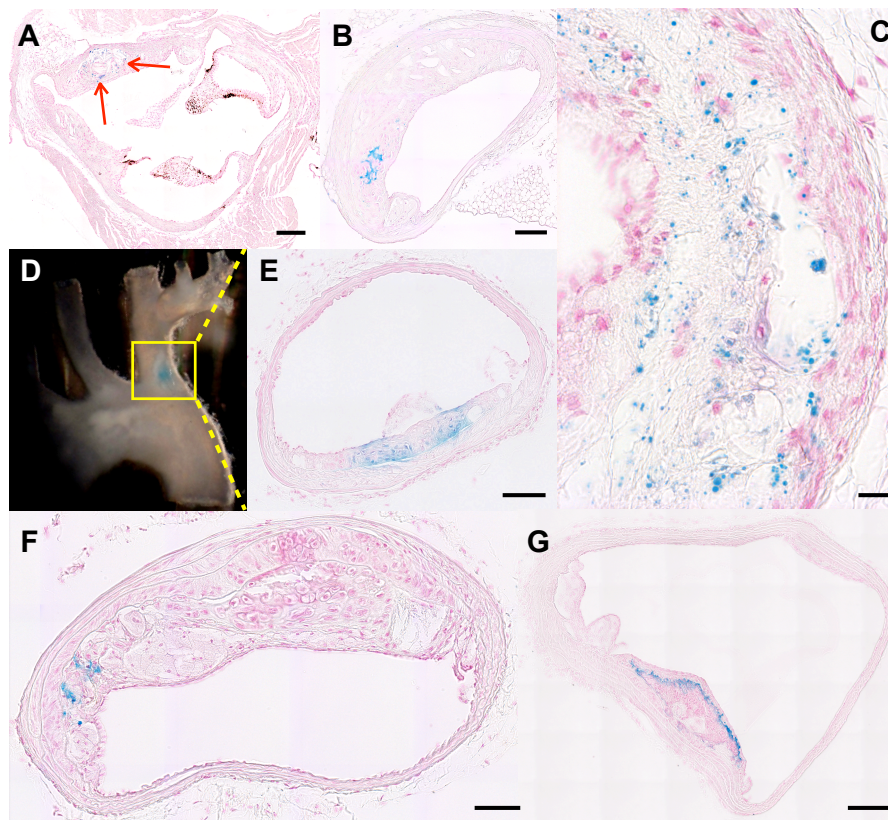
Zusammenfassend ergab sich ein divergentes Muster der Eisenanreicherung, das, wie sich später herausgestellt hat, nicht mit der Partikel-Verteilung gleichzusetzen ist (siehe 4.5.). Zum Einen korrelierten Akkumulationen von Eisen mit azellulären Bereichen und Ablagerungen von Hydroxylapatit. Zum Anderen wurde ein erhöhter Eisengehalt in zellulären Bereichen ohne Anzeichen von Verkalkung lokalisiert.

#### **4.5. Detektion von endogenem Eisen in atherosklerotischen Plaques von ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen ohne Applikation von Eisenoxid-Nanopartikeln**

Nach den ersten Ergebnissen (siehe 4.4.) wurden weitere Versuche bezüglich des histologischen Nachweises der VSOP-Anreicherung aufgearbeitet. Neben den VSOP wurden nun zusätzlich die anderen elektrostatisch beschichteten Eisenoxid-Nanopartikel appliziert, um sie in der Histologie per Berliner-Blau-Färbung nachzuweisen. Parallel wurden wie zuvor jeweils Kontrollen analysiert. In den folgenden Schnitten der Plaques konnten ähnlich wie in Abb. 4.6 eisenpositive Bereiche nachgewiesen werden. Doch nicht nur in Tieren, die post Injektion untersucht wurden, sondern auch in den ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen ohne Gabe von Eisenoxid-Nanopartikeln, d. h. in den Kontrollen wurde Eisen innerhalb der Plaques festgestellt (Abbildung 4.7). Aufgrund dieses Ergebnisses wurden zunächst weitere Tiere ohne Applikation von Eisenoxid-Nanopartikeln mittels Berliner-Blau-Färbung analysiert. Wenn auch nicht in allen Fällen, so wurden bei 9 von 11 Kontrolltieren we-



sentliche Anreicherungen an endogenem Eisen innerhalb der atherosklerotischen Plaques nachgewiesen.



**Abbildung 4.7: Atherosklerotische Plaques des ApoE<sup>-/-</sup>-Mausmodells weisen einen hohen Eisengehalt ohne Injektion von Eisenoxid-Nanopartikeln auf.** Die Berliner-Blau-Färbungen zeigen reichlich endogenes Eisen in der Aortenwurzel (A, C) und im Truncus brachiocephalicus (B, E, F, G). D zeigt ein Bild einer *in situ* gefärbten Aorta mit abgehenden Gefäßen. Bereits makroskopisch ist eine blaue Färbung im Truncus brachiocephalicus zu erkennen. Dieser Bereich wurde geschnitten und ist in E als histologischer Schnitt dargestellt. Maßstabsbalken: A: 200 µm; B, E, F, G: 100 µm; C: 20 µm.

Atherosklerotische Plaques des ApoE<sup>-/-</sup>-Mausmodells weisen vermehrt einen erhöhten Gehalt an endogenem Eisen auf (blau angefärbte Bereiche innerhalb der atherosklerotischen Plaques). Abbildung 4.7 zeigt histologische Schnitte nach Berliner-Blau-Färbung von jeweils verschiedenen ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen, denen keine Eisenoxid-Nanopartikeln injiziert wurden. Sowohl in der Aortenwurzel (A, C) als auch im Truncus brachiocephalicus (B, E, F, G) wurden jeweils eindeutig Eisenablagerungen festgestellt (blau). Das endogene Eisen wurde in verschiedenen sich wiederholenden Mustern detektiert. Überwiegend wurde Eisen in der Nähe von knorpelähnlichen Zellen (B, E) innerhalb der Läsionen lokalisiert. In geringerer Häufigkeit wurde darüber hinaus Eisen in anderen zellulären Komponenten der Plaque

erkannt (F). Weiterhin zeigte sich eine Anhäufung von Eisen in kleinen azellulären Vesikeln (A, C), welche wiederum in Bereichen vorkommen, in denen eine Nekrose bzw. Apoptose (nekrotischer Kern) der Zellen erkennbar war.

In solchen Arealen ließen sich größere Löcher bzw. zellfreie Bereiche innerhalb des Plaques und ein vermehrtes Vorkommen von extrazellulärer Matrix vorfinden. Da die Berliner-Blau-Färbung wie schon erwähnt, eine gängige Methode zum Nachweis von Eisenoxid-Nanopartikeln ist (siehe 5.2.), sollte dieses unerwartete Ergebnis näher untersucht werden. Um einen möglichen Abrieb der für die Prozessierung des Gewebes verwendeten eisenhaltigen Mikrotomklingen (S 35; Feather) ausschließen zu können, wurde wie in Abbildung 4.7 (E) gezeigt, eine Aorta mit abgehenden atherosklerotischen Gefäßen vor dem Einbetten *in situ* Berliner-Blau gefärbt (3.4.3.1.). Ohne in Kontakt mit eisenhaltigen Bestandteilen zu kommen, konnte 30 min nach der Berliner-Blau-Färbung im Bereich des Truncus brachiocephalicus eindeutige eine blaue Färbung als Indiz für endogenes Eisen demonstriert werden.

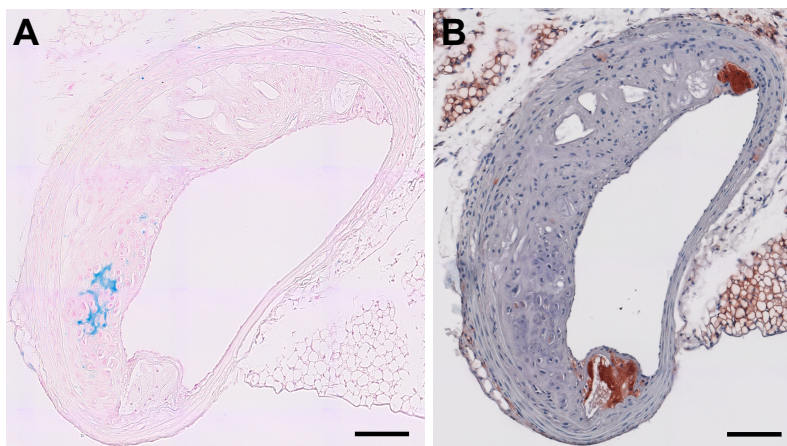
Dieser Bereich wurde anschließend in *Tissue Tek® O.C.T. Compound* eingebettet und am Kryostaten geschnitten. Abbildung 4.7 (E) zeigt einen Schnitt aus dem in D dargestellten blau gefärbten Bereich des Truncus brachiocephalicus, worauf eindeutig erkennbar ist, dass das *in situ* angefärbte Eisen innerhalb des atherosklerotischen Plaques lokalisiert ist (D).

Sobald ein Hintergrund des zu färbenden Elements im betreffenden Gewebe nachweisbar ist, kann nicht zwischen endogenem Eisen und Eisenoxid-Nanopartikeln differenziert werden. Ferner entsprechen die Bereiche der Plaques, in denen endogenes Eisen vorgefunden wurde, teilweise den schon zuvor in Abbildung 4.6 gezeigten Anfärbungen für den Nachweis der VSOP. Durch die Detektion endogenen Eisens innerhalb der Plaques, ist die Berliner-Blau-Färbung zum Nachweis von Eisenoxid-Nanopartikeln als Methode somit nicht anwendbar. In der Konsequenz sind die in 4.4. gezeigten scheinbaren Anreicherungen mit dazugehörigen Korrelationsfärbungen hinfällig. Generell scheint die Berliner-Blau-Färbung für den Nachweis von Eisenoxid-Partikeln, unabhängig davon, ob sie sterisch oder elektrostatisch stabilisiert sind, in atherosklerotischen Plaques des ApoE<sup>-/-</sup>-Mausmodells nicht geeignet zu sein.

#### 4.6. Erste Korrelationsfärbungen zu endogenem Eisen innerhalb atherosklerotischer Plaques

Das in atherosklerotischen Plaques des ApoE<sup>-/-</sup>-Mausmodell detektierte Eisen sollte näher analysiert werden. Erste Korrelationsfärbungen wurden mittels einer immunhistochemischen (siehe 3.4.4.) anti-Ferritin Färbung angefertigt (Abbildung 4.8).

Ferritine sind ubiquitäre Proteinkomplexe, die eine zentrale Rolle bei der intrazellulären Speicherung körpereigenen Eisens spielen. Sie sind aus 24 Untereinheiten zusammensetzt, die einen Hohlraum von 80 Å bzw. 8 nm bilden, in dem bis zu 4500 Fe(III)-Atome gespeichert werden können [148]. Das Eisen wird in kristalliner Form als Ferrihydrit ( $5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ), einem Eisenhydroxid in den Proteinkomplex eingelagert, wodurch Ferritine in Abhängigkeit von der Temperatur und der Eisenbeladung superparamagnetische Eigenschaften aufweisen können [149]. Da mit Eisen beladenen Ferritine somit den gleichen Effekt wie Eisenoxid-Nanopartikel in T2\*-gewichteten Sequenzen zeigen, könnte es zu Problemen bei einem Nachweis der Eisenoxid-Nanopartikel mittels MRT-Messungen führen.



**Abbildung 4.8: Exemplarische vergleichende Färbungen zur Kolokalisierung des endogenen Eisens und Ferritin innerhalb atherosklerotischer Plaques.** Das endogene Eisen (blaue Bereiche in A) korreliert nicht mit der Expression von dem eisenspeichernden Protein Ferritin (braune Bereiche in B) in atherosklerotischen Plaques aus dem Truncus brachiocephalicus. Maßstäbe: A, B: 100 µm.

Wie Abbildung 4.8 exemplarisch zeigt, konnte Ferritin innerhalb der atherosklerotischen Plaques nachgewiesen werden (braun angefärbte Bereiche in B). Die Expression von Ferritin korrelierte allerdings nicht mit der Lokalisierung des endoge-

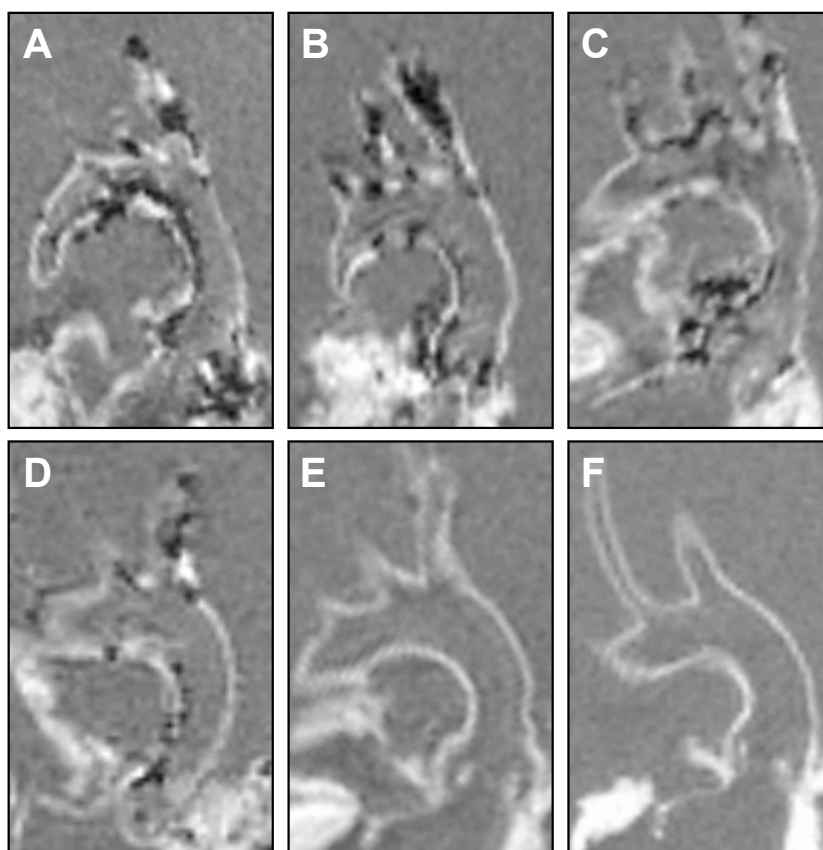
nen Eisens in einem Parallelschnitt (vergleiche A-B). Weiterhin zeigten die Zellen mit einem knorpelähnlichen Phänotyp, in deren näherer Umgebung endogenes Eisen identifiziert wurde (A), keine Expression von Ferritin. Dies lässt darauf schließen, dass das detektierte endogene Eisen innerhalb der atherosklerotischen Läsionen keine magnetischen Eigenschaften besitzt, da diese vor allem auf in Ferritin inkorporiertes Eisen zugeschrieben werden. Ein zweifelsfreier Nachweis der Eisenoxid-Nanopartikel mittels MRT war somit gewährleistet.

#### **4.7. *Ex-vivo*-MRT-Messungen zum Nachweis der Anreicherung der Eisenoxid-Nanopartikel**

Die Anreicherung der VSOP in atherosklerotischen Plaques konnte, wie in 4.5. dargelegt, zunächst nicht mit histologischen Färbungen verifiziert werden. Zur Validierung mussten alternative Methoden ausgearbeitet werden. Über magnetresonanztomographische Untersuchungen ist es möglich, Eisenoxid-Partikel zu detektieren, indem der superparamagnetische Effekt der Partikel in T2\*-gewichteten Gradientenechosequenzen wie zum Beispiel der FLASH-Sequenz genutzt wird. In solchen T2\*-gewichteten MRT-Sequenzen verursachen Eisenoxid-Nanopartikel wie VSOP über ihre magnetischen Eigenschaften, welche sich auf die T2\*-Relaxation des Gewebes auswirkt, eine Signalminderung bzw. Signalauslöschung an Orten der Anreicherung (siehe 1.6.3.). Um potentielle Partikel-Akkumulationen evaluieren und vergleichen zu können, wurden MRT-Messungen des Aortenbogens mit abgehenden Gefäßen von ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen *ex vivo* durchgeführt (3.5.2.). Die i.v. Administration von VSOP, Etidronsäure-, Weinsäure- und Äpfelsäure-Nanopartikeln verursachte eine deutliche Signalauslöschung im Bereich der typischen Prädisloktionsstellen für atherosklerotische Plaques (Abbildung 4.9 A-D). Im Einzelnen sind die negativen Verstärkungen im Bereich der Aortenwurzel, im Aortenbogen sowie in der rechten Carotis und im Truncus brachiocephalicus zu erkennen. Bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen ohne Injektion von Eisenoxid-Nanopartikeln (E), als auch bei Wildtyp-Mäusen (C57BL/6 ) nach i.v. Injektion von VSOP (F) waren dagegen keine Signaleffekte feststellbar.

Besonders der Aortenbogen der mit VSOP injizierten ApoE<sup>-/-</sup>-Maus (A) weist, erkennbar an den dunklen Bereichen, eine starke Anreicherung auf. Die Kontrollmessungen an ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen ohne Partikelinjektionen dienten zur Überprüfung

der Methode, da es während der Gewebeeinbettung in *LM*-Agarose zur Bildung von Luftblasen kommen könnte, die in der MRT-Messung ebenfalls Signalauslösungen oder Signalminderungen erzeugen würden. Um sicherzustellen, dass die Signalverluste auf die Anreicherung in atherosklerotischen Läsionen zurückzuführen sind, wurde C57/Bl6-Mäusen VSOP injiziert. Diese Wildtyp-Mäuse bilden nach herkömmlicher Diät keine atherosklerotischen Plaques aus und wurden als Kontrolle zur Überprüfung unspezifischer Anreicherungen in gesunden Gefäßwänden verwendet.



**Abbildung 4.9: Ex-vivo-MRT-Messungen (FLASH) von Aorten nach i.v. Applikation von VSOP (A), Etidronsäure- (B), Weinsäure- (C) und Äpfelsäure-Eisenoxid-Nanopartikeln (D) in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen.** Die Aufnahmen wurden 3 Stunden nach Partikelinjektion mittels FLASH-Sequenz an einem 7T-MRT gemessen. Aufgrund der Akkumulationen von Eisenoxid-Nanopartikeln in atherosklerotischen Gefäßwänden sind Signalverluste in Aortenwurzel, Aortenbogen und abgehenden Carotiden zu erkennen. Als Kontrollen wurden keine Partikel in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse (E) und VSOP in C57/Bl6-Mäuse (F) injiziert.

Die i.v. Anwendung der DMSA-Eisenoxid-Nanopartikel resultierte im Gegensatz zu den anderen elektrostatisch stabilisierten Partikeln nicht in einer Akkumulation in atherosklerotischen Prädilektionsstellen (Abbildung 4.10). Signalauslösungen



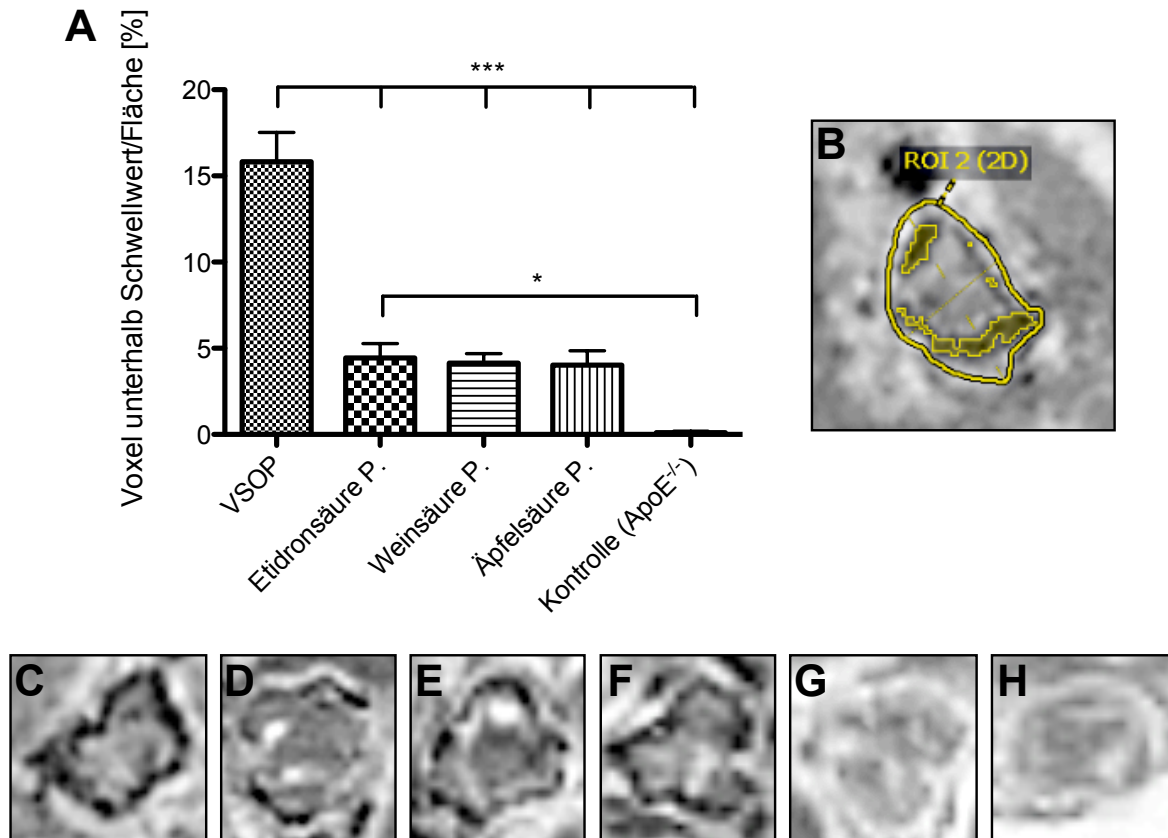
wurden hingegen im Bereich des Herzmuskels lokalisiert. Infolge dieses Ergebnisses wurden die DMSA-Eisenoxid-Nanopartikel für alle nachfolgenden Untersuchungen ausgeschlossen.



**Abbildung 4.10:** *Ex-vivo*-MRT-FLASH-Aufnahme von Herz, Aorta und abgehenden Gefäßen einer ApoE<sup>-/-</sup>-Maus nach i.v. Injektion von DMSA-Eisenoxid-Nanopartikeln. Die Signalalauslösungen sind im Bereich des Herzens lokalisiert, während weder im Aortenbogen noch in der Aortenwurzel eine Akkumulation zu erkennen ist.

#### **4.8. Semi-Quantifizierung der Eisenoxid-Nanopartikel-Akkumulation in *ex-vivo*-MRT-Messungen**

Die unter 4.7 beschriebenen qualitativ ersichtlichen Anreicherungen von VSOP, Etidronsäure-, Weinsäure-, und Äpfelsäure-Eisenoxid-Nanopartikeln wurden folgend untereinander verglichen und quantifiziert. Als Bereich wurde die Aortenwurzel gewählt, da hier einerseits kontinuierlich schon zu frühen Zeitpunkten atherosklerotische Plaques ausgebildet werden und andererseits die Wahrscheinlichkeit der Luftblasenbildung während der Einbettung des Gewebes in *LM*-Agarose aufgrund des vergleichsweise großen Durchmessers am Geringsten ist.



**Abbildung 4.11: Semi-quantitative Auswertung der Signalminderungen infolge von Nanopartikel-Anreicherungen in der Aortenwurzel von ex-vivo-MRT-Messungen.** Nach Auswertung von 5 Mäusen pro Partikel und 5 Schnitten pro Maus konnte eine Anreicherung von allen 4 unterschiedlich beschichteten Nanopartikeln im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt werden. Dabei zeigen die VSOP eine mehr als 3-fach so starke Anreicherung wie Etidron-, Wein-, und Äpfelsäure-Nanopartikel. B zeigt eine exemplarische Auswertung in der das Gefäß markiert wurde (gelbe Linie) und Voxel unterhalb des Schwellenwertes innerhalb des Gefäßes in gelben Flächen markiert sind. Einzelne Schnitte der Aortenwurzel sind exemplarisch in C-H dargestellt. Injektion von VSOP (C), Etidronsäure- (D), Weinsäure- (E), Äpfelsäure-Nanopartikeln (F) verursachen Signalauslöschungen angrenzend zur Gefäßwand, während bei der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäus ohne Partikelinjektion (G) sowie C57/Bl6 nach Gabe von VSOP (H) keine Kontrastunterschiede erkennbar sind. Mit *GraphPad Prism* wurden zunächst Unterschiede zwischen den Gruppen mit einer einfaktoriellen ANOVA ermittelt. Anschließend wurden einzelne Gruppen mit dem Tukey-Test verglichen. Statistische Signifikanz: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*,  $p \leq 0,001$ . Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben.

Die semi-quantitative Auswertung bestätigte die in 4.7. gezeigten Ergebnisse (Abbildung 4.11). Sowohl VSOP, als auch Etidronsäure-, Weinsäure-, und Äpfelsäure-Eisenoxid-Nanopartikel reichert sich in atherosklerotischen Läsionen der Aortenwurzel von ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zur Kontrolle an. Während im Fall von Etidronsäure-, Weinsäure-, und Äpfelsäure-Eisenoxid-Nanopartikeln eine Akkumulation auf gleichem Niveau zu erkennen ist, zeigte die Auswertung für VSOP eine mehr als dreifach stärkere Anreicherung. Das heißt im Verhältnis zur Fläche

der Aortenwurzel konnten für Etidronsäure-, Weinsäure- und Äpfelsäure-Eisenoxid-Nanopartikel annähernd die gleiche Anzahl an dunklen Voxel gezählt werden, während für VSOP mehr als drei mal so viele summiert werden konnten. Abbildung 4.11B zeigt exemplarisch dunkel eingefärbte Voxel, die unterhalb des festgelegten Schwellenwerts liegen, innerhalb der markierten Aortenwurzel (ROI 2). In C-H sind exemplarische Schnitte der Aortenwurzel dargestellt, anhand derer die semi-quantitative Auswertung vorgenommen wurde. Während die Kontrollen (G, H) keine Signalauslöschungen zeigen, ist bei allen ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen nach Partikelinjektion (C - F) eine Signalminderung im Bereich der Gefäßinnenwand erkennbar.

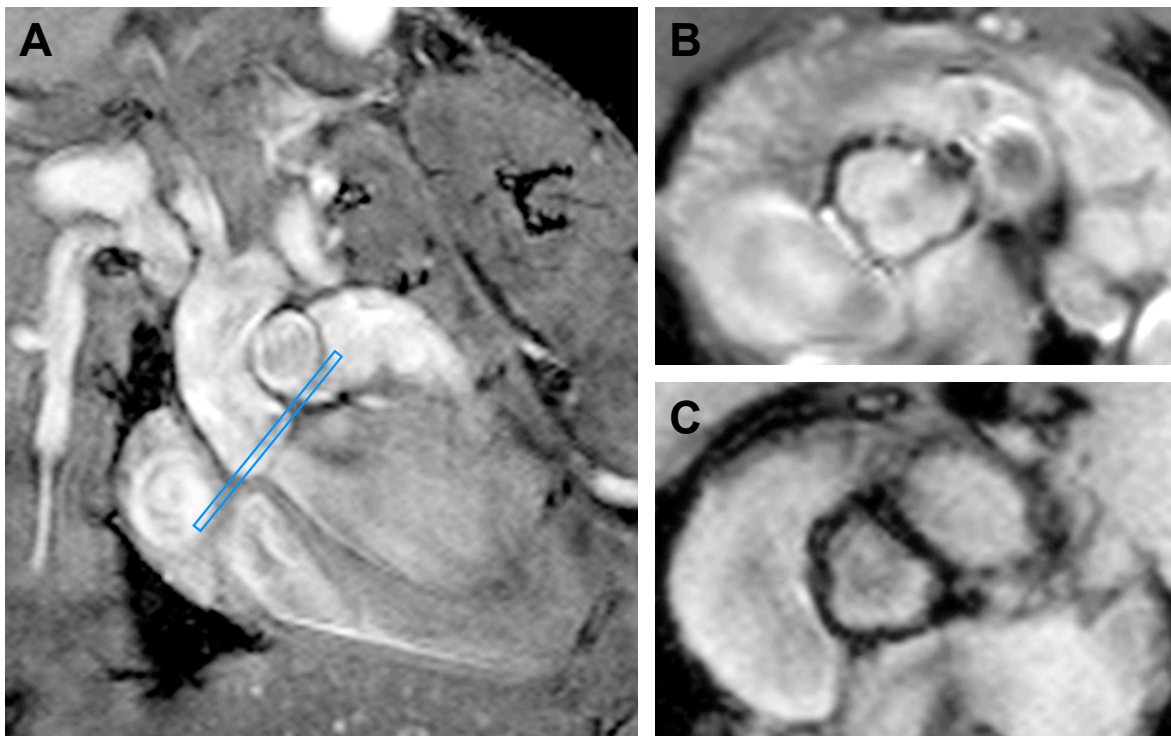
Die Auswertung der Kontrolle, die annähernd keine dunklen Voxel aufwies, bestätigte die Methode der *ex-vivo*-Messungen in Bezug auf ihre Robustheit, da die Bildung von Luftblasen offenbar vermieden werden konnte (Abbildung 4.11, G). Zudem konnte gezeigt werden, dass das innerhalb der atherosklerotischen Läsionen detektierte endogene Eisen (siehe 4.5.) keine magnetischen Eigenschaften besitzt. Die Ergebnisse der Korrelationsfärbungen zu Ferritin wurden damit bestätigt (siehe 4.6.).

Pro Gruppe wurden jeweils 5 ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse analysiert, pro Maus wurden wiederum 5 Schichten im Bereich der Aortenwurzel ausgezählt. Insgesamt wurden demnach 25 Schichten pro Nanopartikel ausgewertet, um belastbare Ergebnisse zu erhalten. Die Auswertungen ergaben signifikante Unterschiede zwischen VSOP und der Kontrolle sowie zwischen VSOP und den anderen 3 Partikeln. Die Gruppen wurden statistisch untereinander mit einer einfaktoriellen ANOVA und einem nachfolgenden Tukey-Test verglichen ( $p \leq 0,05 = *$ ;  $p \leq 0,001 = ***$ ).

#### **4.9. *In-vivo*-MRT-Messungen der VSOP-Anreicherung in atherosklerotischen Plaques des ApoE<sup>-/-</sup>-Mausmodells**

Um zu zeigen, dass sich die *ex-vivo*-Ergebnisse auch auf *in-vivo*-Bildgebung übertragen lassen, wurde basierend auf den vorrausgehenden Messungen der aussichtsreichste elektrostatisch stabilisierte Eisenoxid-Nanopartikel ausgewählt (siehe 4.8.). Die Messungen mit VSOP wurden atmungs- und EKG-getriggert durchgeführt (siehe 3.5.1.).





**Abbildung 4.12: In-vivo-MRT-Bildgebung der Aortenwurzel einer ApoE<sup>-/-</sup>-Maus vor (B) und nach (C) VSOP-Injektion.** Nach Akquisition einer CINE-Sequenz wurde eine ruhige Herzphase bestimmt, in der das Blut hell erscheint, um einen Kontrasteffekt von VSOP detektieren zu können. In diesem Zeitfenster wurde mit einer Gradientenechosequenz (FLASH) zunächst in koronarer Schnittebene gemessen (A). Anschließend erfolgten EKG-getriggerte FLASH-Messungen senkrecht zur Aorta im Bereich der Aortenwurzel (blauer Balken in A) unmittelbar vor (B) und 3 Stunden nach intravenöser VSOP-Gabe (500  $\mu\text{mol Fe/kg}$ ).

Abbildung 4.12 (A) zeigt ein exemplarisches Bild nach Akquisition einer Gradientenechosequenz (FLASH-Sequenz), in der das Herz und die Aorta mit Truncus brachiocephalicus in coronarer Ebene zu erkennen sind. Zuvor wurde mit Hilfe einer CINE-Sequenz die optimale Herzphase bestimmt, in der durch Herzbewegung oder Blutfluss verursachte Artefakte am Geringsten sind und dadurch das Blut einen hohen Kontrast liefert. Ein Kontrasteffekt der VSOP war somit gewährleistet.

Der Bereich der Aortenwurzel, der für die Kontrasteffekte (B, C) benutzt wurde, ist mit einem blauen Balken gekennzeichnet. B zeigt eine Messung nach FLASH-Sequenz in Schnittebene der Aortenwurzel (axial) vor Injektion von VSOP. Drei Stunden nach i.v. Applikation der VSOP wurde zunächst erneut über eine CINE-Sequenz die optimale Herzphase bestimmt und wieder mit einer FLASH-Sequenz senkrecht zur Aortenwurzel gemessen (C).

Im Vergleich von *pre*- und *post*-Messung (B und C) sind im Bereich der Gefäßwand der Aortenwurzel deutliche Signal minderungen bzw. Signalauslöschungen

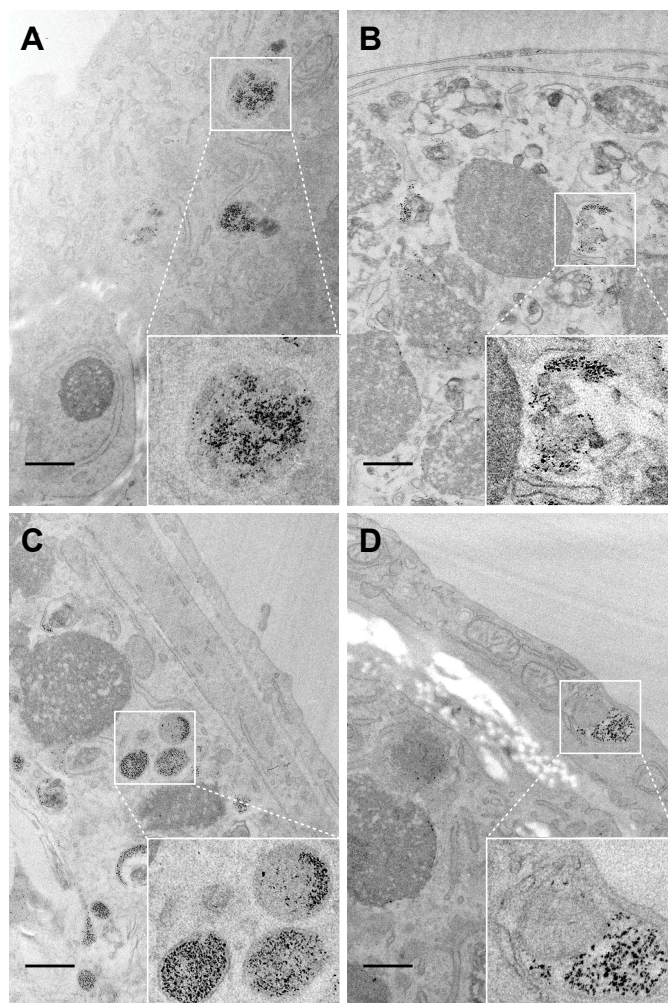
erkennbar. Da hier die atherosklerotischen Plaques in der Intima der Aortenwurzel vorzufinden sind, lässt sich der Effekt der Signalminderung auf die Wirkung der VSOP zurückführen, die in der atherosklerotischen Läsion angereichert sind.

Mit dieser *in-vivo*-Messung konnten die VSOP 3 Stunden nach Injektion erstmals in atherosklerotischen Plaques des ApoE<sup>-/-</sup>-Mausmodells nachgewiesen werden.

#### **4.10. Histologischer Nachweis von Nanopartikeln mittels TEM**

Aufgrund des in 4.5. ermittelten endogenen Eisens in atherosklerotischen Plaques in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen war ein eindeutiger histologischer Nachweis der Eisenoxid-Partikel mit der Berliner-Blau-Färbung nicht möglich. Alternativ wurden die Eisenoxid-Nanopartikel histologisch über Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) lokalisiert (Abbildung 4.13). Wie in 3.6. beschrieben, wurde das Gewebe nach i.v. Applikation von VSOP, Etidronsäure- Weinsäure- und Äpfelsäure-Nanopartikeln für die Untersuchungen mittels TEM vorbereitet. Zunächst wurden Ultradünnschnitte (70 nm) von der Leber analysiert, da ein Großteil der Partikel dort nach i.v. Injektion aufgenommen wird (siehe 1.7.3.). Wie bei der konventionellen TEM mit biologischem Gewebe üblich, wurden die Schnitte kontrastiert. Damit war es jedoch nicht möglich, Eisenoxid-Nanopartikel zweifelsfrei zu detektieren.

Daraufhin wurde mit unkontrastierten Schnitten mikroskopiert. Durch ihren Eigenkontrast im TEM konnten die Eisenoxid-Nanopartikel zunächst in der Leber identifiziert werden. Eine Schnittkontrastierung mit Schwermetallen, die bei biologischem Gewebe eine Kontrastverbesserung bewirkt, überlagerte den Eigenkontrast der Nanopartikel in einem solchen Ausmaß, dass die Nanopartikel nicht mehr erkennbar waren. Im weiteren Verlauf wurden die Gewebeschnitte von atherosklerotischen Plaques unkontrastiert analysiert.

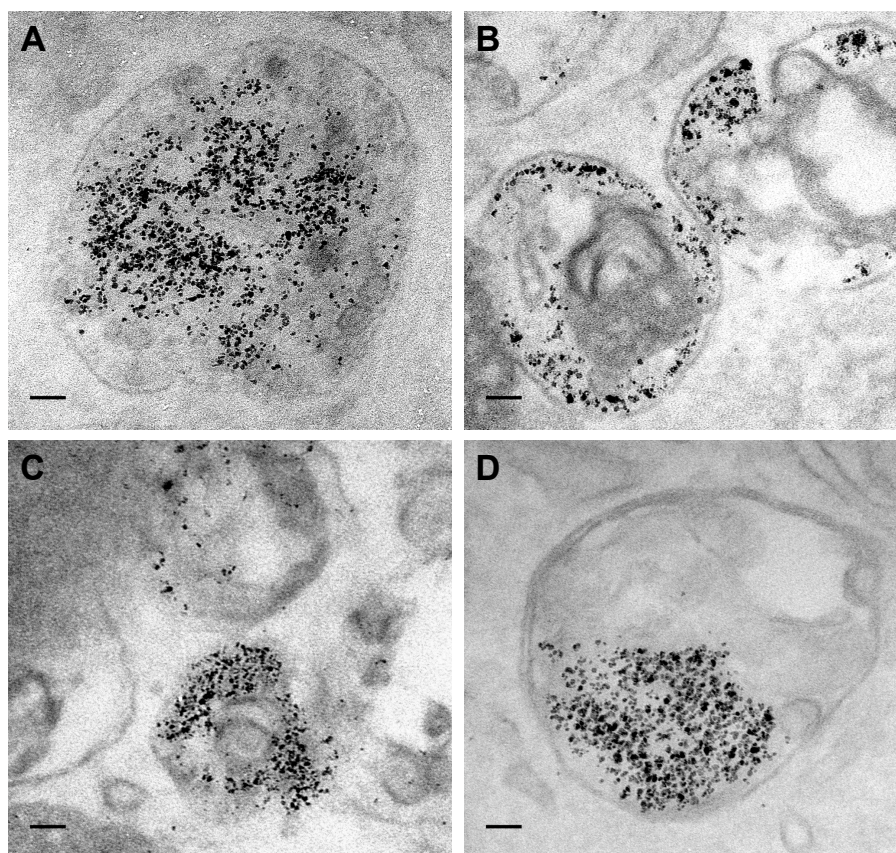


**Abbildung 4.13: Exemplarische TEM-Bilder von unkontrastierten Ultradünnschnitten der Aortenwurzel von ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen nach i.v. Injektion mit VSOP (A), Etidronsäure- (B), Weinsäure- (C) und Äpfelsäure-Eisenoxid-Nanopartikeln (D). Ansammlungen der Nanopartikel sind in Bildausschnitten in höherer Vergrößerung gezeigt. Die Nanopartikel sind überwiegend in membranumschlossenen Vesikeln lokalisiert. Maßstabsbalken: 0,5 µm.**

Alle 4 Nanopartikel konnten in den unkontrastierten Schnitten in atherosklerotischen Plaques der Aortenwurzel identifiziert werden (Abbildung 4.13). In allen 4 Fällen konnte eine lumennahe Anreicherung festgestellt werden. In tieferen Bereichen der Plaques wurden dagegen seltener Nanopartikel detektiert. Generell war es erforderlich die Nanopartikel über eine zunächst sehr hohe Auflösung eindeutig zu verifizieren und anschließend davon ausgehend mittels verminderten Vergrößerungen Aufschlüsse bezüglich ihrer Lokalisation innerhalb der Plaques zu erhalten. Erschwerend wirkte sich diesbezüglich der geringe Kontrast der Schnitte aus, da die Schnitte nicht kontrastiert werden konnten (siehe oben). Insgesamt konnte eine überwiegend zelluläre Anreicherung aller Nanopartikel nachgewiesen werden.



Aus den jeweiligen Vergrößerungen in Abbildung 4.13 ist erkennbar, dass sich die Nanopartikel größtenteils in kleinen, membranumhüllten Vesikeln wiederfinden lassen.



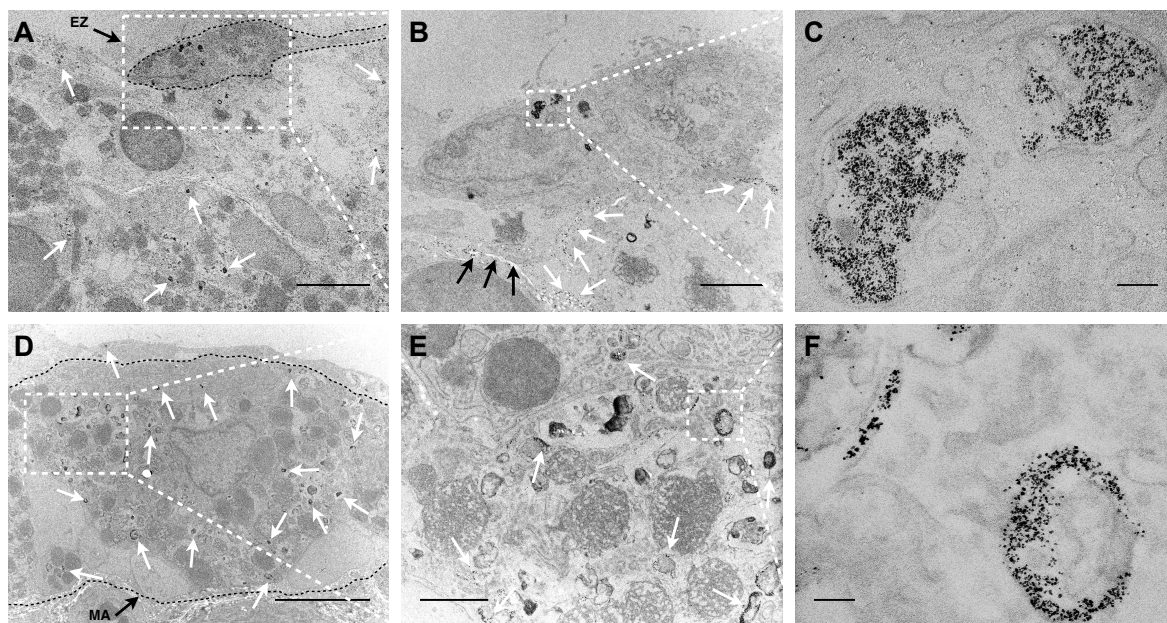
**Abbildung 4.14: Exemplarische TEM Aufnahmen von angereicherten VSOP (A), Etidronsäure- (B), Weinsäure- (C)- und Äpfelsäure- (D) Eisenoxid-Nanopartikeln innerhalb atherosklerotischer Plaques in der Aortenwurzel in höherer Vergrößerung. Die Nanopartikel sind jeweils in Phagolysosomen eingeschlossen. Maßstabsbalken: 50 nm.**

Abbildung 4.14 verdeutlicht die Akkumulation in Phagolysosomen, die intrazellulär lokalisiert sind. In der höheren Vergrößerung ist eindeutig zu erkennen, dass es sich um Eisenoxid-Nanopartikel und nicht um Artefakte handelt. Ein Vergleich mit dem Maßstabsbalken (50 nm) bestätigte die Identität der Nanopartikel.

Die Kontrolle zeigte keinerlei vergleichbare, kontrastreiche Strukturen (nicht gezeigt). Aufgrund des Nachweises aller 4 Nanopartikel innerhalb atherosklerotischer Plaques lässt sich insgesamt feststellen, dass ein eindeutiger histologischer Nachweis von Eisenoxid-Nanopartikeln mit unkontrastierten TEM-Aufnahmen durchführbar ist und zu validen Ergebnissen führt.

#### 4.10.1. Nähere Lokalisierung von VSOP in der Aortenwurzel mittels TEM

Weder der histologische Nachweis per Berliner-Blau-Färbung, noch korrelierende immunhistochemische Färbungen von Parallelschnitten zur näheren Beschreibung der Zielstrukturen der Eisenoxid-Nanopartikel, konnten angesichts des endogenen Eisens durchgeführt werden. Alternativ wurde für VSOP, die Partikel mit der stärksten Anreicherung (siehe 4.8.), eine genauere Untersuchung der Anreicherung per TEM angestrebt. Dafür wurden die VSOP zunächst in höheren Vergrößerungen innerhalb der Plaque lokalisiert, um davon ausgehend mit geringeren Vergrößerungseinstellungen die Morphologie der Zellen zu ermitteln. Wie Abbildung 4.15 zeigt, konnten die VSOP überwiegend in 2 Zelltypen lokalisiert werden.



**Abbildung 4.15: Exemplarische Anreicherung von VSOP in Endothelzellen (A-C) und Makrophagen (D-F) einer atherosklerotischen Läsion über TEM.** Akkumulationen von VSOP sind durch weiße Pfeile markiert. In A ist eine Endothelzelle mit der schwarzen unterbrochenen Linie gekennzeichnet (EZ). B zeigt den in A weiß umrandeten Bereich (eckig) und C wiederum den in B weiß markierten Abschnitt (eckig) in höherer Vergrößerung. Vereinzelt sind VSOP durch schwarze Pfeile in B gekennzeichnet. C lässt eine Identifizierung der in Phago lysosomen lokalisierten VSOP zu. In D ist ein Makrophage durch die schwarze unterbrochene Linie hervorgehoben (MA). Weiße eckig markierte Bereiche sind im Nachbarbild vergrößert. F verifiziert VSOP. Maßstabsbalken: A, D: 5  $\mu$ m; B: 2  $\mu$ m; E: 1  $\mu$ m; C, D: 100 nm.

In A ist eine pathologisch verdickte Endothelzelle sichtbar (schwarze unterbrochene Linie). Diese ist in B vergrößert und der Abschnitt, in dem VSOP akkumuliert sind, ist wiederum in C vergrößert dargestellt. Die Vergrößerungen dienen der eindeutigen Identifizierung der VSOP, was in den Aufnahmen mit geringen Vergröße-

rungen nicht möglich ist (vergleiche A und D). Aus A-C geht die Anreicherung der VSOP in Endothelzellen hervor. Diese lassen sich innerhalb der Endothelzellen in membranumhüllten Vesikeln, den Phagolysosomen auffinden (C). Abbildung B zeigt, durch weiße Pfeile markiert, die Präsenz einzelner VSOP, die weder eindeutig zellulär, noch in Phagolysosomen lokalisiert sind. In unmittelbarer Nähe zu den vereinzelt VSOP sind Kollagenfasern zu erkennen (drei schwarze Pfeile in B), was für eine Anreicherung in Bereichen der extrazellulären Matrix sprechen könnte. Bereiche vereinzelter VSOP konnten jedoch insgesamt lediglich in vereinzelt Bereichen und geringer Frequenz detektiert werden.

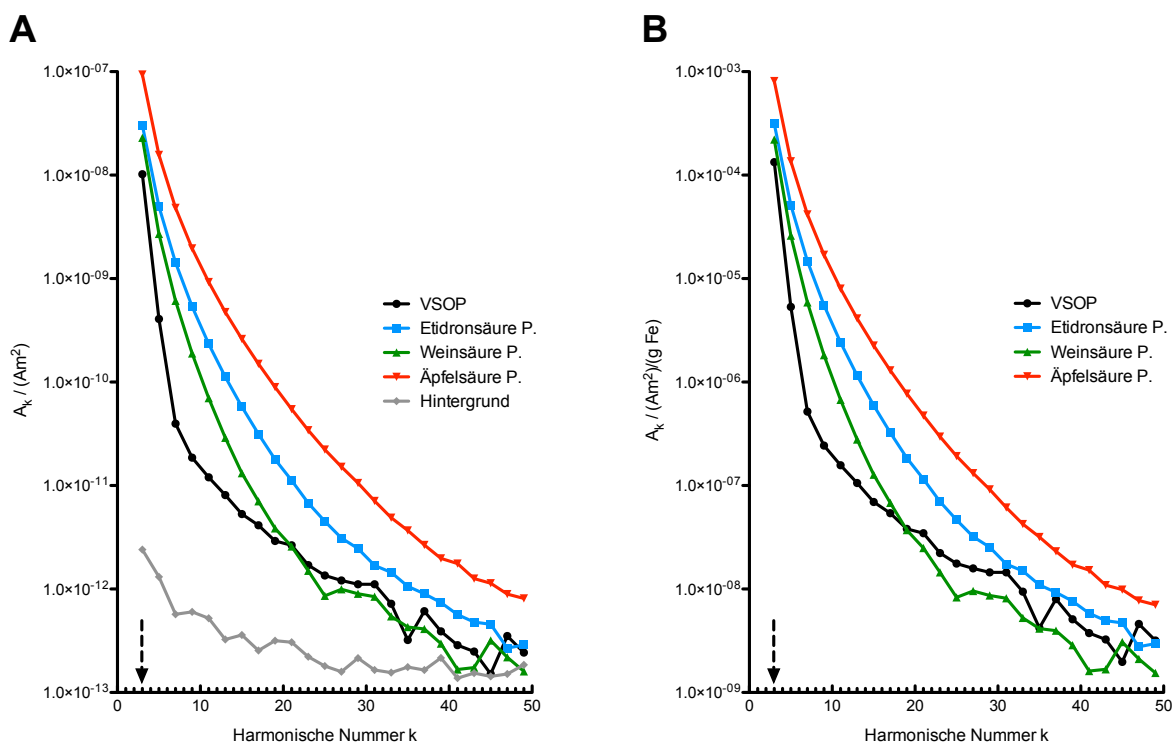
Ferner konnte eine substantielle zweite zelluläre Akkumulation in Makrophagen belegt werden, die unmittelbar unterhalb der Endothelzellen lokalisiert waren (D-F). Wie auch bei den Endothelzellen konnte eine Anreicherung von VSOP in Phagolysosomen innerhalb der Makrophagen über eine hohe Vergrößerung bestätigt werden (F).

Zusammenfassend konnte über eine Analyse der TEM-Bilder eine überwiegende zelluläre Anreicherung der VSOP in Endothelzellen und Makrophagen in lumen-nahen Arealen festgestellt werden. Nur vereinzelt wurden VSOP azellulär bzw. nicht in membranumhüllten Vesikeln detektiert. In tiefen Gebieten der Plaques, also im intimo-medialen Übergang konnten auf den analysierten Schnitten keine Partikel lokalisiert werden.

#### **4.11. Nachweis der Eisenoxid-Nanopartikel über MPS**

Über MPS-Messungen des atherosklerotischen Gewebes sollte ein weiterer Nachweis und darüber hinaus eine Quantifizierung der Partikelanreicherung erfolgen. Hierfür wurden die zuvor im MRT gemessenen Aorten inklusive abgehender Gefäße aus den *ex-vivo*-Messungen verwendet (3.7.2.), die schon über die semi-Quantifizierung miteinander verglichen worden waren. Um eine Quantifizierung zu ermöglichen, mussten zunächst die magnetischen Eigenschaften bzw. die magnetischen Momente der verschiedenen Eisenoxid-Nanopartikel durch Referenzmessungen bestimmt werden (Abbildung 4.16).





**Abbildung 4.16: Exemplarische MPS-Spektren von VSOP, Etidronsäure-, Weinsäure- und Äpfelsäure-Eisenoxid-Nanopartikeln ohne Normierung im Vergleich zum Hintergrundsignal (A) und mit Normierung zur jeweiligen Eisenkonzentration (B).** Der schwarze unterbrochene Pfeil markiert die dritte Harmonische ( $\mu_{A3}$ ), die für die Quantifizierungen in den Gefäßen genutzt wurde. Alle Nanopartikel unterscheiden sich in der Stärke des Signals im Vergleich zur Hintergrundmessung (Luft) um mehr als drei Größenordnungen. Äpfelsäure-Partikel zeigen die höchsten magnetischen Momente, gefolgt von Etidron-, Weinsäure-Partikeln und VSOP.

Das MPS-Signal nimmt mit zunehmenden harmonischen Frequenzen ab und nähert sich im Fall der elektrostatisch stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikel dem Hintergrundsignal an (Abb. 4.16). Für die Quantifizierung wurde daher jeweils die Intensität der 3. Harmonischen ( $\mu_{A3}$ ) des MPS-Frequenzspektrums verwendet (mit schwarzem Pfeil in Abb. 4.16 markiert), da sie den höchsten Amplitudenwert aufweist und daher am verlässlichsten ist. Der erste Messwert wurde angesichts von Störsignalen, die bspw. durch den Filter des MPS-Geräts verursacht werden können und das Messergebnis verfälschen können, nicht berücksichtigt. Obwohl die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Eisenoxid-Nanopartikel aufgrund ihrer geringen Größe im Vergleich mit anderen Eisenoxid-Partikeln generell relativ schwache magnetische Momente aufweisen, ist eine deutliche Abgrenzung zum Hintergrundsignal der 3. Harmonischen ( $\mu_{A3}$ ) in Abb. 4.16 A nachweisbar. Die MPS-Intensitäten der verschiedenen Partikel weichen teilweise stark voneinander ab. So besitzen VSOP vergleichsweise die geringsten und Äpfelsäure-Nanopartikel die

stärksten Signalintensitäten, während Etidron-, und Weinsäure-Eisenoxid-Nanopartikel Signalintensitäten in einem ähnlichen Bereich aufweisen, der wiederum leicht über dem der VSOP liegt (Abb. 4.16 B; Tabelle 4.4).

Die Partikel-Suspensionen wurden jeweils im wässrigen Zustand und anschließend nach Immobilisierung (siehe 3.7.) gemessen. Dies erfolgte zur Überprüfung der Messwerte, da die Möglichkeit besteht, dass eine eingeschränkte Beweglichkeit der Eisenoxid-Nanopartikel das MPS-Signalverhalten beeinflusst. Inwiefern die in atherosklerotischen Läsionen lokalisierten Eisenoxid-Nanopartikel frei beweglich oder weitgehend immobilisiert vorliegen, ist nicht bekannt. Bei großen Differenzen zwischen den Signalintensitäten in wässrigem bzw. immobilisiertem Zustand würde die Quantifizierung der Anreicherungen beeinträchtigt werden, da über die Referenzmessungen der einzelnen Eisenoxid-Nanopartikel, welche in flüssiger Suspension vorliegen die Normierung der später gemessenen Signale hinsichtlich der magnetischen Momente des atherosklerotischen Gewebes erfolgte. Tabelle 4.4 fasst die Ergebnisse dieser Messungen zusammen.

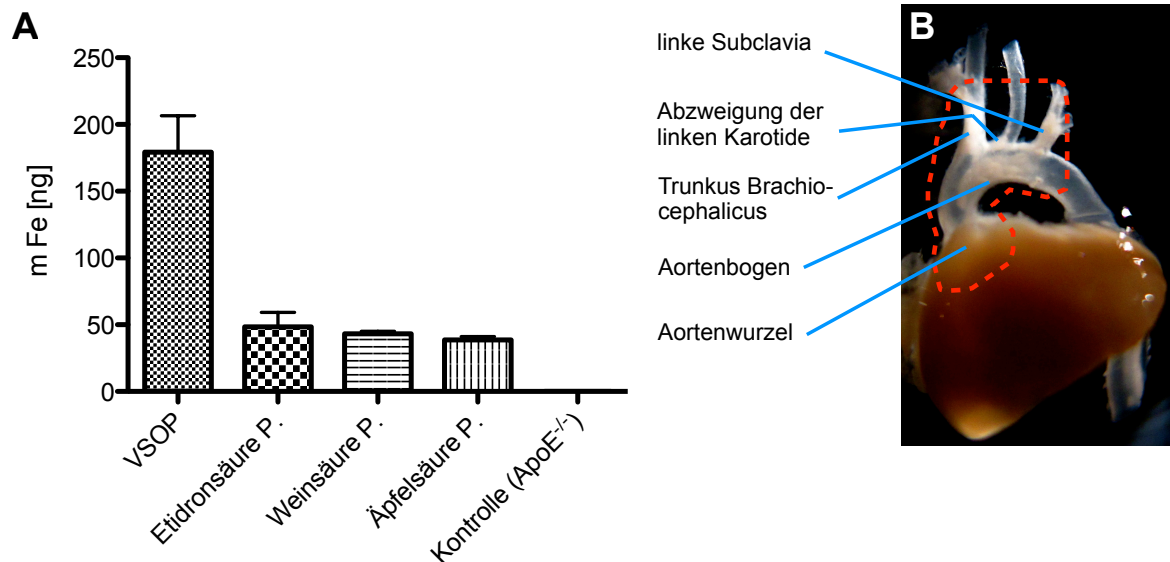
**Tabelle 4.4: Exemplarische Ergebnisse der über MPS-Messungen bestimmten magnetischen Momente für die verschiedenen Eisenoxid-Nanopartikel in flüssigem und immobilisiertem Zustand.** Die Intensitäten der Harmonischen wurden auf die Masse des Eisens bezogen. Für die aufs Eisen bezogenen Werte sind prozentuale Differenzen zwischen dem flüssigen und immobilisiertem Zustand angegeben. Die Werte beziehen sich jeweils auf die Intensitäten der 3. Harmonischen ( $A_3$ ) des MPS-Spektrums.

Nanopartikel	Magnetisches Moment $A_3$ [ $A \cdot m^2$ ]		$A_3$ / m Fe [ $A \cdot m^2/g$ Fe]		$\Delta$ [%] flüssig - immobilisiert
	flüssig	immobilisiert	flüssig	immobilisiert	
VSOP	$1,02 \cdot 10^{-08}$	$1,02 \cdot 10^{-08}$	$1,33 \cdot 10^{-4}$	$1,33 \cdot 10^{-4}$	0
Etidronsäure- Partikel	$3,04 \cdot 10^{-08}$	$2,94 \cdot 10^{-08}$	$3,14 \cdot 10^{-4}$	$3,30 \cdot 10^{-4}$	-3,5
Weinsäure- Partikel	$2,29 \cdot 10^{-08}$	$2,37 \cdot 10^{-08}$	$2,21 \cdot 10^{-4}$	$2,29 \cdot 10^{-4}$	+3,3
Äpfelsäure- Partikel	$9,39 \cdot 10^{-08}$	$9,37 \cdot 10^{-08}$	$8,13 \cdot 10^{-4}$	$8,11 \cdot 10^{-4}$	0,2



---

Die magnetischen Eigenschaften bzw. Momente der Partikel sind von der Größe, Zusammensetzung des Kristalls (Größe des Eisen(II)-Anteils) sowie von der Beschichtung der Partikel abhängig. Je größer der Partikelkern, desto größer ist auch das magnetische Moment, über welches Partikel verfügen. Schon kleine Abweichungen können hinsichtlich der magnetischen Eigenschaften einen enormen Unterschied ausmachen. Die vergleichsweise geringen magnetischen Momente der VSOP sind somit wahrscheinlich partiell auf ihre geringere Größe (siehe 4.1.2.) zurückzuführen. Die Äpfelsäure-Partikel weisen dagegen eine ähnliche hydrodynamische Größe wie Etidronsäure- und Weinsäure-Partikel auf, besitzen dennoch größere magnetische Momente. Dies ist mutmaßlich auf die Kristallzusammensetzung der Eisenoxid-Kerne zurückzuführen. Die Eisenoxid-Kerne variieren auch nach gleichen Synthesebedingungen bezüglich ihrer Eisen(II)- und Eisen(III)-Anteile. Diese sind wiederum maßgeblich für die jeweiligen relaxometrischen bzw. magnetischen Eigenschaften. Da die unterschiedlichen magnetischen Eigenschaften der verschiedenen Partikel in der Auswertung durch eine Normierung auf die in Tabelle 4.4 dargestellten Referenzmessungen berücksichtigt werden, ist eine Quantifizierung der Anreicherungen über die MPS-Messungen gewährleistet. Ferner lagen die Abweichungen zwischen wässrigem und immobilisiertem Zustand in einem minimalen Bereich von wenigen Prozenten.



**Abbildung 4.17: Quantifizierung der Nanopartikel-Anreicherung im Gefäßbereich des Aortenbogens nach i.v. Injektion der 4 elektrostatisch stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikel und Kontrollen ohne Partikelgabe über MPS-Messungen.** Über die Referenzmessungen der Partikel konnte die Eisenmenge in den Plaques ermittelt werden. Im Vergleich zur Kontrolle (ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse ohne Partikel-Applikation) konnte eine Akkumulation aller 4 Nanopartikel verifiziert werden. VSOP zeigt eine mehr als 3-fach so hohe Anreicherung im Vergleich mit den anderen 3 Partikeln. In B ist der für die MPS-Messungen zugrunde liegende Bereich mit atherosklerotischen Plaques dargestellt (unterbrochene Linie). Pro Gruppe wurden 3 ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse (n = 3) analysiert.

Nach der Analyse von 3 Tieren pro Gruppe konnten alle 4 applizierten Eisenoxid-Nanopartikel im Aortenbogen der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse nachgewiesen werden, wohingegen die Kontrolle keine magnetischen Eigenschaften zeigte (Abbildung 4.17). Im Vergleich zur Kontrolle, bei der das MPS-Signal dem Hintergrundsignal entsprach, lieferten die Messungen des atherosklerotischen Gewebes MPS-Signale, die über einer sicheren Nachweisgrenze lagen. Dieser Schwellenwert wurde für jeden Partikel separat aus dem Wert der Hintergrundsignale (Luft) und dem 2-fachen Wert der Standardabweichung berechnet und auf das jeweilige Signal der Referenzmessungen bezogen (Tabelle 4.5). Aus der Tabelle 4.5 ist ersichtlich, dass die Durchschnittswerte der gemessenen MPS-Signale jeweils oberhalb der berechneten Nachweisgrenzen der jeweiligen Nanopartikel lagen und die Messergebnisse somit zu aussagekräftigen Ergebnissen geführt haben.

**Tabelle 4.5:** Aus den MPS-Signalstärken der Partikelmessungen (Referenzmessungen) berechnete Nachweisgrenzen der einzelnen, elektrostatisch stabilisierten Nanopartikel, die über MPS-Messungen bestimmten Durchschnittswerte der Eisenmassen in den atherosklerotischen Geweben und deren Standardabweichungen ( $\sigma$ ).

Nanopartikel	berechnete Nachweisgrenze [ng]	Fe [ng] in Plaques [Ø]	$\sigma$ von Fe in Plaques [Ø]
VSOP	50,2	179,3	47,1
Etidronsäure-Partikel	21,2	48,4	18,9
Weinsäure-Partikel	30,3	43,3	2,9
Äpfelsäure-Partikel	8,2	38,7	4,2

Da ein schwaches Signal im Vergleich zu einem stärkeren eine höhere Unsicherheit besitzt, ist die berechnete Nachweisgrenze für die VSOP am Größten (50,2 ng) und umgekehrt aufgrund ihres starken magnetischen Signals im Fall der Äpfelsäure-Eisenoxid-Nanopartikel am Geringsten (8,2 ng). Die Nachweisgrenze ist demnach abhängig von der partikelspezifischen Stärke des MPS-Signals (3. Harmonische). Die MPS-Messungen des atherosklerotischen Gewebes ergaben für Etidronsäure-, Weinsäure-, und Äpfelsäure-Eisenoxid-Nanopartikel einen ähnlichen Wert im Bereich von 40 ng Fe (Abbildung 4.17; Tabelle 4.5). Für VSOP hingegen wurde mit 179 ng Fe ein mehr als 3-fach höherer Wert bestimmt. Dies korreliert mit den semi-Quantifizierungen aus den *ex-vivo*-MRT-Messungen (siehe 4.8.). Im Unterschied dazu wurde bei den MPS-Messungen die Gesamtheit von atherosklerotischen Läsionen im untersuchten Gefäßbaum gemessen (siehe Abbildung 4.17 B), da die Fe-Bestimmungen aufgrund des schwachen Signals ansonsten unterhalb der Nachweisgrenze gelegen hätten. Nachdem also auf der einen Seite ein bestimmter Abschnitt (Aortenwurzel bei den *ex-vivo*-Messungen) und auf der anderen Seite eine Summe von Plaques analysiert wurden, konnte nach Auswertung beider Methoden eine ungefähr 3-fach höhere Anreicherung für die VSOP im Vergleich mit den anderen 3 elektrostatisch stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikeln verifiziert werden.

Die Magnetische-Partikel-Spektrometrie wurde im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal in Bezug auf den Nachweis bzw. die Quantifizierung von Eisenoxid-Nanopartikeln innerhalb atherosklerotischer Plaques erfolgreich angewendet.

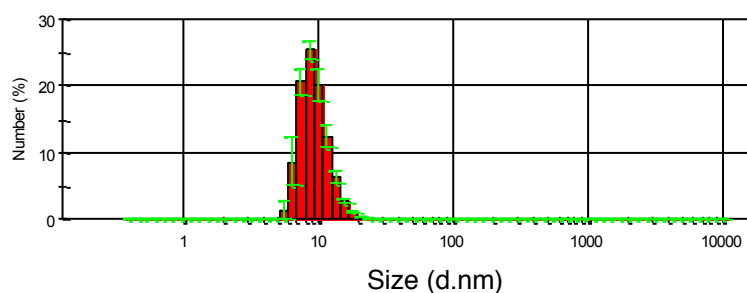
## 4.12. Ergebnisse der LA-ICP-MS an Gewebeschnitten

Für die histologischen Analysen mittels LA-ICP-MS wurden VSOP unter Verwendung von Europium(III)-chlorid synthetisiert, wie unter 3.1. beschrieben. Da Europium in biologischen Systemen nicht vorkommt, sollte es als zur Identifikation der VSOP in histologischen Schnitten genutzt werden. Die Eu-VSOP wurden hinsichtlich ihrer Größe und der relaxometrischen Eigenschaften wie unter 3.2.1. bzw. 3.2.3. beschrieben analysiert (Tabelle 4.6).

**Tabelle 4.6: Charakterisierung von Eu-VSOP hinsichtlich hydrodynamischer Größe und relaxometrischen Eigenschaften**

	hydrodynamischer Durchmesser [nm]	T1-Relaxivität [ $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	T2-Relaxivität [ $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	T2/T1
Eu-VSOP	7,5-11,7	23	57	2,5

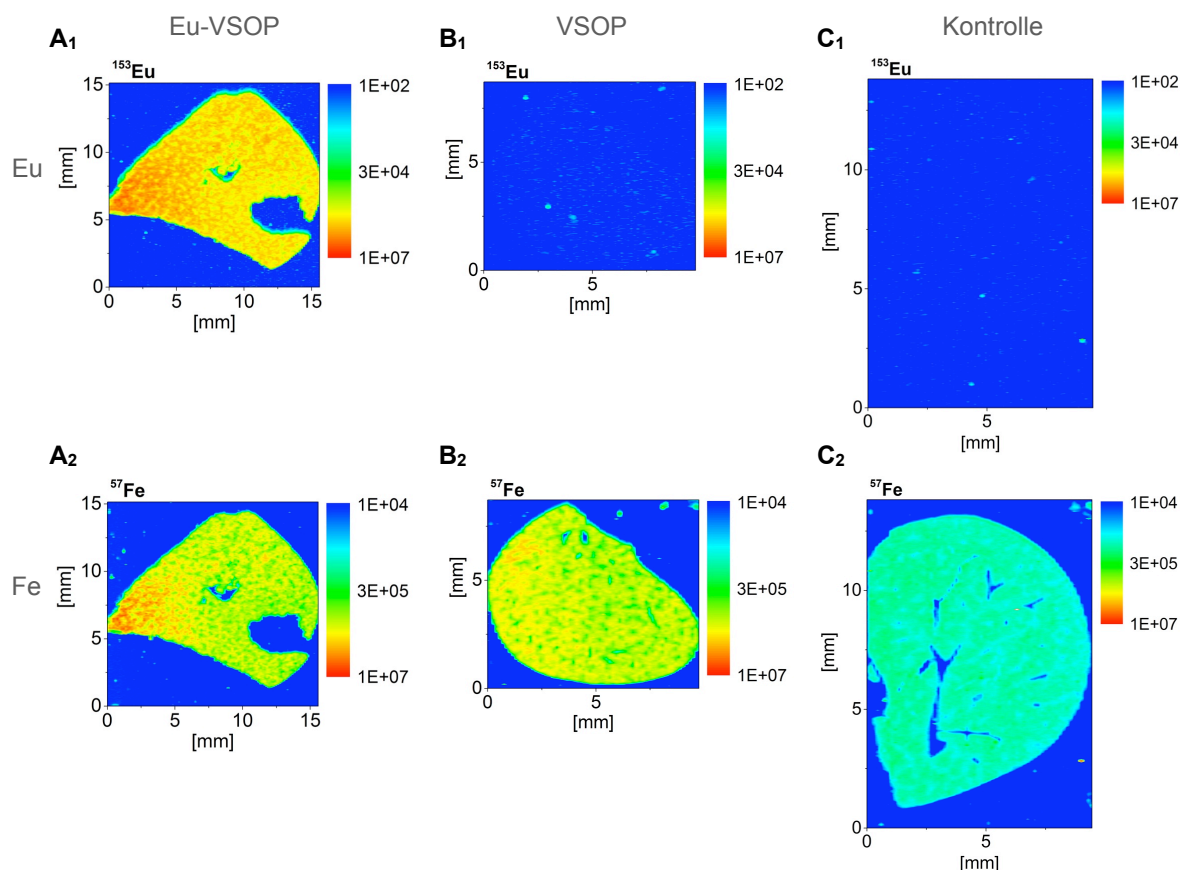
Die Eu-VSOP besitzen insgesamt eine mit den etablierten VSOP vergleichbare Größe, (siehe 4.1.2.), die im Rahmen der sich aus den verschiedenen Synthesen ergebenden Abweichungen liegt. Weiterhin konnten Aggregationen in höheren Größenbereichen ebenfalls ausgeschlossen werden (Abbildung 4.18), so dass die Eu-VSOP für *in-vivo*-Versuche anwendbar waren. Die T1- und T2-Relaxivitäten sind ebenfalls mit VSOP ohne Europium vergleichbar.



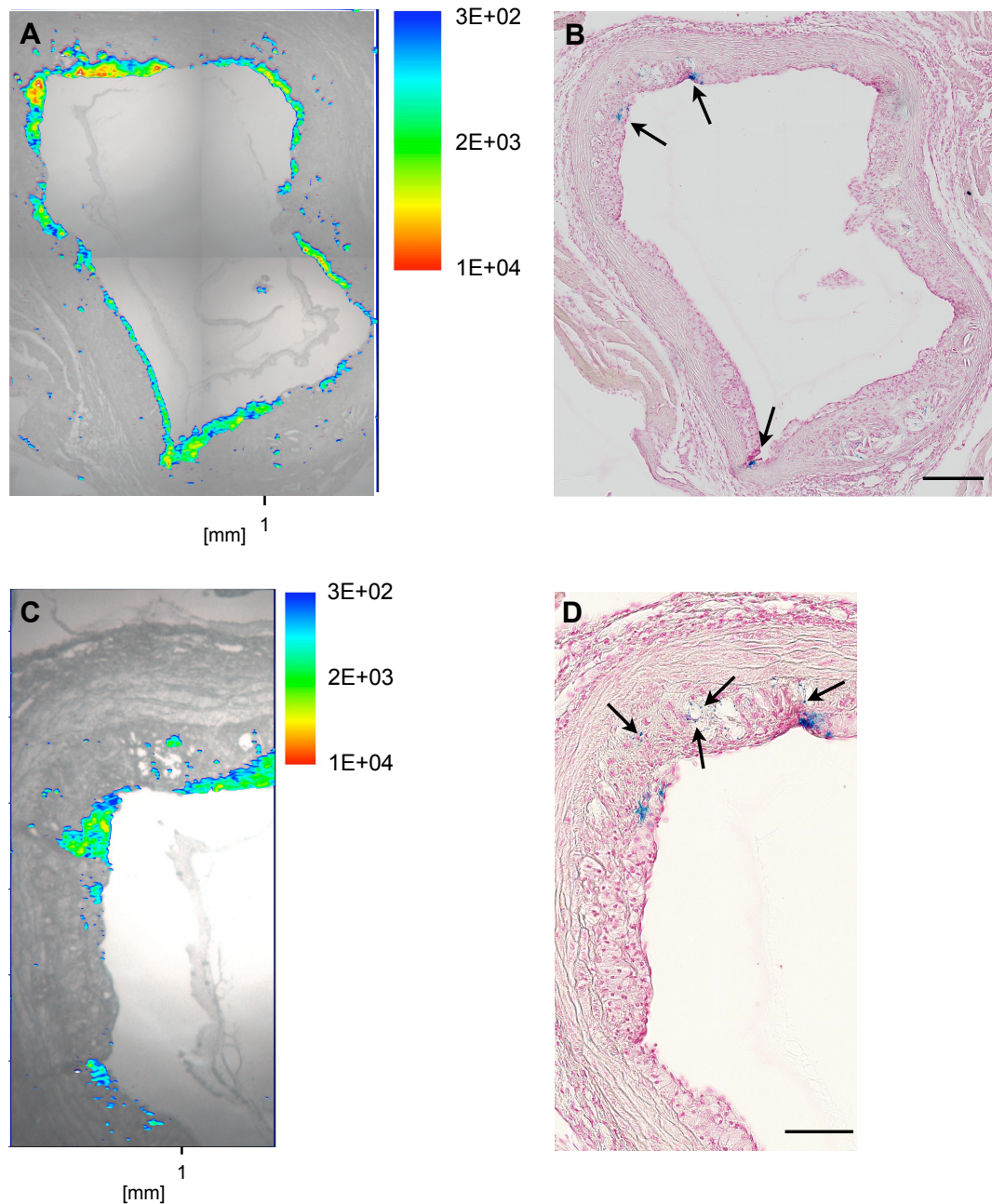
**Abbildung 4.18: Hydrodynamische Größe von Eu-VSOP.** Die Eu-VSOP weisen ein vergleichbares Größenprofil wie VSOP ohne Europium auf und zeigen keine Aggregationen in höheren Größenbereichen.

Wie bei allen Untersuchungen zur Anreicherung der Nanopartikel wurden 500  $\mu\text{mol Fe/kg}$  injiziert und die ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse 3 Stunden nach i.v. Gabe perfundiert. Um die Methode mit der LA-ICP-MSA und den mit Europium-dotierten VSOP zu etablieren, wurden zunächst die Lebern von Eu-VSOP und VSOP injizierten

ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen sowie Kontrollen (ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse ohne Partikelinjektion) gemessen. Wie Abbildung 4.19 zeigt, wurde Europium (<sup>153</sup>Eu) lediglich in der Leber des mit Eu-VSOP injizierten Tieres in relevanten Mengen detektiert, während die Leber nach VSOP-Gabe sowie die Kontrollleber kein bzw. ein um mehrere Größenordnungen geringeres Eu-Signal zeigten. Dagegen wurde Eisen (<sup>57</sup>Fe) nach VSOP, wie auch nach Eu-VSOP Applikation in der gesamten Leber mit einer vergleichbaren Intensitätsverteilung lokalisiert. Die Analyse der verschiedenen Lebern zeigten verlässliche Europium-Signale (Eu-VSOP) mittels LA-ICP-MS und eine sichere Differenzierung zu VSOP ohne Zusatz von Europium. Somit konnte im nächsten Schritt eine Analyse von atherosklerotischen Läsionen mit der LA-ICP-MS zum histologischen Nachweis von Eu-VSOP über die Messung der Europiumintensitäten versucht werden.



**Abbildung 4.19: Ergebnisse der LA-ICP-MS der <sup>153</sup>Eu und <sup>57</sup>Fe Intensitäts-Verteilung in Leberschnitten von ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen nach i.v. Injektion von 500 µmol Fe/kg Eu-VSOP (A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>), VSOP (B<sub>1</sub>-B<sub>2</sub>) und ohne Partikelgabe (C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>).** Europium konnte lediglich in signifikanten Mengen nach Injektion von Eu-VSOP detektiert werden (A<sub>1</sub>). Nach Applikation von VSOP und Eu-VSOP ist eine höhere Intensität an Eisen in der Leber im Vergleich zur Kontrolle nachweisbar. Es wurde mit einer Laser-Spotgröße von 150 µm, einer Überlappung von 25 µm und einer Geschwindigkeit von 150 µm/sek gemessen.



**Abbildung 4.20: Überlagerung von Hellfeld-Mikroskopiebild und LA-ICP-MS-Ergebnissen der  $^{157}\text{Eu}$ -Intensitätsverteilung von Schnitten atherosklerotischer Plaques nach i.v. Injektion von  $500 \mu\text{mol Fe/kg Eu-VSOP}$  (A, C) und Vergleich mit Berliner-Blau-Färbung (B, D). Der Vergleich zeigt eine höhere Sensitivität der LA-ICP-MS gegenüber der Eisen-Färbung. In A ist eine breite Anreicherung der Eu-VSOP in nahezu allen lumennahen Arealen der atherosklerotischen Läsion über die  $^{157}\text{Eu}$ -Verteilung ersichtlich, während die korrespondierende Berliner-Blau-Färbung lediglich einige wenige eisenpositive Bereiche offenbart (in B mit Pfeilen markiert). Zudem konnte in einer weiteren Messung mit höherer Auflösung eine punktförmige Akkumulation der Eu-VSOP nachgewiesen werden (C), die mit eisenpositiven vesikulären Strukturen in der Berliner-Blau-Färbung korreliert (Pfeile in D). Es wurde mit einer Laser-Spotgröße von  $15 \mu\text{m}$  (A) bzw.  $8 \mu\text{m}$  (C), einer Überlappung von  $5 \mu\text{m}$  (A) bzw.  $2 \mu\text{m}$  (C) und einer Geschwindigkeit von  $15 \mu\text{m/sek}$  (A) bzw.  $8 \mu\text{m/sek}$  gemessen. Maßstabsbalken: B:  $200 \mu\text{m}$ ; D:  $100 \mu\text{m}$ .**

Mittels LA-ICP-MS konnten die Eu-VSOP über das Europium innerhalb atherosklerotischer Plaques nachgewiesen werden (Abbildung 4.20 A, C). Die Europiumsignale korrelierten dabei mit dem Eisensignal (B, D). Eine Detektion der Eu-VSOP über das Europium mit der LA-ICP-MS offenbarte eine wesentlich höhere Sensitivität im Vergleich zur Berliner-Blau-Färbung (Abbildung 4.20) und eine Spezifität, die bei der Berliner-Blau-Färbung nicht gegeben ist. Während in der Berliner-Blau-Färbung lediglich einzelne Areale mit lokalen Eisenablagerungen zu erkennen waren (siehe Pfeile in C, D), zeigte Abbildung A/C eine Anreicherung der Eu-VSOP in fast allen Bereichen der Plaque entlang des Lumen.

Einzelne Bereiche wurden mit höherer Auflösung erneut untersucht (C). Die erhöhte Empfindlichkeit des Eu-VSOP Nachweises über die LA-ICP-MS im Vergleich zur Berliner-Blau-Färbung bestätigte sich hier erneut. Während im mit dem Mikroskopiebild überlagerten LA-<sup>153</sup>Eu Intensitätsprofil, Eu-VSOP über die Eu-Intensitäten großflächig innerhalb der Plaques detektiert werden konnten, wurden in der vergleichenden Berliner-Blau-Färbung lediglich kleinere Flächen blau angefärbt. Des Weiteren weisen auch einzelne kleine Spots Europiumsignale auf, die ebenso in der Berliner-Blau-Färbung wiedergefunden werden konnten. Angesichts der in 4.5. gezeigten Ergebnisse, in denen endogenes Eisen mittels Berliner-Blau-Färbung innerhalb der atherosklerotischen Plaques mit sich wiederholendem Muster in Form von eisenhaltigen Vesikeln detektiert wurde, musste eine Anreicherung von Eisenoxid-Nanopartikeln ausschließlich auf Basis der Berliner-Blau-Färbung stark in Frage gestellt werden. Insgesamt korrelierten die Anreicherungsmuster im Vergleich zwischen LA-ICP-MS und Berliner-Blau-Färbung und zeigten, dass in den untersuchten Schnitten die eisenpositiven Bereiche auch auf VSOP und nicht ausschließlich auf endogenes Eisen zurückzuführen sind (vergleiche 4.5.).

Weitere Analysen und Vergleiche zwischen den beiden Methoden LA-ICP-MS und Berliner-Blau-Färbung sind notwendig, um die Anreicherung besonders in vesikulären Strukturen näher zu untersuchen. Zudem ist aufgrund der in 4.5. (siehe auch Abbildung 4.7) gezeigten Ergebnisse ein unzweideutiger histologischer Nachweis der Eisenoxid-Nanopartikel mit anderen Methoden wie LA-ICP-MS und TEM (siehe 4.10.) unabdingbar. Schnitte von Kontrollen in denen endogenes Eisen in einem beschriebenen Muster nach Berliner-Blau-Färbung zu erkennen war, wurden bisher im Rahmen der Dissertation noch nicht untersucht. Die LA-ICP-MS stellt in Verbindung mit Europium-dotierten Eisenoxid-Nanopartikeln eine wertvolle Metho-



de für den spezifischen Nachweis der Anreicherung in histologischen Schnitten von atherosklerotischen Plaques dar.



## 5. Diskussion

---

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, zunächst verschiedene elektrostatisch stabilisierte Eisenoxid-Nanopartikel zu synthetisieren und diese daraufhin auf eine mögliche Anreicherung in atherosklerotischen Plaques im ApoE<sup>-/-</sup>-Mausmodell zu untersuchen.

### 5.1. Synthese elektrostatisch stabilisierter Eisenoxid-Nanopartikel

Magnetische Eisenoxid-Nanopartikel besitzen in Abwesenheit von Oberflächenbeschichtungen bei neutralem pH eine hohe Tendenz zur Aggregation. Die Triebkraft resultiert aus der Minimierung der großen Oberflächenenergien, die sich aus dem großen Oberfläche-zu-Volumen Verhältnis ergeben [150]. Um das Ausfallen der Nanopartikel-Suspension infolge von anziehenden Van-der-Waals-Kräften zu verhindern, ist eine Modifizierung der Oberflächen bzw. eine Beschichtung der Partikel zur Stabilisierung unerlässlich [83, 89, 90, 151]. Eine Stabilisierung der Partikel-Suspension kann durch abstoßende elektrische Ladungen, vermittelt durch Moleküle auf der Partikeloberfläche [152], oder durch Polymer-vermittelte sterische (räumliche) Abstoßung [88] erreicht werden. Um Partikel zu stabilisieren, müssen die abstoßenden Kräfte die anziehenden Kräfte (Van-der-Waals-Kräfte) überwiegen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Beschichtung mit verschiedenen monomeren Säuren zu verschiedenen negativ geladenen, elektrostatisch stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikeln mit dadurch variierenden Oberflächeneigenschaften führen. Um eine maximale Adsorption der jeweiligen monomeren Säuren auf der Partikeloberfläche zu gewährleisten, wurde die Beschichtung im sauren Bereich (pH von 3,0) durchgeführt. Die Carboxygruppen der verwendeten monomeren Säuren liegen hier zunehmend protoniert vor, wodurch in anderen Studien gezeigt werden konnte, dass eine Komplexierung an Eisenionen von Partikeloberflächen erleich-

tert wird [139, 153]. Unter 4.1.1. (Tabelle 4.1) sind die verschiedenen Säuren und die Ergebnisse der Beschichtungsversuche veranschaulicht.

Neben VSOP konnten in anderen Arbeiten weitere Eisenoxid-Nanopartikel-Suspensionen durch Adsorption von Citronensäure auf der Partikeloberfläche synthetisiert werden [98, 154]. Citronensäure verfügt über drei Carboxygruppen und eine zusätzliche Hydroxygruppe, die wahrscheinlich eine wichtige Rolle im Stabilisierungsprozess einnehmen [155]. Carboxygruppen eignen sich als zweizähliger Ligand durch ihre chemische Affinität zu Eisenionen zur Beschichtung von Eisenoxid-Nanopartikeln. Dabei spricht viel dafür, dass eine oder zwei der Carboxygruppen der Citronensäure kooperative Bindungen mit den Eisenatomen auf der Partikeloberfläche ausbilden [88, 151]. Durch die geometrische Struktur von Citronensäure können vermutlich sterisch nicht alle Carboxygruppen an der Oberfläche binden, so dass mindestens eine Carboxygruppe in das Suspensionsmedium ragt und in Abhängigkeit vom pH durch Dissoziation der Protonen eine negative Ladung besitzt. Die meisten organischen Säuren sind bei neutralem pH (7,4) teilweise deprotoniert. Durch zwei potentiell komplexierende Carboxygruppen könnte bei der Citronensäure zusätzlich ein Chelateffekt auftreten, der eine besonders stabile Komplexbildung ermöglicht [146].

Viele an der Partikeloberfläche koordinierte Citronensäuremoleküle sorgen im Endeffekt für eine ausreichende negative Gesamtladung des Partikels. Die Hydroxygruppe könnte zusätzlich an der koordinativen Bindung zur Partikeloberfläche über Wechselwirkungen mit dem Eisenionen beitragen [155]. Zusammenfassend muss ein Stoff für die erfolgreiche elektrostatische Stabilisierung einerseits Gruppen zur potentiellen Komplexbildung auf Eisenoxidoberflächen aufweisen, und andererseits über geladene Gruppen verfügen, die nicht an der Komplexbildung beteiligt sind, und so für die elektrostatische Stabilisierung sorgen.

Im folgenden steht (+) für stabile Partikel und (-) für keine Partikelstabilisierung.

Weinsäure (+), Äpfelsäure (+), Tartronsäure (-) und Maleinsäure (-) besitzen als Dicarbonsäuren im Unterschied zu Citronensäure jeweils lediglich 2 Carboxygruppen. Während Weinsäure (+) zudem über 2 Hydroxygruppen verfügt, ist bei Äpfel (+) und Tartronsäure (-) eine und bei der Maleinsäure (-) keine vorzufinden. Mit Äpfel-, wie auch mit Weinsäure konnten Eisenoxid-Nanopartikel stabilisiert werden, während im Gegensatz dazu die Beschichtung mit Malein- und Tartronsäure keine stabilen Partikel ergab (siehe 4.1.1.).

Da es sich bei allen oben angesprochenen Molekülen um Dicarbonsäuren handelt, müssen einzelne Details über die bereits erwähnten wichtigen Carboxygruppen hinaus erörtert werden, die für ein erfolgreiches Coating notwendig sind. Äpfelsäure (+) besitzt im Vergleich zur Tartronsäure (-) eine längere Kohlenstoffkette, welche bezüglich der Stabilisierung von Eisenoxid-Partikeln eine Rolle zu spielen scheint, da die Moleküle ansonsten vergleichbar sind. Dies könnte möglicherweise auf die geringere geometrische Flexibilität der Tartronsäure aufgrund der kürzeren Kohlenstoffkette zurückzuführen sein. Dadurch bedingt, könnten beide Carboxygruppen mit Eisenatomen auf der Partikeloberfläche koordinieren, so dass keine Carboxygruppe für die erforderliche Ladung zur Verfügung stehen würde. Aus der Literatur ist keine Arbeit über mit Tartronsäure stabilisierte Eisenoxid- oder anderen Nanopartikel bekannt.

Maleinsäure (-) liegt in *cis*-Konfiguration vor (*trans*-Isomer ist Fumarsäure) und besitzt im Vergleich zu Äpfelsäure (+) statt einer Hydroxygruppe eine Kohlenstoff-Doppelbindung. Die durch die Doppelbindung resultierende geringere Flexibilität könnte insofern ein Grund für eine fehlende Stabilisierung sein, als dass eine nach außen ragende erforderliche Carboxygruppe, die dem Partikel bei Deprotonierung eine erforderliche Ladung verleihen würde, dadurch nicht bereitgestellt werden kann.

Ähnlich der Maleinsäure ist die *trans*-Aconitsäure (-) eine ungesättigte organische Verbindung und verfügt über keine Hydroxygruppe. Trotz ihrer drei Carboxygruppen konnten die Eisenoxid-Nanopartikel nicht mit Hilfe von Aconitsäure stabilisiert werden. Mögliche Erklärungen liegen in der kurzen Kohlenstoffkette (vergleiche Tartronsäure) und Abwesenheit einer Hydroxygruppe (vergleiche Maleinsäure). Auch in der Literatur gibt es keine vergleichbaren Arbeiten, in denen entweder mit *trans*-Aconitsäure oder mit dem *cis*-Isomer der Aconitsäure Eisenoxid-Nanopartikel stabilisiert werden konnten.

Hingegen gelang es Goloverda *et al.* unter Verwendung von Äpfelsäure Eisenoxid-Nanopartikel zu stabilisieren [156]. Die Partikel zeigten in Säure-Base-Titrationen eine geringere Stabilität als ebenfalls hergestellte Citronensäure- und Weinsäure-Eisenoxid-Nanopartikel. Andere Arbeiten dokumentieren das Vermögen von Weinsäure bezüglich einer elektrostatischen Stabilisierung von Eisenoxid-Nanopartikeln [139, 157] sowie Kobalt-Eisenoxid-Nanopartikeln [158]. In Vorversuchen wurde ein Coating ebenfalls mit Bernsteinsäure untersucht, welches nicht zu stabilen Parti-

keln führte (nicht gezeigt). Bernsteinsäure ist bis auf eine Hydroxygruppe mit Äpfelsäure vergleichbar. Daraus könnte abgeleitet werden, dass sich von den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten monomeren Säuren die nur über Carboxysäuren als potentiell bindende Gruppen verfügen, diejenigen am besten erwiesen haben, die mindestens 2 Carboxygruppen, mindestens eine Hydroxygruppe und ein Kohlenstoffgerüst aus mindestens 4 C-Atomen aufweisen. Die anscheinende Notwendigkeit der Anwesenheit einer Hydroxygruppe spricht für deren Beteiligung an einer Bindung zur Nanopartikeloberfläche [155].

Im Rahmen dieser Arbeit konnten ferner elektrostatisch stabilisierte Eisenoxid-Nanopartikel unter Verwendung von Etidronsäure (+) (1-Hydroxyethyliden-1,1-Diphosphonsäure; HEDP) hergestellt werden. Etidronsäure besitzt als Bisphosphonat zwei Phosphonatgruppen, die wie die oben diskutierten Carboxygruppen eine hohe Bindungsaffinität zu Metalloberflächen [159] bzw. hohe Fähigkeiten zur Komplexbildung mit Eisen aufweisen [160]. Maghemit-Nanopartikel wurden von Lalatonne *et al.* mit dem Bisphosphonat 5-hydroxy-5,5-bis(Phosphon)Pentansäure (HMBP-COOH) beschichtet, das neben den 2 Phosphonatgruppen über eine weitere Carboxygruppe verfügt [161]. Laut Lalatonne *et al.* sorgt diese zusätzliche Carboxygruppe, die nach außen ragt, für die eine elektrostatische Abschirmung, während die beiden Phosphonatgruppen eine Komplexbildung mit den Eisenatomen auf der Partikeloberfläche eingehen. Weiterhin wurden in anderen Arbeiten SPIO mit Etidronsäure (HEDP) beschichtet [162, 163], wodurch stabile Eisenoxid-Nanopartikel gewonnen werden konnten. Das bestätigt die Ergebnisse dieser Arbeit und zeigt das Potential von Etidronsäure bzw. von Bisphosphonaten hinsichtlich der Stabilisierung von Eisenoxid-Partikeln. Eine zusätzliche Carboxygruppe wie im Fall von HMBP-COOH ist demnach nicht zwingend erforderlich.

*Meso*-2,3-Dimercaptobernsteinsäure (+) ist eine organische Säure mit zwei Carboxygruppen und zwei Thiolgruppen (siehe 3.1.) mit der unter angepassten Bedingungen stabile Eisenoxid-Nanopartikel synthetisiert werden konnten (siehe 3.1.8.; 4.1.1.).

Thiolgruppen besitzen ein starkes Potential zur Komplexbildung von Metallen. In der Klinik fand *meso*-2,3-Dimercaptobernsteinsäure bereits Verwendung in Zusammenhang mit Schwermetallvergiftungen [164], die durch das orale Einnehmen von DMSA behandelt werden. Insbesondere bei Bleivergiftungen ist die *meso*-2,3-Dimercaptobernsteinsäure ein effektiver Chelator und bindet das Schwermetall

hauptsächlich in der Niere, woraufhin es ausgeschieden wird [165]. In der Literatur konnten stabile Eisenoxid-Nanopartikel unter Verwendung von *meso*-2,3-Dimercaptobernsteinsäure synthetisiert werden, indem es nach der Nanopartikelsynthese direkt mit DMSA beschichtet wurde [99, 166, 167] bzw. nach Ölsäure-Synthese durch einen Austausch an der Partikeloberfläche [168]. Laut Valois *et al.* bindet DMSA über ihre Carboxygruppen auf der Eisenoxid-Oberfläche [167], so dass die Thiolgruppen nach außen ragen. Diese wirken reduzierend auf den Eisenoxidkern und werden selber oxidiert, was zur Bildung von Disulfidbrücken zwischen mehreren DMSA-Moleküle führen kann [99]. In der Konsequenz entstehen demnach Polydisulfidketten auf der Partikeloberfläche. Die reduzierende Wirkung des DMSA kann aber auch zu einer partiellen oder gänzlichen Auflösung der Eisenoxid-Kerne führen. Aus diesem Grund wurde die Beschichtung angepasst und im Unterschied zu den anderen verwendeten Molekülen lediglich eine geringe Menge DMSA im Verhältnis zum Eisen verwendet (siehe 3.1.). Mit diesem Vorgehen konnten mit *meso*-2,3-Dimercaptobernsteinsäure beschichtete stabile Eisenoxid-Nanopartikel hergestellt werden. Im Vergleich mit den anderen stabilen Eisenoxid-Nanopartikeln zeigten die DMSA-Partikel deutlich größere Kerndurchmesser. Möglicherweise ist das ein Hinweis auf die oben beschriebene Vernetzung zwischen DMSA-Molekülen über die Thiolgruppen auf der Partikeloberfläche, so dass nicht allein eine elektrostatische, sondern des Weiteren eine Art sterische Stabilisierung entstanden ist. Andererseits konnte über die Zeta-Potential Messungen eine starke negative Ladung der DMSA-Partikel nachgewiesen werden.

Die 4-Amino-5-hydroxynaphthalin-2,7-disulfonsäure (-) besitzt eine Hydroxygruppe, eine Aminogruppe und 2 aromatische Kohlenwasserstoffverbindungen (Phenylgruppen). Damit unterscheidet sie sich stark von den oben beschriebenen Molekülen, was bei einer geglückten Stabilisierung zu Nanopartikeln mit stark variierenden Oberflächeneigenschaften geführt hätte. Das Molekül wurde weiterhin wegen seiner beiden Sulfonatgruppen in dieser Arbeit getestet, obwohl es keine bekannten Arbeiten hinsichtlich der stabilisierenden Wirkung von 4-Amino-5-hydroxynaphthalin-2,7-disulfonsäure auf Eisenoxid-Nanopartikel-Suspensionen gibt. Dagegen können Sulfonatgruppen ähnlich wie Phosphonatgruppen eine Komplexbildung auf Eisenoxid-Partikeloberflächen eingehen. Mit Dopamin-Sulfonat (ZDS) konnten von Zhou *et al.* Eisenoxid-Nanopartikel stabilisiert werden, indem die Sulfonatgruppe auf der Partikeloberfläche koordiniert [169]. Die Struktur

von 4-Amino-5-hydroxynaphthalin-2,7-disulfonsäure dagegen scheint nicht prädestiniert, um Eisenoxid-Nanopartikel elektrostatisch zu stabilisieren (siehe 4.1.1.).

## **5.2. Untersuchung der Eisenoxid-Nanopartikel auf Anreicherung in atherosklerotischen Plaques des ApoE<sup>-/-</sup>-Mausmodells**

Neben den etablierten mit Citronensäure beschichteten Eisenoxid-Nanopartikeln (VSOP), konnten wie in 4.1.1. beschrieben, vier weitere, mit unterschiedlichen organischen Säuren stabilisierte Eisenoxid-Nanopartikel synthetisiert werden. Alle 5 Partikel wurden in einer Dosis von 500 µmol Fe/kg i.v. appliziert (siehe 3.3.1.), um eine potentielle Anreicherung in atherosklerotischen Plaques zu evaluieren. Verglichen mit den Dosierungen in humanen Patienten von 30 bis 45 µmol Fe/kg scheint diese Dosis hoch. Doch aufgrund einer schnelleren Entfernung aus der Blutzirkulation durch eine höhere Herzfrequenz, werden Bildgebungsexperimente mit Kleintieren (Mäusen) generell bei höheren Dosierungen (200 bis 1000 µmol Fe/kg) durchgeführt [170, 171]. Andere Arbeiten, die ebenfalls eine Anreicherung von unspezifischen Eisenoxid-Nanopartikeln in atherosklerotischen Plaques des ApoE<sup>-/-</sup>-Mausmodells untersuchen, verwendeten höhere Dosen von 1000 µmol Fe/kg [130-132, 172, 173].

Während sich Citronensäure (VSOP), Etidronsäure-, Weinsäure-, und Äpfelsäure-Eisenoxid-Nanopartikel in den atherosklerotischen Plaques anreicherten (siehe unten), war dies für die DMSA-Eisenoxid-Nanopartikel nicht der Fall. Statt dessen wurde eine Akkumulation im Myokard in der *ex-vivo*-MRT-Messung registriert (siehe 4.7.; Abbildung 4.10). Mit DMSA beschichtete Eisenoxid-Nanopartikel wurden nach Injektion in Mäuse laut mehrerer anderer Studien im Lungengewebe lokalisiert [167, 174, 175]. Die Anreicherung ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass sich die Oberflächenstrukturen der Partikel stark unterscheiden. Im Vergleich zu den anderen Säuren, mit denen Nanopartikel stabilisiert wurden, könnten die DMSA-Moleküle über ihre Thiolgruppen Disulfidbrücken bilden und dadurch eine Art Käfig um den Eisenoxid-Kern erzeugen [176]. Diese differenten Oberflächeneigenschaften zusammen mit der etwas höheren Größe könnten eine Erklärung für die abweichenden Affinitäten sein. In der Folge wurden die DMSA-Eisenoxid-Nanopartikel nicht mehr für die *in-vivo*-Versuche verwendet.

---

Elektrostatisch stabilisierte Eisenoxid-Nanopartikel besitzen im Vergleich zu sterisch stabilisierten meist kürzere Bluthalbwertszeiten. Mit einer nichtinvasiven MRT-UTE-Sequenz konnte im Rahmen dieser Arbeit die Halbwertszeiten der verschieden beschichteten Partikel auch bei höheren Dosierungen bestimmt werden (siehe 4.3.). Ein Vorteil dieser Methode liegt in einer Reduzierung der Tieranzahl, da alternativ pro Partikel bzw. Kontrastmittel in der Regel mehrere Tiere notwendig sind, um die Halbwertszeiten über Blutentnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten zu ermitteln.

Die Messungen ergaben die längsten Halbwertszeiten für Etidronsäure-Partikel. VSOP, Äpfel- und Weinsäure-Partikel zeigten in dieser Reihenfolge jeweils kürzere Halbwertszeiten (siehe 4.3.). Während VSOP eine längere Zirkulationsdauer gegenüber Wein- und Äpfelsäure-Partikeln aufweist, ist die längste Halbwertszeit für Etidronsäure-Partikel hinsichtlich der Anreicherungsresultate in atherosklerotischen Läsionen überraschend. VSOP zeigte vergleichsweise eine bis zu dreifach stärkere Akkumulation in atherosklerotischen Plaques. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine längere Zirkulationsdauer, da eine Anreicherung von Eisenoxid-Partikeln in atherosklerotischen Läsionen abhängig von der Zirkulationszeit der Partikel sein könnte [126]. Je länger ein Kontrastmittel im Blut zirkuliert, desto länger würde auch die Möglichkeit bestehen im Plaque zu akkumulieren, wohingegen eine schnelle Klärung durch das RES eine Anreicherung vermindern sollte. Da diese neue UTE-basierte Methode erst zum Ende dieser Arbeit etabliert wurde, konnte pro unterschiedlich beschichtetem Partikel lediglich ein Tier für die Bestimmung der Halbwertszeiten untersucht werden. Dementsprechend ist der Fehler der Halbwertszeitbestimmungen vermutlich relativ hoch. Zirkulationszeiten weisen vermutlich aufgrund der Individualität der Tiere zudem eine hohe Varianz auf. Möglicherweise fällt der Wert der Etidronsäure-Partikel zu hoch aus und VSOP zeigen die längste Blutkinetik. Um die vergleichsweise stärkere Aufnahme von VSOP in atherosklerotischen Plaques ausschließlich mit der längsten Zirkulationsdauer zu begründen, sind demnach weitere Messungen erforderlich, um die Abstufungen der Halbwertszeiten zwischen den unterschiedlich beschichteten Partikeln zu überprüfen. Für die vorliegende Studie konnte jedoch mittels der MRT-Halbwertszeitbestimmung die Zeit ermittelt werden, nach der die Mäuse post Injektion analysiert werden konnten, was ein essentieller Faktor des experimentellen Designs darstellt.

VSOP konnte in einer vorausgehenden Arbeit in einem Kaninchenmodell (*Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit (WHHL Rabbit)*) in atherosklerotischen Plaques mittels *ex-vivo*-MRT-Bildgebung und Berliner-Blau-Färbung nachgewiesen werden [147]. Positive Bereiche in der Berliner-Blau-Färbung wurden in Makrophagen sowie in sogenannten Matrixvesikeln vorgefunden. Die Matrixvesikel kolo-kalisiert mit Kalzium bzw. Hydroxylapatit (von Kossa-Färbung) sowie mit extrazellulären Bestandteilen (Movat-Färbung). Vergleichbare Ergebnisse wurden im Rahmen dieser Arbeit festgestellt (siehe 4.4.; Abbildung 4.6). Zu Beginn der Untersuchungen sollten dementsprechend VSOP sowie die neu synthetisierten Partikel ebenfalls histologisch per Berliner-Blau-Färbung nachgewiesen werden, zumal eine erste Kontrolle (ApoE<sup>-/-</sup>-Maus ohne Partikel-Gabe) keine blauen d. h. eisenpositiven Bereiche innerhalb der Plaques zeigte. Ein quantitativer Vergleich der potentiellen Anreicherungen der verschiedenen Nanopartikel sollte ebenfalls mit der Berliner-Blau-Färbung erfolgen. Nach Evaluierung weiterer Kontrollen wurde jedoch endogenes Eisen innerhalb atherosklerotischer Plaques in verschiedenen Tieren per Berliner-Blau-Färbung nachgewiesen (siehe 4.5.; Abbildung 4.7). Dabei wurden wiederholt extrazelluläre Vesikel blau angefärbt, was das tatsächliche Vorkommen von VSOP in den Vesikeln stark in Frage stellt (siehe 4.4.). Da in den Kontrollen ein ähnliches Bild wie nach VSOP-Gabe zu detektieren war, muss die Berliner-Blau-Färbung generell als Methode zum Nachweis von Eisenoxid-Nanopartikeln innerhalb atherosklerotischer Plaques stark angezweifelt werden. Dies war insbesondere deshalb überraschend, da diese Methode zum Nachweis von Eisenoxid-Partikeln als etabliert gilt. Viele Arbeiten dokumentieren eine Anreicherung von Eisenoxid-Nanopartikeln mittels histologischem Nachweis durch Berliner-Blau-Färbung sowohl in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen [130-133], als auch in Kaninchen- [177] und humanen atherosklerotischen Plaques [123, 178]. Klug *et al.* beschrieben 2008 zwei verschiedene Arten der Anreicherung: eine homogene Verteilung im subendothelialen Raum und eine weitere, abgegrenzte in der Media, die starke Übereinstimmungen mit den beschriebenen Matrixvesikeln aufweist [179].

Darüber hinaus erhärtet ein Vergleich mit Arbeiten zu Untersuchungen von körpereigenem Eisen in atherosklerotischen Plaques die Zweifel an der Berliner-Blau-Färbung als Nachweismethode von applizierten Eisenoxid-Partikeln. Schon 1983 benutzten Virmani *et al.* die Berliner-Blau-Färbung zum Nachweis von Eisen innerhalb atherosklerotischer humaner Plaques als Folge von Einblutungen in die



Plaque [180]. Ähnliche Arbeiten demonstrieren ein vermehrtes Vorkommen von Eisen in humanen Plaques, die alle mit der Berliner-Blau-Färbung nachgewiesen wurden [181-187]. Ebenso konnte Eisen ohne Applikation von Eisenoxid-Partikeln im ApoE<sup>-/-</sup>-Mausmodell [188] und im Doppelknockout ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Mausmodell mit der herkömmlichen Berliner-Blau-Färbung [189], sowie mit DAB-verstärkter Berliner-Blau-Färbung detektiert werden [190-192]. Bei dieser modifizierten Methode sorgt der Einsatz von DAB für eine Verstärkung der Färbereaktion. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die herkömmliche Berliner-Blau-Färbung ebenfalls variiert. Anstelle einer 10%-igen wurde eine 1%-ige Kaliumhexacyanoferrat(II)-Lösung und statt 20%-iger HCl-Lösung wurde eine im Endeffekt auf 1% verdünnte HCl-Lösung verwendet (siehe 3.4.3.1.) [140]. Diese Verhältnisse scheinen sensitiver in Bezug auf das angefärbte Eisen zu sein, da keine DAB-Verstärkung notwendig war, um Eisenablagerungen innerhalb der Kontrollen zu detektieren (siehe 4.5.).

Lee *et al.* kolokalisierten extrazelluläres Eisen innerhalb atherosklerotischer Plaques mit dem Vorkommen von vesikulären unlöslichen Strukturen, so genanntem Zeroid (*Ceroid*) [183]. Zeroid bzw. Zeroidvesikel werden in diesem Zusammenhang auch als Mikrovesikel, Membranvesikel oder Matrixvesikel bezeichnet [147]. Eine andere Arbeit stellte nach Isolierung von Zeroid eine Koexistenz von Eisen und Calcium bzw. Hydroxylapatit fest [193], was den Ergebnissen aus 4.4. sehr nahe kommt und dementsprechend gegen eine Akkumulation von VSOP spricht. Da die Berliner-Blau-Färbung generell Eisen anfärbt und nicht spezifisch Eisenoxid-Nanopartikel nachweist, sind alternative Methoden für die Histologie nötig. Eine Möglichkeit wäre eine Markierung mit synthetischen fluoreszenten Farbstoffen, die per Fluoreszenzmikroskopie einen eindeutigen Beleg liefern würden. Allerdings würden durch Fluoreszenzfarbstoffe wie zum Beispiel Cy5.5 (1128 Da) die Oberflächenstruktur und -eigenschaften sowie die Größe des Partikels grundsätzlich verändert werden, was besonders für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Nanopartikel zuträfe. Dies könnte wiederum Einfluss auf die Anreicherungsmechanismen haben und diese signifikant verändern. Zudem besteht bei der Kopplung mit Fluoreszenzfarbstoffen abhängig von der Partikelart die Möglichkeit der Dissoziation vom Partikel, was wiederum zu falschen Interpretationen bezüglich der Akkumulation führen würde.

Eine alternative Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit in Kooperation mit der BAM durchgeführt. Mit Hilfe von Europium, das während der Partikelsynthese in

den Eisenoxidkern eingebaut wurde (siehe 3.1.), konnten die VSOP histologisch mittels LA-ICP-MS eindeutig über das spezifische Europium-Signal in atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen werden (siehe 4.12.). Im Gegensatz zu peripher gekoppelten Farbstoffen werden die Eisenoxid-Nanopartikel bezüglich ihrer Größe und Oberflächenstruktur und Oberflächenladung nicht verändert. Da Europium im Gegensatz zu Eisen (siehe oben) im Gewebe nicht gegenwärtig ist, ist ein eindeutiger Nachweis gewährleistet. Ferner können parallel zu Europium weitere Elemente wie Eisen oder Calcium während eines LA-ICP-MS Experiments analysiert werden. Dies könnte zur näheren Untersuchung bzw. Korrelation des endogenen Eisens mit den Partikelanreicherungen (Europium) und anderen Elementen in weiteren Analysen genutzt werden. Stadler *et al.* beispielsweise ermittelten mittels induktiv gekoppelter Plasma-Massenspektroskopie (ICP-MS) erhöhte Eisengehalte in humanen atherosklerotischen Plaques, die mit gesteigerten Kupferwerten in aufgelösten Gewebeschnitten korrelierten [194]. Während ICP-MS schon breit gefächerte Anwendung in verschiedenen Gebieten wie Umwelt (Trinkwasser, Meer- und Flusswasseranalysen [195, 196]), Geologie (Musterung von Leitelementen) [197] und Klinik (Spurenelemente in Blut, Serum und Urin) [198] findet, gibt es bisher erst wenige Arbeiten im biologischen bzw. biochemischen Bereich.

Durch die Kopplung an die Laser Ablationseinheit ist mit nun mit der LA-ICP-MS eine Anwendung auf Gewebeschnitten mit orts aufgelöster Zuordnung der Elemente realisierbar. Elementanalysen z. B. von Metallen in größeren Gewebeabschnitten (1 mm Blöcke) wurden bereits angewendet [199]. Der Vergleich von Berliner-Blau-Färbung und den Ergebnissen der Eu-VSOP Detektion über LA-ICP-MS offenbarte eine höhere Sensitivität der letztgenannten Methode (siehe 4.12.).

Dadurch konnte eine Anreicherung von Eu-VSOP in azellulären Vesikeln eindeutig nachgewiesen werden. In solchen Vesikeln wurde zuvor vermehrt endogenes Eisen mittels Berliner-Blau-Färbung angefärbt (siehe 4.5.), wodurch eine vesikuläre Akkumulation der Nanopartikel nicht bewiesen werden konnte. Eine mögliche Erklärung ist, dass eine Anreicherung aufgrund des schon ohnehin vorhandenen körpereigenen Eisens erleichtert wird. An Orten, an denen schon Eisenablagerungen existieren ist möglicherweise durch ähnliche Bindungsvorgänge eine Affinität der Eisenoxid-Nanopartikel zur Anlagerung erhöht. Vergleiche zwischen Berliner-Blau-Färbungen und Intensitätsprofilen des Europiums unterstützen diese These, da Europium in Vesikeln in geringerer Frequenz im Vergleich zum Eisen vorgefun-

---

den wurde. Dies könnte bedeuten, dass neben den Eu-VSOP, welche in den Vesikeln über das Europium detektiert wurden, weitere eisengefüllte Vesikel ohne Eu-VSOP-Anreicherung vorlagen.

Insgesamt repräsentiert die LA-ICP-MS in Verbindung mit Europium dotierten Eisenoxid-Nanopartikeln eine überzeugende Methode Eisenoxid-Nanopartikel histologisch eindeutig nachweisen zu können. Weiterführend besteht zudem die Möglichkeit einer Quantifizierung der Eisenoxid-Nanopartikel in einem histologischen Schnitt. Dazu müsste die Konzentration des Eisens wie oben beschrieben und des inkorporierten Europiums (fluoreszenzphotometrisch nach Auflösen der Partikel) bestimmt werden. Um Partikel-Konzentrationen ermitteln zu können, ist zusätzlich eine Abschätzung der Anzahl der Eisenatome über eine Größenbestimmung über hochauflösende TEM sowie einer Modellierung der Eisenoxidkerne erforderlich.

Bei bekannter Europiumanzahl pro Partikel, könnte letztendlich eine Berechnung der Anzahl an Eu-VSOP in einem Schnitt über die Europium-Signale erfolgen. Die quantitative Erfassung von Eu-VSOP wird aus zeitlichen Gründen nach Abschluss dieser Arbeit untersucht.

Eine weitere Methode, die Eisenoxid-Nanopartikel im Gewebe histologisch zweifelsfrei aufzeigt, ist die Analyse mittels TEM. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 4 verschiedene Eisenoxid-Nanopartikel in atherosklerotischen Plaques per TEM demonstriert (siehe 4.10.). Dabei wurde der Eigenkontrast der Eisenoxid-Partikel in der TEM genutzt. Die Elektronenstrahlen werden durch die Eisenoxid-Kristalle stark geschwächt und erzeugen folglich einen Kontrast im Endbild. Dieser Kontrast wird jedoch bei einer Schnittkontrastierung mit Schwermetallen, wie sie für biologisches Gewebe zur generellen Kontrastoptimierung üblich ist, größtenteils überlagert. In der Konsequenz war es nicht möglich, Eisenoxid-Partikel in Schnitten mit Schwermetallfixierung zweifelsfrei zu identifizieren. In nicht kontrastierten Schnitten gelang jedoch neben der eindeutigen Detektion der Eisenoxid-Partikel auch eine ausreichende Darstellung der Gewebestrukturen, wodurch die Lokalisierung im Gewebe aufgeklärt werden konnte.

Aufgrund einzelner dunkler Artefakte, die während der Prozessierung der Gewebe wie z. B. dem Osmieren auftreten können, ist eine Abbildung der Nanopartikel in hoher Auflösung notwendig. Erst bei hoher Vergrößerung konnten einzelne Nanopartikel aufgrund ihrer Größe, Form und ihres Kontrastes einwandfrei identifiziert

werden (siehe Abbildung 4.14). Durch die hohen Vergrößerungen und dadurch hohen Auflösungen eignet sich die TEM sehr gut, um die Anreicherung der Partikel näher intrazellulär zu bestimmen. So konnte eine überwiegende Agglomeration aller Partikel in Phagolysosomen evaluiert werden.

Indessen ergeben sich aufgrund der hohen Vergrößerungen auch Nachteile bei einer Identifizierung der Zellen, in denen Anreicherungen festgestellt wurden. Die kleinste Vergrößerung am benutzten TEM war eine 600-fache, in der ein Überblick über das Gewebe schon erschwert ist. Weiterhin ist es erforderlich, auf sehr hohe Vergrößerungen umzuwechseln, um die Partikel wie oben beschrieben einwandfrei zu identifizieren. Eine nähere Lokalisierung der Anreicherung ist dennoch möglich, wie für VSOP gezeigt (4.10.1.; Abbildung 4.15). Im Vergleich wäre die LA-ICP-MS hierbei von Vorteil, da eine herkömmliche Lichtmikroskopie einen guten Überblick über das Gewebe verschafft. Außerdem könnten zukünftig in Parallelschnitten mittels Antikörperfärbungen (IHC) wie z. B. über eine anti-Makrophagen Färbung Bereiche der Anreicherung näher charakterisiert werden. Eine immunhistochemische Färbung in der TEM wirft diesbezüglich Probleme auf, da die sekundären Antikörper in der TEM zumeist Goldpartikeln markiert sind. Die Goldpartikel liegen in einem ähnlichen Größenbereich wie Eisenoxid-Nanopartikel und weisen einen ähnlichen Kontrast auf, was einen eindeutigen Nachweis und Lokalisierung erschweren würde. Eine korrelierende Antikörperfärbung ist deswegen in der TEM in diesem Kontext nicht möglich.

Die in Einklang mit anderen Studien im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Eisenanreicherungen in den Kontrollen (siehe oben) eröffnen neue Fragen bezüglich der Rolle des Eisens in der Atherosklerose. Sullivan formulierte die sogenannte Eisenhypothese (*iron hypothesis*), nach der die große Differenz beim Auftreten von Herzkrankheiten zwischen den Geschlechtern aus epidemiologischen Studien, mit erhöhten Eisenwerten bei Männern in Zusammenhang gebracht wurden und folgerte daraus eine schädigende Wirkung von Eisen in atherosklerotischen Plaques [200]. In ungebundenem Zustand kann Eisen toxischen Einfluss haben, indem es in Gegenwart von Wasserstoffperoxid die Bildung reaktiver freier Sauerstoffradikale (*reactive oxygen species; ROS*) fördert [201-203]. Der Vorgang wird als Fenton-Reaktion beschrieben. Li *et al.* dokumentieren eine verstärkte Absterberate von Endothelzellen und Makrophagen durch Eisen und umgekehrt eine verminderte Todesrate dieser Zellen nach Einsatz des Eisen-Chelators Deferoxamin [204]. In

einer weiteren Studie wurde der Einfluss einer gänzlich eisenfreien Diät im Vergleich zu einer normalen Diät in Hinblick auf die Entwicklung von Artherosklerose bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen untersucht [190]. Dabei entwickelten die Tiere nach Fütterung der eisenfreien Diät vergleichsweise kleinere Plaques, woraus Lee *et al.* eine Inhibition der Entwicklung von Atherosklerose durch Eisenmangel folgerten. Außerdem wurde ein erhöhter Gehalt an Kollagen festgestellt, der für eine größere Stabilität der Plaque steht. Neben Hämoglobin, ist der größte Anteil des Eisens im Gewebe intrazellulär in dem Protein Ferritin gespeichert [205]. Da Eisen in gebundener Form keine Redoxaktivität entwickelt, die zu toxischen Verbindungen (siehe oben) führen würde, werden eisenbindende Proteine wie Ferritin, Transferritin oder Haptoglobin als Teil des antioxidantischen Abwehrsystems gesehen [202]. Weiterhin konnte Eisen in humanen atherosklerotischen Plaques mit der Expression von Ferritin korreliert werden [206]. Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit ergaben keine Kolo-kalisation von Ferritin und Eisen in atherosklerotischen Läsionen des ApoE<sup>-/-</sup>-Mausmodells (siehe 4.6.; Abbildung 4.8). Zwar konnte Ferritin innerhalb der Läsionen nachgewiesen werden, jedoch nicht kolo-kalisierend mit den Eisenablagerungen. Somit war es auch unwahrscheinlich, dass das endogene Eisen magnetische Eigenschaften zeigen würde, da diese auf das Kristall Ferrihydrit innerhalb von Ferritin zurückgehen [207]. Dies bestätigte sich später sowohl in den MRT-Messungen, als auch in den MPS-Messungen von ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen ohne Applikation von Eisenoxid-Nanopartikeln.

Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die Eisenablagerungen in den Plaques näher zu charakterisieren und folglich neue Erkenntnisse über die Bedeutung von Eisen im Kontext der Atherosklerose zu erlangen.

Die Verwendung von superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln zur Darstellung pathologischer Veränderungen wie Atherosklerose, bietet vor allem den Vorteil der nichtinvasiven Bildgebung über die Magnetresonanztomographie (MRT). In T2-bzw. T2\*-gewichteten Sequenzen ist in Anreicherungsgebieten eine negative Verstärkung (*negative enhancement*) in Form von Signalminderungen zu beobachten. Über MRT *in-vivo*-Messungen konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Akkumulation von VSOP in atherosklerotischen Plaques 3 h nach i.v. Injektion in dem ApoE<sup>-/-</sup>-Mausmodell detektiert werden (siehe 4.7.). Dies ist im Vergleich zu anderen Studien, die ebenfalls eine Anreicherung in atherosklerotischen Plaques mit unspezifischen Eisenoxid-Nanopartikeln mittels MRT-Bildge-

bung nachweisen, ein sehr früher Zeitpunkt. Im ApoE<sup>-/-</sup>-Mausmodell wurden sterisch stabilisierte USPIOs (Ferumoxtran-10) laut Morris *et al.* erstmals 2008 *in vivo* in MRT-Messungen dargestellt [131]. Dabei wurde an 2 aufeinanderfolgenden Tagen 2 mal eine Dosis von 1000 µmol Fe/kg injiziert und 24 Stunden nach der zweiten Partikelgabe gemessen. Mit dem gleichen Eisenoxid-Partikel und experimentellen Studiendesign wurde 2010 in einer weiteren Studie ebenfalls eine Anreicherung in atherosklerotischen Plaques beobachtet [208]. Allerdings wurden mit Dextran beschichtete CLIO-47 (*cross-linked iron oxide*) Eisenoxid-Nanopartikel schon früher in Plaques des ApoE<sup>-/-</sup>-Mausmodells *in vivo* mittels MRT sichtbar gemacht [209]. Andere Untersuchungen mit Ferumoxtran-10 ergaben dosisabhängige Akkumulation in Plaques, die im Vergleich zu 24 Stunden post Injektion nach 48 Stunden stärker war [132]. Die große temporäre Differenz zwischen Injektion und Bildgebung ist wahrscheinlich auf die lange Zirkulationszeit von Ferumoxtran-10 (1-2 Tage im Menschen) zurückzuführen [210].

Auch monomer beschichtete Eisenoxid-Nanopartikel (P904, Guerbet) wurden laut Sigaovan *et al.* erst 48 Stunden nach Applikation von 1000 µmol Fe/kg innerhalb atherosklerotischer Plaques des gleichen Modells *in vivo* nachgewiesen [172]. Da VSOP wie auch die anderen im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Eisenoxid-Nanopartikel eine kurze Zirkulationszeit aufweisen (siehe 4.3.), wurde die *in-vivo*- bzw. *ex-vivo*-MRT-Bildgebung bereits 3 Stunden nach Injektion durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt ist nur noch ein sehr geringer Anteil der Partikel in der Blutzirkulation präsent, was bei einer T2\*-Bildgebung in Verbindung mit Eisenoxid-Nanopartikeln Prämisse für die *in-vivo*-Visualisierung der Partikel im Gewebe ist. Befindet sich eine relativ hohe Dosis in der Zirkulation, so erscheint das Blut schwarz und eine Anreicherung in Form von Signalminderungen in den Plaques ist nicht wahrnehmbar [127]. Ungeachtet dieser Tatsache erfolgte in einer früheren Arbeit laut Makowski *et al.* die MRT-Bildgebung im ApoE<sup>-/-</sup>-Mausmodell erst 24 Stunden nach einer zweiten bzw. 48 Stunden nach einer ersten Injektion von VSOP (insgesamt 600 µmol Fe/kg) [133].

Die vergleichsweise kurze Zeitspanne zwischen Injektion und Bildgebung, die für die VSOP in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, bedeutet einen nicht zu unterschätzenden Vorteil für die klinischen Praxis [127]. So könnte mit VSOP kurze Zeit nach i.v. Applikation zuerst eine T1-gewichtete MR-Angiographie durchgeführt werden, welche die Gefäße hell darstellt und eine Erkennung von stark

stenotischen Gefäßen ermöglicht. Anschließend könnte mit Gradientenechosequenzen wie FLASH ein *Screening* hinsichtlich atherosklerotischer Läsionen erfolgen. Somit kann unter Verwendung von VSOP simultan eine Evaluation des arteriellen Lumens sowie eine Detektion von pathologischen Veränderungen der Gefäßwand erfolgen.

Die vergleichenden MRT-Untersuchungen bezüglich der Anreicherungen der verschiedenen Eisenoxid-Nanopartikel wurde mit *ex-vivo*-Phantomen durchgeführt (siehe 4.7.). Aufgrund des geringen Hintergrundes und des Fehlens von durch Herz- und Atembewegung produzierten Artefakten ist eine exakte Gegenüberstellung der Akkumulationen im Vergleich zur *in-vivo*-MRT möglich. Die Anreicherungen waren eindeutig über Signalmindernungen in den Gefäßwänden an den Prädiaktionsstellen für atherosklerotische Läsionen erkennbar. So konnte eindeutig eine Anreicherungen von VSOP, Etidronsäure-, Weinsäure- und Äpfelsäure-Eisenoxid-Nanopartikeln nachgewiesen sowie eine semi-Quantifizierung auf Basis der *ex-vivo*-Messungen realisiert werden. Die semi-Quantifizierung ergab eine mehr als 3-fach stärkere Akkumulation von VSOP im Vergleich zu den anderen 3 elektrostatisch stabilisierten Partikeln. Unter Verwendung von MPS konnten diese Abstufungen bestätigt werden (siehe 4.11.). Im Unterschied zur semi-quantitativen Auswertung der *ex-vivo*-Messungen, wurde während der MPS-Experimente die Summe atherosklerotischer Plaques der gesamten Aortenbogen-Region gemessen (siehe 4.11.; Abbildung 4.17 B). Da dieses Ergebniss sehr gut mit der *ex-vivo*-Auswertung der Aortenwurzel korreliert, kann von einer repräsentativen Akkumulation in den Plaques der Aortenwurzel ausgegangen werden. Erstmals wurden MPS-Messungen im Rahmen dieser vorliegenden Arbeit erfolgreich zum Nachweis und darüber hinaus zur Quantifizierung von Eisenoxid-Nanopartikeln in atherosklerotischen Plaques angewendet werden.

MPS ist eine relativ neue Methode, die im Zuge des *Magnetic Particle Imaging* (MPI) entwickelt wurde [211]. Bisher wurde mittels MPS bereits die Effizienz von Zellmarkierungen mit Eisenoxid-Partikeln quantifiziert [212] sowie die Halbwertszeiten von Eisenoxid-Partikeln über Messungen des Blutes ermittelt [213]. Neben den MPS-Messungen der Gefäße zur Erfassung der Nanopartikel-Akkumulation wurde die MPS-Messung in der vorliegenden Arbeit ebenfalls zur Bestimmung der Halbwertszeiten von VSOP genutzt (siehe 4.2.). In Anbetracht des endogenen Eisens in den atherosklerotischen Plaques (siehe 4.5.) stellt die Magnetische-Par-

tikel-Spektrometrie eine verlässliche Möglichkeit des Partikel-Nachweises dar, da Gewebe und Eisen aus dem Blut nicht zum MPS-Signal beitragen. In diesem Zusammenhang konnte erneut festgestellt werden, dass endogenes Eisen der atherosklerotischen Plaques keine magnetischen Eigenschaften besitzt, da Messungen von nicht injizierten ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen das gleiche Signal wie das des Hintergrundes ergaben (siehe 4.11.). Die Quantifizierung per MPS wurde an den gleichen atherosklerotischen Gefäßen durchgeführt, mit denen zuvor die *ex-vivo*-Messungen erstellt wurden. Die Tieranzahl bei den MPS-Bestimmungen betrug im Vergleich zu den MRT-Messungen jedoch pro Gruppe statt 3 lediglich 5. Dies ist der Tatsache geschuldet, dass es bei den ersten MPS-Messungen zu Verunreinigungen der Gewebe durch Eisenablagerungen kam. Die Verunreinigungen konnten eindeutig auf die Präparation des Gewebes für die *ex-vivo*-MRT-Messungen mit eisenhaltigem Besteck zurückgeführt werden. In der Folge wurden sehr starke magnetische Momente sowohl nach Injektion der Nanopartikel, als auch bei den Kontrollen gemessen. Der Eisenabrieb konnte zudem außerhalb der Gefäße mittels Berliner-Blau-Färbung nachgewiesen werden. Die MPS ist eine sehr sensitive Messmethode, bei der schon kleinste Verunreinigungen wie Staub zu verfälschten Ergebnissen führen können. Alle weiteren Untersuchungen wurden in der Konsequenz mit eisenfreiem Präparierbesteck durchgeführt, wodurch eine Verunreinigung ausgeschlossen werden konnte.

Durch Variation der Beschichtungen wurden Eisenoxid-Nanopartikel mit sich unterscheidenden Oberflächeneigenschaften hergestellt. Aufgrund dieser unterschiedlichen Charakteristiken der Hüllen war es vorstellbar, dass andere *targets* (Ziele) innerhalb von atherosklerotischen Plaques angesteuert werden, die über eine Vielfalt an unterschiedlichen Zellen, extrazellulärer Matrix und sezernierten Proteinen verfügt. Aus den oben diskutierten Gründen, wurden die Anreicherungen histologisch in dieser Arbeit über die TEM analysiert. Grundlegende Unterschiede hinsichtlich der Akkumulationen wurden mit Ausnahme der DMSA-Partikel nicht festgestellt. Alle weiteren stabilen Nanopartikel (VSOP, Etidronsäure-, Weinsäure- und Äpfelsäure-Nanopartikel) wurden überwiegend intrazellulär detektiert und zwar in phagolysosomalen Strukturen innerhalb von Endothelzellen und Makrophagen. Vereinzelt konnten Nanopartikel in extrazellulären Bereichen aufgespürt werden. Diese Beobachtung konnte später über die Eu-VSOP und LA-ICP-MS bestätigt werden.



Ob und zu welchen Komponenten der extrazellulären Matrix eine Affinität besteht, könnte zukünftig durch die LA-ICP-MS aufgeklärt werden. In der extrazellulären Matrix von atherosklerotischen Plaques finden sich neben Kollagen verschiedene Proteoglykane wieder, die aus einem Protein und unterschiedlichen Ketten aus negativ geladenen Glykosaminoglykanen (GAG) bestehen. Die negative Ladung setzt sich aus verschiedenen funktionellen Carboxy- und Sulfatgruppen der GAGs zusammen. Wagner *et al.* vermuteten eine Affinität von VSOP zu Glykosaminoglykanen innerhalb atherosklerotischer Plaques von Kaninchen durch einen Austausch der Citronensäurehülle durch GAGs, vermittelt durch eine höhere Bindungskapazität der negativen Gruppen [147]. Für diesen Mechanismus könnte das observierte endogene Eisen in den Mikrovesikeln sprechen, welches eine Affinität der GAGs zur Bindung von Eisen vermuten lässt. Andererseits könnte eine Anreicherung von VSOP auch durch eine Anlagerung von bereits existierendem Eisen unterstützt werden. Wenngleich keine unterschiedlichen Ziele innerhalb der Plaques angesteuert wurden, konnte dennoch eine Abstufung bezüglich der quantitativen Anreicherung der 4 verschiedenen Eisenoxid-Nanopartikel festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung könnte in der unterschiedlichen Bindungsstabilität der monomeren Säuren auf den Partikelkernen liegen. Möglicherweise stellt die Koordination der Citronensäure auf der Partikeloberfläche eine beständigere Stabilisierung im Vergleich mit den anderen verwendeten Säuren dar. Wie oben bereits diskutiert, besitzt Citronensäure im Gegensatz zu den Dicarbonsäuren Etidronsäure, Weinsäure und Äpfelsäure drei Carboxygruppen, von denen zwei an der koordinativen Bindung beteiligt sein könnten. Dies könnte wiederum bei der Interaktion mit Proteinen aus dem Blut eine Rolle spielen. Nach intravenöser Injektion der Partikel kommt es im Blut zur Adsorption von Plasmaproteinen, die im Rahmen der sogenannten Opsonierung eine Aufnahme durch Monozyten bzw. Makrophagen (Immunzellen) über Interaktionen mit spezifischen Rezeptoren erleichtern [101, 214-216].

Klassische Beispiele von opsonierenden Proteinen sind die Komplementproteine C1q, C3 bzw. generierte Fragmente von C3 (C3b, iC3b) sowie verschiedene Immunoglobuline (IgG) [217, 218]. Die Effizienz der Opsonierung, die mit einer schnelleren Phagozytose der Partikel einhergeht, ist abhängig von der Größe, Ladung sowie Oberflächenstruktur der Partikel [216]. Es sind bisher keine Arbeiten über die Opsonierungen von elektrostatisch stabilisierten Partikeln bekannt. Ver-

gleiche von Liposomen zeigten aber, dass neutrale Liposomen schwache Aktivatoren der Opsonierung waren und entsprechend lange zirkulierten, wohingegen negativ geladene Liposomen eine kürzere Halbwertszeit besaßen [219]. Übertragen auf die im Rahmen dieser Arbeit benutzten Eisenoxid-Partikel könnte eine höhere negative Ladung eine beschleunigte Entfernung aus der Zirkulation bedeuten. Allerdings besitzen VSOP, Weinsäure- und Äpfelsäure-Partikel sehr ähnliche Zeta-Potentiale, während nur Etidronsäure-Partikel eine höhere negative Ladung aufweist (siehe 4.1.3.). Entsprechende Abstufungen in den Bluthalbwertszeiten der verschiedenen Partikel waren nicht zu beobachten. Die ermittelte Halbwertszeit der Etidronsäure-Nanopartikel spricht gegen diese These (siehe oben). Das Ergebnis der Anreicherung in Endothelzellen und in besonderem Maße in Makrophagen aller 4 Partikel ist übereinstimmend mit der Akkumulation anderer unspezifischer Eisenoxid-Nanopartikel. So korrelierte die Akkumulation von USPIOs mit Makrophagen in humanen [123, 124, 220], Kaninchen- [125-129, 221] sowie murinen atherosklerotischen Läsionen [130-132, 172]. VSOP wurden laut Makowski *et al.* ebenfalls in Makrophagen, nicht jedoch in Endothelzellen lokalisiert [133]. Es existieren verschiedene Theorien, die eine Akkumulation von Eisenoxid-Nanopartikeln in Makrophagen von atherosklerotischen Plaques auf unterschiedliche Mechanismen zurückführen [76, 127, 171]. Einerseits könnten Monozyten aus dem Blut die Partikel aufnehmen und anschließend in das pathologische Gewebe einwandern. Litovsky *et al.* postulierten diese Hypothese, nachdem 6 Tage nach Partikel-Injektion Eisen in atherosklerotischen Plaques von Cytokin-behandelten ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen detektiert wurde [130]. In einer Studie, welche die temporäre Rekrutierung von Blutmonozyten mittels radioaktiver Markierung (<sup>111</sup>In) untersuchte, konnten diese nach 5 Tagen in atherosklerotischen Plaques lokalisiert werden [222]. Die Halbwertszeit der Monozyten im Blut betrug  $43,5 \pm 7,9$  h. In einem murinen Herzinfarktmodell wurden zunächst Eisenoxid-Mikropartikel injiziert und nach einer Woche operativ ein Herzinfarkt induziert. Eine weitere Woche später konnten Eisenablagerungen, die auf die Mikropartikel zurückgeführt wurden, im Infarktgebiet lokalisiert werden [223]. Diese Arbeiten zeigen, dass es einige Tage dauert bis Monozyten aus dem Blut oder aus Organen wie z. B. der Leber in Entzündungsgebiete wie Atherosklerose einwandern. Da eine Anreicherung im Rahmen dieser Arbeit schon nach 3 Stunden festgestellt wurde sind alternative Hypothesen zur Erklärung der Anreicherung wahrscheinlicher.

---

So könnte eine Akkumulation der Partikel andererseits über die fragilen, durchlässigen, kleinen Gefäße der Neovaskulatur erfolgen, die vor allem in tieferen Bereichen wie dem intimomedialen Übergang der atherosklerotischen Läsionen auftritt. Die Detektion der Nanopartikel in dieser Arbeit in Makrophagen und Endothelzellen in lumennahen Bereichen spricht allerdings gegen diese These. Stattdessen könnten die Nanopartikel direkt durch die dysfunktionale Endothelschicht diffundieren bzw. über Transzytose in die atherosklerotischen Läsionen gelangen [123]. In anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass das Endothel unter pathologischen Bedingungen, wie bei der Atherosklerose, aufgrund von vergrößerten bzw. unterbrochenen Verbindungen (*junctions*) zwischen den Endothelzellen eine erhöhte Durchlässigkeit aufweist [224]. Kim *et al.* führten eine Anreicherung von Silber-Nanopartikeln auf diese erhöhte Durchlässigkeit zurück [225]. Außerdem kann eine aktive Aufnahme der Endothelzellen durch Endozytose nicht ausgeschlossen werden. Die festgestellten Akkumulationen in Endothelzellen lassen insgesamt eine Kombination der Anreicherungen über eine passive Diffusion durch das permeable Endothel und der direkten Aufnahme der Nanopartikel durch Endothelzellen als wahrscheinlich erscheinen.

Im Vergleich der verschiedenen in der vorliegenden Arbeit untersuchten elektrostatisch stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikel erwies sich VSOP (Beschichtung mit Citronensäure) als der am geeignetste Kandidat für die MR-Bildgebung atherosklerotischer Plaques. Im Hinblick auf eine klinische Anwendung ist dies von Vorteil, da VSOP in der Vergangenheit bereits in vorklinischen bzw. in klinischen Evaluierungen befand [226, 227].



## 6. Zusammenfassung

---

### 6.1. Deutsche Version

Die Entwicklung neuer Kontrastmittel wie z. B. Eisenoxid-Nanopartikel ist für die Diagnose von Erkrankungen von großer Relevanz. Sterisch stabilisierte Eisenoxid-Nanopartikel werden bereits in der Klinik für verschiedene Anwendungen eingesetzt. Zukünftig könnte die Früherkennung atherosklerotischer Läsionen mittels nichtinvasiver MRT klinische Komplikationen wie Herzinfarkt und Schlaganfall verhindern bzw. nach erfolgter Diagnose zur Therapieüberwachung genutzt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Auswahl an elektrostatisch stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikeln mit abweichenden Oberflächeneigenschaften durch Beschichtung mit verschiedenen monomeren Säuren synthetisiert. Neben den etablierten *very small iron oxide nanoparticles* (VSOP), über eine negativ geladene Hülle aus Citronensäure stabilisierte Partikel, konnten aus 8 potentiellen monomeren Säuren 4 weitere elektrostatisch stabilisierte Eisenoxid-Nanopartikel mit Äpfelsäure, DMSA, Etidronsäure und Weinsäure synthetisiert werden.

Bei den Untersuchungen zum Nachweis der Anreicherung der Eisenoxid-Nanopartikel stellte sich die in der Literatur diesbezüglich etablierte Berliner-Blau-Färbung aufgrund der Detektion von endogenem Eisen innerhalb der atherosklerotischen Plaques als unzureichend heraus. Infolgedessen wurden alternative Methoden zum eindeutigen Nachweis sowie eine Quantifizierung in atherosklerotischen Läsionen erarbeitet. Über *ex-vivo*-MRT-Untersuchungen und durch Etablierung der relativ neu entwickelten Magnetische-Partikel-Spektrometrie (MPS) konnte eine mehr als dreifach so starke Anreicherung von VSOP im Vergleich zu Äpfelsäure-, Weinsäure- und Etidronsäure-Partikeln gezeigt werden, während DMSA-Nanopartikel sich nicht in atherosklerotischen Plaques anreicherten. Histologisch wurden VSOP mittels TEM in Endothelzellen und Makrophagen sowie vereinzelt azellulär lokalisiert. Weiterhin konnte eine sehr sensitive Methode zum eindeutigen histologischen Nachweis von Eisenoxid-Nanopartikeln über eine Europium-Dotierung

von VSOP und dem Einsatz von LA-ICP-MS etabliert werden. Basierend auf den quantitativen Ergebnissen konnte abschließend VSOP als bester Kandidat mittels MRT *in vivo* in atherosklerotischen Läsionen der ApoE<sup>-/-</sup>-Maus in sehr guter Qualität dargestellt werden, was das Potential für eine klinische Anwendung unterstreicht.

Alle vier Partikel zeigten im Vergleich zu sterisch stabilisierten Eisenoxid-Nanopartikeln kürzere Halbwertszeiten von unter einer Stunde, was eine T1-gewichtete MR-Angiographie und anschließend eine T2\*-gewichtete Bildgebung der atherosklerotischen Läsionen in nur einer Bildgebungssitzung erlauben würde – für eine klinische Anwendung ein wesentlicher Vorteil.

## 6.2. Englische Version

The development of new contrast agents such as iron oxide nanoparticles is very important for diagnostic imaging. Iron oxide nanoparticles are an important class of imaging probes. Sterically stabilized iron oxide nanoparticles are already used in different clinical applications of magnetic resonance imaging (MRI). In the future, the early diagnosis of atherosclerotic lesions using MRI and iron oxide nanoparticles could prevent clinical complications such as myocardial infarction and stroke and serve to monitor the response to treatment.

In this work several electrostatically stabilized iron oxide nanoparticles with different surface properties were synthesized by using different monomeric acids for coating. In addition to *very small iron oxide nanoparticles* (VSOP), which are stabilized by a negatively charged shell of citric acid, 4 further electrostatically stabilized nanoparticles could be synthesized out of 8 potential monomeric substances. Coatings with dimercaptosuccinic acid (DMSA), etidronic acid, malic acid, and tartaric acid resulted in stable nanoparticles. Verification of iron oxide nanoparticles using the Prussian blue staining method established in the literature failed in apoE<sup>-/-</sup> mice due to the presence of endogenous iron within the atherosclerotic plaques.

Hence, alternative methods were identified and developed to prove and quantify iron oxide nanoparticles in plaques. Using *ex vivo* MRI and the recently established technique of magnetic particle spectroscopy (MPS), a three-fold higher accumulation was found for VSOP compared with etidronic acid-, malic acid-, and tartaric acid-

ric acid-stabilized nanoparticles, while DMSA-coated nanoparticles did not target atherosclerotic plaques. Histologically, VSOP were mostly identified in endothelial cells and macrophages and occasionally outside cells using transmission electron microscopy (TEM). Furthermore, a very sensitive method based on Europium doping and the use of laser ablation inductively coupled plasma mass spectroscopy (LA-ICP-MS) was established for definitive histologic identification of iron oxide nanoparticles. Based on quantitative results, VSOP as the best nanoparticle, was demonstrated within atherosclerotic plaques of apoE<sup>-/-</sup>-mice *in vivo*. Imaging quality was very good, underlining the potential of VSOP for clinical use.

In comparison to sterically stabilized iron oxide nanoparticles, all 4 particles had shorter blood half-lives of less than one hour. This is an essential advantage for clinical use because it would allow use of the particles for T1-weighted MR angiography and subsequent T2\*-weighted imaging in a single session.





## Literaturverzeichnis

---

- [1] A. Alwan, *Global status report on noncommunicable diseases 2010* (World Health Organization, **(2011)**).
- [2] S. Mendis, P. Puska, B. Norrving, *Global atlas on cardiovascular disease prevention and control* (World Health Organization, **(2011)**).
- [3] M. M. Sadeghi, D. K. Glover, G. M. Lanza, Z. A. Fayad, L. L. Johnson, Imaging atherosclerosis and vulnerable plaque. *J Nucl Med.* **(2010)** 51 Suppl 1, 51S-65S.
- [4] R. Corti, V. Fuster, Imaging of atherosclerosis: magnetic resonance imaging. *Eur Heart J.* **(2011)** 32, 1709-119b.
- [5] E. Falk, P. K. Shah, V. Fuster, Coronary plaque disruption. *Circulation.* **(1995)** 92, 657-671.
- [6] J. A. Schaar, J. E. Muller, E. Falk, R. Virmani, V. Fuster, P. W. Serruys, A. Colombo, C. Stefanadis, S. Ward Casscells, P. R. Moreno, A. Maseri, A. F. van der Steen, Terminology for high-risk and vulnerable coronary artery plaques. Report of a meeting on the vulnerable plaque, June 17 and 18, 2003, Santorini, Greece. *Eur Heart J.* **(2004)** 25, 1077-1082.
- [7] M. A. McAteer, R. P. Choudhury, Targeted molecular imaging of vascular inflammation in cardiovascular disease using nano- and micro-sized agents. *Vascul Pharmacol.* **(2013)** 58, 31-38.
- [8] E. Schellenberger, Bioresponsive nanosensors in medical imaging. *J R Soc Interface.* **(2010)** 7 Suppl 1, S83-S91.
- [9] R. Ross, Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* **(1999)** 340, 115-126.
- [10] G. K. Hansson, Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *New England Journal of Medicine.* **(2005)** 352, 1685-1695.
- [11] G. Assmann, H. Schulte, A. von Eckardstein, Y. Huang, High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk. The PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis.* **(1996)** 124 Suppl, S11-S20.
- [12] H. Hu, G. N. Pierce, G. Zhong, The atherogenic effects of chlamydia are dependent on serum cholesterol and specific to *Chlamydia pneumoniae*. *J Clin Invest.* **(1999)** 103, 747-753.
- [13] C. Mlot, Chlamydia linked to atherosclerosis. *Science.* **(1996)** 272, 1422-1420.
- [14] L. J. Ignarro, Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J Physiol Pharmacol.* **(2002)** 53, 503-514.
- [15] J. F. Cornhill, M. R. Roach, A quantitative study of the localization of atherosclerotic lesions in the rabbit aorta. *Atherosclerosis.* **(1976)** 23, 489-501.
- [16] P. Libby, Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* **(2002)** 420, 868-874.

- [17] W. Palinski, M. E. Rosenfeld, S. Ylä-Herttuala, G. C. Gurtner, S. S. Socher, S. W. Butler, S. Parthasarathy, T. E. Carew, D. Steinberg, J. L. Witztum, Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1989) 86, 1372-1376.
- [18] M. I. Cybulsky, M. A. Gimbrone, Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science.* (1991) 251, 788-791.
- [19] S. D. Cushing, J. A. Berliner, A. J. Valente, M. C. Territo, M. Navab, F. Parhami, R. Gerrity, C. J. Schwartz, A. M. Fogelman, Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* (1990) 87, 5134-5138.
- [20] S. K. Clinton, R. Underwood, L. Hayes, M. L. Sherman, D. W. Kufe, P. Libby, Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis. *The American journal of pathology.* (1992) 140, 301.
- [21] M. E. Rosenfeld, S. Ylä-Herttuala, B. A. Lipton, V. Ord, J. L. Witztum, D. Steinberg, Macrophage colony-stimulating factor mRNA and protein in atherosclerotic lesions of rabbits and humans. *The American journal of pathology.* (1992) 140, 291.
- [22] P. Libby, P. M. Ridker, G. K. Hansson, Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature.* (2011) 473, 317-325.
- [23] C. Strydom, B. Chandler, S. Glagov, R. Guyton, W. Insull, E. Rosenfeld, A. Schaffer, J. Schwartz, D. Wagner, W. Wissler, 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, 840-856.
- [24] E. Falk, Pathogenesis of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* (2006) 47, C7-12.
- [25] P. Fogelstrand, J. Borén, Retention of atherogenic lipoproteins in the artery wall and its role in atherogenesis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* (2012) 22, 1-7.
- [26] R. Virmani, A. P. Burke, A. Farb, F. D. Kolodgie, Pathology of the unstable plaque. *Progress in Cardiovascular Diseases.* (2002) 44, 349-356.
- [27] J. N. Wilcox, K. M. Smith, S. M. Schwartz, D. Gordon, Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* (1989) 86, 2839-2843.
- [28] P. Libby, The molecular mechanisms of the thrombotic complications of atherosclerosis. *J Intern Med.* (2008) 263, 517-527.
- [29] V. Fuster, P. R. Moreno, Z. A. Fayad, R. Corti, J. J. Badimon, Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts. *J Am Coll Cardiol.* (2005) 46, 937-954.
- [30] L. Badimon, G. Vilahur, Platelets, arterial thrombosis and cerebral ischemia. *Cerebrovasc Dis.* (2007) 24 Suppl 1, 30-39.
- [31] A. P. Burke, R. Virmani, Z. Galis, C. C. Haudenschild, J. E. Muller, Task force# 2 - what is the pathologic basis for new atherosclerosis imaging techniques? *Journal of the American College of Cardiology.* (2003) 41, 1874-1886.
- [32] M. J. Davies, A. Thomas, Thrombosis and acute coronary-artery lesions in sudden cardiac ischemic death. *N Engl J Med.* (1984) 310, 1137-1140.

- [33] E. Falk, Unstable angina with fatal outcome: dynamic coronary thrombosis leading to infarction and/or sudden death. Autopsy evidence of recurrent mural thrombosis with peripheral embolization culminating in total vascular occlusion. *Circulation*. (1985) 71, 699-708.
- [34] R. Moreno, E. Falk, F. Palacios, B. Newell, V. Fuster, T. Fallon, Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture. *Circulation*. (1994) 90, 775-778.
- [35] R. T. Lee, P. Libby, The unstable atheroma. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. (1997) 17, 1859-1867.
- [36] P. K. Shah, Z. S. Galis, Matrix metalloproteinase hypothesis of plaque rupture players keep piling up but questions remain. *Circulation*. (2001) 104, 1878-1880.
- [37] Z. S. Galis, G. K. Sukhova, M. W. Lark, P. Libby, Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *Journal of Clinical Investigation*. (1994) 94, 2493.
- [38] K. Sukhova, U. Schonbeck, E. Rabkin, J. Schoen, R. Poole, C. Billingham, P. Libby, Evidence for Increased Collagenolysis by Interstitial Collagenases-1 and -3 in Vulnerable Human Atheromatous Plaques. *Circulation*. (1999) 99, 2503-2509.
- [39] C. M. Shanahan, N. R. Cary, J. C. Metcalfe, P. L. Weissberg, High expression of genes for calcification-regulating proteins in human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*. (1994) 93, 2393-2402.
- [40] C. R. Dhore, J. P. Cleutjens, E. Lutgens, K. B. Cleutjens, P. P. Geusens, P. J. Kitslaar, J. H. Tordoir, H. M. Spronk, C. Vermeer, M. J. Daemen, Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. (2001) 21, 1998-2003.
- [41] I. Nadra, J. C. Mason, P. Philippidis, O. Florey, C. D. Smythe, G. M. McCarthy, R. C. Landis, D. O. Haskard, Proinflammatory activation of macrophages by basic calcium phosphate crystals via protein kinase C and MAP kinase pathways: a vicious cycle of inflammation and arterial calcification? *Circ Res*. (2005) 96, 1248-1256.
- [42] V. P. Iyemere, D. Proudfoot, P. L. Weissberg, C. M. Shanahan, Vascular smooth muscle cell phenotypic plasticity and the regulation of vascular calcification. *J Intern Med*. (2006) 260, 192-210.
- [43] R. Virmani, F. D. Kolodgie, A. P. Burke, A. V. Finn, H. K. Gold, T. N. Tulenko, S. P. Wrenn, J. Narula, Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. (2005) 25, 2054-2061.
- [44] K. Sakakura, M. Nakano, F. Otsuka, E. Ladich, F. D. Kolodgie, R. Virmani, Pathophysiology of atherosclerosis plaque progression. *Heart Lung Circ*. (2013) 22, 399-411.
- [45] A. Farb, A. P. Burke, A. L. Tang, T. Y. Liang, P. Mannan, J. Smialek, R. Virmani, Coronary plaque erosion without rupture into a lipid core. A frequent cause of coronary thrombosis in sudden coronary death. *Circulation*. (1996) 93, 1354-1363.
- [46] N. Wilck, A. Ludwig, Targeting the Ubiquitin-Proteasome System in Atherosclerosis: Status Quo, Challenges, and Perspectives. *Antioxid Redox Signal*. (2014).
- [47] J. Masuda, R. Ross, Atherogenesis during low level hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Fatty streak formation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. (1990) 10, 164-177.

- [48] R. G. Gerrity, The role of the monocyte in atherogenesis: II. Migration of foam cells from atherosclerotic lesions. *The American journal of pathology*. (1981) 103, 191.
- [49] M. Buja, T. Kita, L. Goldstein, Y. Watanabe, S. Brown, Cellular pathology of progressive atherosclerosis in the WHHL rabbit. An animal model of familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. (1983) 3, 87-101.
- [50] A. Daugherty, Mouse models of atherosclerosis. *The American journal of the medical sciences*. (2002) 323, 3-10.
- [51] K. S. Meir, E. Leitersdorf, Atherosclerosis in the apolipoprotein-E-deficient mouse: a decade of progress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. (2004) 24, 1006-1014.
- [52] A. S. Plump, J. D. Smith, T. Hayek, K. Aalto-Setälä, A. Walsh, J. G. Verstuyft, E. M. Rubin, J. L. Breslow, Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*. (1992) 71, 343-353.
- [53] S. H. Zhang, R. L. Reddick, J. A. Piedrahita, N. Maeda, Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*. (1992) 258, 468-471.
- [54] J. Jawien, P. Nastalek, R. Korbut, Mouse models of experimental atherosclerosis. *Journal of Physiology and Pharmacology*. (2004) 55, 503-517.
- [55] S. Zadelaar, R. Kleemann, L. Verschuren, J. de Vries-Van der Weij, J. van der Hoorn, H. M. Princen, T. Kooistra, Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. (2007) 27, 1706-1721.
- [56] H. Morneburg, Bildgebende Systeme für die medizinische Diagnostik : Röntgendiagnostik und Angiographie, Computertomographie, Nuklearmedizin, Magnetresonanztomographie, Sonographie, Integrierte Informationssysteme. (Publicis MCD Verl., Erlangen, (1995).
- [57] M. Rudin, R. Weissleder, Molecular imaging in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov*. (2003) 2, 123-131.
- [58] R. Weissleder, M. J. Pittet, Imaging in the era of molecular oncology. *Nature*. (2008) 452, 580-589.
- [59] T. F. Massoud, S. S. Gambhir, Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes Dev*. (2003) 17, 545-580.
- [60] J. P. Ridgway, Cardiovascular magnetic resonance physics for clinicians: part I. *J Cardiovasc Magn Reson*. (2010) 12, 71.
- [61] M. R. Goldman, G. M. Pohost, Principles of Nuclear Magnetic Resonance Imaging. *Radiology*. (1982) 143, 157-168.
- [62] P. Armstrong, S. F. Keevil, Magnetic resonance imaging--1: Basic principles of image production. *BMJ*. (1991) 303, 35-40.
- [63] C. E. Brown, J. H. Battocletti, L. F. Johnson, Nuclear magnetic resonance (NMR) in clinical pathology: current trends. *Clin Chem*. (1984) 30, 606-618.
- [64] H. H. Schild, MRI made easy. (H. Heenemann GmbH), Berlin, (2012).
- [65] R. G. Henderson, Nuclear magnetic resonance imaging: a review. *Journal of the Royal Society of Medicine*. (1983) 76, 206.
- [66] D. Ho, X. Sun, S. Sun, Monodisperse magnetic nanoparticles for theranostic applications. *Acc Chem Res*. (2011) 44, 875-882.

- [67] P. Caravan, J. J. Ellison, T. J. McMurry, R. B. Lauffer, Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications. *Chemical Reviews*. (1999) 99, 2293-2352.
- [68] M. L. Wood, P. A. Hardy, Proton relaxation enhancement. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. (1993) 3, 149-156.
- [69] J. D. Biglands, A. Radjenovic, J. P. Ridgway, Cardiovascular magnetic resonance physics for clinicians: Part II. *J Cardiovasc Magn Reson*. (2012) 14, 66.
- [70] H. -J. Weinmann, R. C. Brasch, W. -R. Press, G. E. Wesbey, Characteristics of gadolinium-DTPA complex: a potential NMR contrast agent. *American Journal of Roentgenology*. (1984) 142, 619-624.
- [71] D. Zhu, F. Liu, L. Ma, D. Liu, Z. Wang, Nanoparticle-based systems for t1-weighted magnetic resonance imaging contrast agents. *Int J Mol Sci*. (2013) 14, 10591-10607.
- [72] P. Choudhury, MRI and Characterization of Atherosclerotic Plaque: Emerging Applications and Molecular Imaging. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. (2002) 22, 1065-1074.
- [73] B. Bonnemain, Superparamagnetic Agents in magnetic resonance imaging: physicochemical characteristics and clinical applications a review. *Journal of drug targeting*. (1998) 6, 167-174.
- [74] J. T. Ferrucci, D. D. Stark, Iron oxide-enhanced MR imaging of the liver and spleen: review of the first 5 years. *AJR. American journal of roentgenology*. (1990) 155, 943-950.
- [75] C. Chambon, O. Clement, A. Le Blanche, E. Schouman-Claeys, G. Frija, Superparamagnetic iron oxides as positive MR contrast agents: in vitro and in vivo evidence. *Magnetic resonance imaging*. (1993) 11, 509-519.
- [76] C. Corot, P. Robert, J. M. Idée, M. Port, Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. *Adv Drug Deliv Rev*. (2006) 58, 1471-1504.
- [77] M. A. Kirchin, G. Pirovano, C. Venetianer, A. Spinazzi, Safety assessment of gadobenate dimeglumine (MultiHance®): Extended clinical experience from phase I studies to post-marketing surveillance. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. (2001) 14, 281-294.
- [78] K. Shamsi, E. K. Yucel, P. Chamberlin, A summary of safety of gadofosveset (MS-325) at 0.03 mmol/kg body weight dose: phase II and phase III clinical trials data. *Investigative radiology*. (2006) 41, 822-830.
- [79] C. U. Herborn, E. Honold, M. Wolf, J. Kemper, S. Kinner, G. Adam, J. Barkhausen, Clinical safety and diagnostic value of the gadolinium chelate gadoterate meglumine (Gd-DOTA). *Investigative radiology*. (2007) 42, 58-62.
- [80] M. Taupitz, N. Stolzenburg, M. Ebert, J. Schnorr, R. Hauptmann, H. Kratz, B. Hamm, S. Wagner, Gadolinium-containing magnetic resonance contrast media: investigation on the possible transchelation of Gd<sup>3+</sup> to the glycosaminoglycan heparin. *Contrast Media Mol Imaging*. (2013) 8, 108-116.
- [81] T. Grobner, Gadolinium--a specific trigger for the development of nephrogenic fibrosing dermopathy and nephrogenic systemic fibrosis? *Nephrol Dial Transplant*. (2006) 21, 1104-1108.
- [82] J. Jamboti, Strong association between the use of gadolinium-based contrast agents with nephrogenic fibrosing dermopathy/nephrogenic systemic fibrosis. *Intern Med J*. (2007).

- [83] A. K. Gupta, M. Gupta, Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*. (2005) 26, 3995-4021.
- [84] J. T. Ferrucci, Iron oxide enhanced MR imaging of the liver and spleen: review of the first five years. *Keio J Med*. (1991) 40, 206-214.
- [85] A. -H. Lu, E. Salabas, F. Schüth, Magnetische Nanopartikel: Synthese, Stabilisierung, Funktionalisierung und Anwendung. *Angewandte Chemie*. (2007) 119, 1242-1266.
- [86] T. Osaka, T. Matsunaga, T. Nakanishi, A. Arakaki, D. Niwa, H. Iida, Synthesis of magnetic nanoparticles and their application to bioassays. *Anal Bioanal Chem*. (2006) 384, 593-600.
- [87] H. Itrich, K. Peldschus, N. Raabe, M. Kaul, G. Adam, Superparamagnetic iron oxide nanoparticles in biomedicine: applications and developments in diagnostics and therapy. *Rofo*. (2013) 185, 1149-1166.
- [88] S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. Vander Elst, R. N. Muller, Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem Rev*. (2008) 108, 2064-2110.
- [89] M. Di Marco, I. Guilbert, M. Port, C. Robic, P. Couvreur, C. Dubernet, Colloidal stability of ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO) particles with different coatings. *Int J Pharm*. (2007) 331, 197-203.
- [90] A. Hajdú, E. Illés, E. Tombácz, I. Borbáth, Surface charging, polyanionic coating and colloid stability of magnetite nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. (2009) 347, 104-108.
- [91] Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones, J. Dobson, Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of physics D: Applied physics*. (2003) 36, R167.
- [92] B. Issa, I. M. Obaidat, B. A. Albiss, Y. Haik, Magnetic nanoparticles: surface effects and properties related to biomedicine applications. *Int J Mol Sci*. (2013) 14, 21266-21305.
- [93] D. K. Kim, M. Mikhaylova, Y. Zhang, M. Muhammed, Protective coating of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Chemistry of Materials*. (2003) 15, 1617-1627.
- [94] R. S. Molday, D. Mackenzie, Immunospecific ferromagnetic iron-dextran reagents for the labeling and magnetic separation of cells. *Journal of immunological methods*. (1982) 52, 353-367.
- [95] C. C. Berry, S. Wells, S. Charles, A. S. Curtis, Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro. *Biomaterials*. (2003) 24, 4551-4557.
- [96] J. K. Li, N. Wang, X. S. Wu, A novel biodegradable system based on gelatin nanoparticles and poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres for protein and peptide drug delivery. *J Pharm Sci*. (1997) 86, 891-895.
- [97] M. D. Butterworth, L. Illum, S. S. Davis, Preparation of ultrafine silica-and PEG-coated magnetite particles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. (2001) 179, 93-102.
- [98] Y. Sahoo, A. Goodarzi, M. T. Swihart, T. Y. Ohulchanskyy, N. Kaur, E. P. Furlani, P. N. Prasad, Aqueous ferrofluid of magnetite nanoparticles: Fluorescence labeling and magnetophoretic control. *J Phys Chem B*. (2005) 109, 3879-3885.

- [99] N. Fauconnier, J. N. Pons, J. Roger, A. Bee, Thiolation of Maghemite Nanoparticles by Dimercaptosuccinic Acid. *J Colloid Interface Sci.* (1997) 194, 427-433.
- [100] S. Benderbous, C. Corot, P. Jacobs, B. Bonnemain, Superparamagnetic agents: physicochemical characteristics and preclinical imaging evaluation. *Acad Radiol.* (1996) 3 Suppl 2, S292-S294.
- [101] S. Stolnik, L. Illum, S. S. Davis, Long circulating microparticulate drug carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews.* (1995) 16, 195-214.
- [102] A. Antonelli, C. Sfara, L. Mosca, E. Manuali, M. Magnani, New Biomimetic Constructs for Improved *In Vivo* Circulation of Superparamagnetic Nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology.* 8, 2270-2278.
- [103] U. Gaur, S. K. Sahoo, T. K. De, P. C. Ghosh, A. Maitra, P. K. Ghosh, Biodistribution of fluoresceinated dextran using novel nanoparticles evading reticuloendothelial system. *International journal of pharmaceutics.* (2000) 202, 1-10.
- [104] R. Weissleder, D. D. Stark, B. L. Engelstad, B. R. Bacon, C. C. Compton, D. L. White, P. Jacobs, J. Lewis, Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity. *AJR Am J Roentgenol.* (1989) 152, 167-173.
- [105] S. Salmaso, P. Caliceti, Stealth properties to improve therapeutic efficacy of drug nanocarriers. *J Drug Deliv.* (2013) 2013, 374252.
- [106] S. G. Ruehm, C. Corot, P. Vogt, S. Kolb, J. F. Debatin, Magnetic resonance imaging of atherosclerotic plaque with ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide in hyperlipidemic rabbits. *Circulation.* (2001) 103, 415-422.
- [107] D. Pouliquen, J. J. Le Jeune, R. Perdrisot, A. Ermias, P. Jallet, Iron oxide nanoparticles for use as an MRI contrast agent: pharmacokinetics and metabolism. *Magnetic resonance imaging.* (1991) 9, 275-283.
- [108] T. Allkemper, C. Bremer, L. Matuszewski, W. Ebert, P. Reimer, Contrast-enhanced blood-pool MR angiography with optimized iron oxides: effect of size and dose on vascular contrast enhancement in rabbits. *Radiology.* (2002) 223, 432-438.
- [109] A. Hemmingsson, J. Carlsten, A. Ericsson, J. Klaveness, G. O. Sperber, K. -Å. Thuomas, Relaxation enhancement of the dog liver and spleen by biodegradable superparamagnetic particles in proton magnetic resonance imaging. *Acta Radiologica.* (1987) 28, 703-705.
- [110] R. Weissleder, G. Elizondo, J. Wittenberg, A. S. Lee, L. Josephson, T. J. Brady, Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: an intravenous contrast agent for assessing lymph nodes with MR imaging. *Radiology.* (1990) 175, 494-498.
- [111] E. Senéterre, R. Weissleder, D. Jaramillo, P. Reimer, A. S. Lee, T. J. Brady, J. Wittenberg, Bone marrow: ultrasmall superparamagnetic iron oxide for MR imaging. *Radiology.* (1991) 179, 529-533.
- [112] A. F. Kopp, M. Laniado, F. Dammann, W. Stern, E. Grönwäller, T. Balzer, C. Schimpfky, C. D. Claussen, MR imaging of the liver with Resovist: safety, efficacy, and pharmacodynamic properties. *Radiology.* (1997) 204, 749-756.
- [113] R. Weissleder, P. F. Hahn, D. D. Stark, E. Rummeny, S. Saini, J. Wittenberg, J. T. Ferrucci, MR imaging of splenic metastases: ferrite-enhanced detection in rats. *AJR Am J Roentgenol.* (1987) 149, 723-726.
- [114] C. Stets, S. Brandt, F. Wallis, J. Buchmann, F. J. Gilbert, S. H. Heywang-Köbrunner, Axillary lymph node metastases: a statistical analysis of various parameters in MRI with USPIO. *J Magn Reson Imaging.* (2002) 16, 60-68.

- [115] B. B. Pultrum, E. J. van der Jagt, H. L. van Westreenen, H. M. van Dullemen, P. Kappert, H. Groen, J. Sietsma, M. Oudkerk, J. T. Plukker, G. M. van Dam, Detection of lymph node metastases with ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO)-enhanced magnetic resonance imaging in oesophageal cancer: a feasibility study. *Cancer Imaging*. (2009) 9, 19-28.
- [116] R. R. Edelman, MR angiography: present and future. *AJR. American journal of roentgenology*. (1993) 161, 1-11.
- [117] W. W. Mayo-Smith, S. Saini, G. Slater, J. A. Kaufman, P. Sharma, P. F. Hahn, MR contrast material for vascular enhancement: value of superparamagnetic iron oxide. *AJR. American journal of roentgenology*. (1996) 166, 73-77.
- [118] H. Frank, R. Weissleder, T. J. Brady, Enhancement of MR angiography with iron oxide: preliminary studies in whole-blood phantom and in animals. *AJR Am J Roentgenol*. (1994) 162, 209-213.
- [119] Y. Anzai, M. R. Prince, T. L. Chenevert, J. H. Maki, F. L. M. London, S. J. McLachlan, MR angiography with an ultrasmall superparamagnetic iron oxide blood pool agent. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. (1997) 7, 209-214.
- [120] A. E. Stillman, N. Wilke, D. Li, M. Haacke, S. McLachlan, Ultrasmall superparamagnetic iron oxide to enhance MRA of the renal and coronary arteries: studies in human patients. *J Comput Assist Tomogr*. (1996) 20, 51-55.
- [121] M. Taupitz, J. Schnorr, C. Abramjuk, S. Wagner, H. Pilgrimm, H. Hünigen, B. Hamm, New generation of monomer-stabilized very small superparamagnetic iron oxide particles (VSOP) as contrast medium for MR angiography: preclinical results in rats and rabbits. *J Magn Reson Imaging*. (2000) 12, 905-911.
- [122] S. A. Schmitz, M. Taupitz, S. Wagner, K. J. Wolf, D. Beyersdorff, B. Hamm, Magnetic resonance imaging of atherosclerotic plaques using superparamagnetic iron oxide particles. *J Magn Reson Imaging*. (2001) 14, 355-361.
- [123] M. E. Kooi, V. C. Cappendijk, K. B. Cleutjens, A. G. Kessels, P. J. Kitslaar, M. Borgeers, P. M. Frederik, M. J. Daemen, J. M. van Engelshoven, Accumulation of ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide in human atherosclerotic plaques can be detected by in vivo magnetic resonance imaging. *Circulation*. (2003) 107, 2453-2458.
- [124] A. Trivedi, M. U-King-Im, J. Graves, J. Kirkpatrick, H. Gillard, Noninvasive imaging of carotid plaque inflammation. *Neurology*. (2004) 63, 187-188.
- [125] S. A. Schmitz, S. E. Coupland, R. Gust, S. Winterhalter, S. Wagner, M. Kresse, W. Semmler, K. J. Wolf, Superparamagnetic iron oxide-enhanced MRI of atherosclerotic plaques in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Invest Radiol*. (2000) 35, 460-471.
- [126] A. D. Yancy, A. R. Olzinski, T. C. Hu, S. C. Lenhard, K. Aravindhan, S. M. Gruver, P. M. Jacobs, R. N. Willette, B. M. Jucker, Differential uptake of ferumoxtran-10 and ferumoxytol, ultrasmall superparamagnetic iron oxide contrast agents in rabbit: critical determinants of atherosclerotic plaque labeling. *J Magn Reson Imaging*. (2005) 21, 432-442.
- [127] M. Sigovan, L. Bousset, A. Sulaiman, D. Sappey-Marinié, H. Alsaïd, C. Desbleds-Mansard, D. Ibarrola, D. Gamondès, C. Corot, E. Lancelot, J. S. Raynaud, V. Vives, C. Laclédère, X. Violas, P. C. Douek, E. Canet-Soulas, Rapid-clearance iron nanoparticles for inflammation imaging of atherosclerotic plaque: initial experience in animal model. *Radiology*. (2009) 252, 401-409.



- [128] K. Morishige, D. F. Kacher, P. Libby, L. Josephson, P. Ganz, R. Weissleder, M. Aikawa, High-resolution magnetic resonance imaging enhanced with superparamagnetic nanoparticles measures macrophage burden in atherosclerosis. *Circulation*. (2010) 122, 1707-1715.
- [129] K. Tsuchiya, N. Nitta, A. Sonoda, H. Otani, M. Takahashi, K. Murata, M. Shiomi, Y. Tabata, S. Nohara, Atherosclerotic imaging using 4 types of superparamagnetic iron oxides: new possibilities for mannan-coated particles. *Eur J Radiol*. (2013) 82, 1919-1925.
- [130] S. Litovsky, Superparamagnetic Iron Oxide-Based Method for Quantifying Recruitment of Monocytes to Mouse Atherosclerotic Lesions In Vivo: Enhancement by Tissue Necrosis Factor-alpha, Interleukin-1beta, and Interferon-gamma. *Circulation*. (2003) 107, 1545-1549.
- [131] J. B. Morris, A. R. Olzinski, R. E. Bernard, K. Aravindhan, R. C. Mirabile, R. Boyce, R. N. Willette, B. M. Jucker, p38 MAPK inhibition reduces aortic ultrasmall superparamagnetic iron oxide uptake in a mouse model of atherosclerosis: MRI assessment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. (2008) 28, 265-271.
- [132] G. Klug, T. Kampf, C. Ziener, M. Parczyk, E. Bauer, V. Herold, E. Rommel, P. M. Jakob, W. R. Bauer, Murine atherosclerotic plaque imaging with the USPIO Ferumoxtran-10. *Front Biosci (Landmark Ed)*. (2009) 14, 2546-2552.
- [133] M. R. Makowski, G. Varma, A. J. Wiethoff, A. Smith, K. Mattock, C. H. Jansen, A. Warley, M. Taupitz, T. Schaeffter, R. M. Botnar, Noninvasive assessment of atherosclerotic plaque progression in ApoE<sup>-/-</sup> mice using susceptibility gradient mapping. *Circ Cardiovasc Imaging*. (2011) 4, 295-303.
- [134] M. Michalska, L. Machtoub, H. D. Manthey, E. Bauer, V. Herold, G. Krohne, G. Lykowsky, M. Hildenbrand, T. Kampf, P. Jakob, A. Zerneck, W. R. Bauer, Visualization of vascular inflammation in the atherosclerotic mouse by ultrasmall superparamagnetic iron oxide vascular cell adhesion molecule-1-specific nanoparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. (2012) 32, 2350-2357.
- [135] C. Burtea, S. Ballet, S. Laurent, O. Rousseaux, A. Dencausse, W. Gonzalez, M. Port, C. Corot, L. Vander Elst, R. N. Muller, Development of a magnetic resonance imaging protocol for the characterization of atherosclerotic plaque by using vascular cell adhesion molecule-1 and apoptosis-targeted ultrasmall superparamagnetic iron oxide derivatives. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. (2012) 32, e36-e48.
- [136] F. M. Segers, B. den Adel, I. Bot, L. M. van der Graaf, E. P. van der Veer, W. Gonzalez, I. Raynal, M. de Winther, W. K. Wodzig, R. E. Poelmann, T. J. van Berkel, L. van der Weerd, E. A. Biessen, Scavenger receptor-AI-targeted iron oxide nanoparticles for in vivo MRI detection of atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. (2013) 33, 1812-1819.
- [137] H. Pilgrimm, Superparamagnetische Teilchen mit vergrößerter R1-Relaxivität, Verfahren zur Herstellung und deren Verwendung. *Patent WO/1997/035200* (1997).
- [138] Y. S. Kang, S. Risbud, J. F. Rabolt, P. Stroeve, Synthesis and characterization of nanometer-size Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles. *Chemistry of Materials*. (1996) 8, 2209-2211.
- [139] N. Fauconnier, A. Bee, J. Roger, J. N. Pons, Synthesis of aqueous magnetic liquids by surface complexation of maghemite nanoparticles. *Journal of molecular liquids*. (1999) 83, 233-242.
- [140] J. M. Millward, J. Schnorr, M. Taupitz, S. Wagner, J. T. Wuerfel, C. Infante-Duarte, Iron oxide magnetic nanoparticles highlight early involvement of the choroid plexus in central nervous system inflammation. *ASN Neuro*. (2013) 5, e00110.

- [141] E. Trogan, Z. A. Fayad, V. V. Itskovich, J. G. Aguinaldo, V. Mani, J. T. Fallon, I. Chereshev, E. A. Fisher, Serial studies of mouse atherosclerosis by in vivo magnetic resonance imaging detect lesion regression after correction of dyslipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2004) 24, 1714-1719.
- [142] S. R. Snyder, U. Heinen, Characterization of magnetic nanoparticles for therapy and diagnostics. *Ettlingen, Germany: Bruker BioSpin.* (2010)
- [143] B. Hattendorf, C. Latkoczy, D. Günther, Laser ablation-ICPMS. *Anal Chem.* (2003) 75, 341A-347A.
- [144] T. Ishikawa, S. Kataoka, K. Kandori, The influence of carboxylate ions on the growth of  $\beta$ -FeOOH particles. *Journal of materials science.* (1993) 28, 2693-2698.
- [145] C. Yee, G. Kataby, A. Ulman, T. Prozorov, H. White, A. King, M. Rafailovich, J. Sokolov, A. Gedanken, Self-assembled monolayers of alkanesulfonic and-phosphonic acids on amorphous iron oxide nanoparticles. *Langmuir.* (1999) 15, 7111-7115.
- [146] D. Panias, M. Taxiarchou, I. Paspaliaris, A. Kontopoulos, Mechanisms of dissolution of iron oxides in aqueous oxalic acid solutions. *Hydrometallurgy.* (1996) 42, 257-265.
- [147] S. Wagner, J. Schnorr, A. Ludwig, V. Stangl, M. Ebert, B. Hamm, M. Taupitz, Contrast-enhanced MR imaging of atherosclerosis using citrate-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles: calcifying microvesicles as imaging target for plaque characterization. *Int J Nanomedicine.* (2013) 8, 767-779.
- [148] P. Harrison, The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics.* (1996) 1275, 161-203.
- [149] P. Dusek, M. Dezortova, J. Wuerfel, Imaging of iron. *Int Rev Neurobiol.* (2013) 110, 195-239.
- [150] S. C. Pang, S. F. Chin, M. A. Anderson, Redox equilibria of iron oxides in aqueous-based magnetite dispersions: effect of pH and redox potential. *J Colloid Interface Sci.* (2007) 311, 94-101.
- [151] M. Szekeres, I. Y. Tóth, E. Illés, A. Hajdú, I. Zupkó, K. Farkas, G. Oszlanczi, L. Tiszlavicz, E. Tombácz, Chemical and colloidal stability of carboxylated core-shell magnetite nanoparticles designed for biomedical applications. *Int J Mol Sci.* (2013) 14, 14550-14574.
- [152] M. Di Marco, C. Sadun, M. Port, I. Guilbert, P. Couvreur, C. Dubernet, Physicochemical characterization of ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles (USPIO) for biomedical application as MRI contrast agents. *Int J Nanomedicine.* (2007) 2, 609-622.
- [153] J. Kingston, M. Posner, P. Quirk, Anion adsorption by goethite and gibbsite. *Journal of Soil Science.* (1972) 23, 177-192.
- [154] C. Wilhelm, F. Gazeau, Universal cell labelling with anionic magnetic nanoparticles. *Biomaterials.* (2008) 29, 3161-3174.
- [155] R. M. Cornell, P. W. Schindler, Infrared study of the adsorption of hydroxycarboxylic acids on  $\alpha$ -FeOOH and amorphous Fe (III) hydroxide. *Colloid and Polymer Science.* (1980) 258, 1171-1175.
- [156] G. Goloverda, B. Jackson, C. Kidd, V. Kolesnichenko, Synthesis of ultrasmall magnetic iron oxide nanoparticles and study of their colloid and surface chemistry. *J Magn Magn Mater.* (2009) 321, 1372-1376.

- [157] M. A. Hodenius, T. Niendorf, G. A. Krombach, W. Richtering, T. Eckert, H. Lueken, M. Speldrich, R. W. Günther, M. Baumann, S. J. Soenen, M. De Cuyper, T. Schmitz-Rode, Synthesis, physicochemical characterization and MR relaxometry of aqueous ferrofluids. *J Nanosci Nanotechnol.* (2008) 8, 2399-2409.
- [158] S. Neveu, A. Bee, M. Robineau, D. Talbot, Size-Selective Chemical Synthesis of Tartrate Stabilized Cobalt Ferrite Ionic Magnetic Fluid. *Journal of Colloid and Interface Science.* (2002) 255, 293-298.
- [159] I. Fishbein, I. S. Alferiev, O. Nyanguile, R. Gaster, J. M. Vohs, G. S. Wong, H. Felderman, I. W. Chen, H. Choi, R. L. Wilensky, R. J. Levy, Bisphosphonate-mediated gene vector delivery from the metal surfaces of stents. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2006) 103, 159-164.
- [160] J. Galezowska, E. Gumienna-Kontecka, Phosphonates, their complexes and bio-applications: A spectrum of surprising diversity. *Coordination Chemistry Reviews.* (2012) 256, 105-124.
- [161] Y. Lalatonne, C. Paris, J. M. Serfaty, P. Weinmann, M. Lecouvey, L. Motte, Bisphosphonates-ultra small superparamagnetic iron oxide nanoparticles: a platform towards diagnosis and therapy. *Chem Commun (Camb).* (2008) 2553-2555.
- [162] P. Mowat, F. Franconi, C. Chapon, L. Lemaire, J. Dorat, F. Hindré, J. P. Benoit, P. Richomme, J. J. Le Jeune, Evaluating SPIO-labelled cell MR efficiency by three-dimensional quantitative T2\* MRI. *NMR Biomed.* (2007) 20, 21-27.
- [163] G. J. Delcroix, M. Jacquart, L. Lemaire, L. Sindji, F. Franconi, J. J. Le Jeune, C. N. Montero-Menei, Mesenchymal and neural stem cells labeled with HEDP-coated SPIO nanoparticles: in vitro characterization and migration potential in rat brain. *Brain Res.* (2009) 1255, 18-31.
- [164] A. L. Miller, Dimercaptosuccinic acid (DMSA), a non-toxic, water-soluble treatment for heavy metal toxicity. *Altern Med Rev.* (1998) 3, 199-207.
- [165] S. Bradberry, A. Vale, Dimercaptosuccinic acid (succimer; DMSA) in inorganic lead poisoning. *Clin Toxicol (Phila).* (2009) 47, 617-631.
- [166] A. Halbreich, J. Roger, J. N. Pons, D. Geldwerth, M. F. Da Silva, M. Roudier, J. C. Bacri, Biomedical applications of maghemite ferrofluid. *Biochimie.* (1998) 80, 379-390.
- [167] C. R. Valois, J. M. Braz, E. S. Nunes, M. A. Vinolo, E. C. Lima, R. Curi, W. M. Kuebler, R. B. Azevedo, The effect of DMSA-functionalized magnetic nanoparticles on transendothelial migration of monocytes in the murine lung via a beta2 integrin-dependent pathway. *Biomaterials.* (2010) 31, 366-374.
- [168] P. Chen, Y. Zhang, K. Xu, Z. Xu, W. Liu, N. Gu, Stability of Hydrophilic Magnetic Nanoparticles Under Biologically Relevant Conditions. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* (2008) 8, 6260-6265.
- [169] Z. Zhou, L. Wang, X. Chi, J. Bao, L. Yang, W. Zhao, Z. Chen, X. Wang, X. Chen, J. Gao, Engineered iron-oxide-based nanoparticles as enhanced T1 contrast agents for efficient tumor imaging. *ACS Nano.* (2013) 7, 3287-3296.
- [170] C. Corot, K. G. Petry, R. Trivedi, A. Saleh, C. Jonkmanns, J. F. Le Bas, E. Blezer, M. Rausch, B. Brochet, P. Foster-Gareau, D. Balériaux, S. Gaillard, V. Dousset, Macrophage imaging in central nervous system and in carotid atherosclerotic plaque using ultrasmall superparamagnetic iron oxide in magnetic resonance imaging. *Invest Radiol.* (2004) 39, 619-625.

- [171] T. Y. Tang, K. H. Muller, M. J. Graves, Z. Y. Li, S. R. Walsh, V. Young, U. Sadat, S. P. Howarth, J. H. Gillard, Iron oxide particles for atheroma imaging. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2009) 29, 1001-1008.
- [172] M. Sigovan, A. Bessaad, H. Alsaïd, E. Lancelot, C. Corot, B. Neyran, N. Provost, Z. Majd, M. Breisse, E. Canet-Soulas, Assessment of age modulated vascular inflammation in ApoE<sup>-/-</sup> mice by USPIO-enhanced magnetic resonance imaging. *Invest Radiol.* (2010) 45, 702-707.
- [173] M. Sigovan, E. Kaye, E. Lancelot, C. Corot, N. Provost, Z. Majd, M. Breisse, E. Canet-Soulas, Anti-inflammatory drug evaluation in ApoE<sup>-/-</sup> mice by ultrasmall superparamagnetic iron oxide-enhanced magnetic resonance imaging. *Invest Radiol.* (2012) 47, 546-552.
- [174] R. B. Azevedo, C. R. A. Valois, S. B. Chaves, J. R. Silva, M. P. Garcia, Leukocyte transepithelial migration in lung induced by DMSA functionalized magnetic nanoparticles. *Cell Adhesion & Migration.* (2011) 5, 29-33.
- [175] R. Mejías, L. Gutiérrez, G. Salas, S. Pérez-Yagüe, T. M. Zotes, F. J. Lázaro, M. P. Morales, D. F. Barber, Long term biotransformation and toxicity of dimercaptosuccinic acid-coated magnetic nanoparticles support their use in biomedical applications. *J Control Release.* (2013) 171, 225-233.
- [176] M. Geppert, M. C. Hohnholt, K. Thiel, S. Nürnberger, I. Grunwald, K. Rezwani, R. Dringen, Uptake of dimercaptosuccinate-coated magnetic iron oxide nanoparticles by cultured brain astrocytes. *Nanotechnology.* (2011) 22, 145101.
- [177] K. Tsuchiya, N. Nitta, A. Sonoda, A. Nitta-Seko, S. Ohta, M. Takahashi, K. Murata, K. Mukaisho, M. Shiomi, Y. Tabata, S. Nohara, Evaluation of atherosclerotic lesions using dextran- and mannan-dextran-coated USPIO: MRI analysis and pathological findings. *Int J Nanomedicine.* (2012) 7, 2271-2280.
- [178] R. A. Trivedi, J. M. U-King-Im, M. J. Graves, J. J. Cross, J. Horsley, M. J. Goddard, J. N. Skepper, G. Quartey, E. Warburton, I. Joubert, L. Wang, P. J. Kirkpatrick, J. Brown, J. H. Gillard, In vivo detection of macrophages in human carotid atheroma: temporal dependence of ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide-enhanced MRI. *Stroke.* (2004) 35, 1631-1635.
- [179] G. Klug, L. Bauer, W. R. Bauer, Patterns of USPIO deposition in murine atherosclerosis., in *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2008) 28:e157.
- [180] R. Virmani, W. C. Roberts, Extravasated erythrocytes, iron, and fibrin in atherosclerotic plaques of coronary arteries in fatal coronary heart disease and their relation to luminal thrombus: frequency and significance in 57 necropsy patients and in 2958 five mm segments of 224 major epicardial coronary arteries. *Am Heart J.* (1983) 105, 788-797.
- [181] J. J. Boyle, H. A. Harrington, E. Piper, K. Elderfield, J. Stark, R. C. Landis, D. O. Haskard, Coronary intraplaque hemorrhage evokes a novel atheroprotective macrophage phenotype. *Am J Pathol.* (2009) 174, 1097-1108.
- [182] X. M. Yuan, W. L. Anders, A. G. Olsson, U. T. Brunk, Iron in human atheroma and LDL oxidation by macrophages following erythrophagocytosis. *Atherosclerosis.* (1996) 124, 61-73.
- [183] F. Y. Lee, T. S. Lee, C. C. Pan, A. L. Huang, L. Y. Chau, Colocalization of iron and ceroid in human atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis.* (1998) 138, 281-288.
- [184] J. B. Michel, R. Virmani, E. Arbustini, G. Pasterkamp, Intraplaque haemorrhages as the trigger of plaque vulnerability. *Eur Heart J.* (2011) 32, 1977-85, 1985a, 1985b, 1985c.

- [185] X. M. Yuan, W. Li, S. K. Baird, M. Carlsson, O. Melefors, Secretion of ferritin by iron-laden macrophages and influence of lipoproteins. *Free Radic Res.* (2004) 38, 1133-1142.
- [186] P. R. Moreno, K. R. Purushothaman, M. Purushothaman, P. Muntner, N. S. Levy, V. Fuster, J. T. Fallon, P. A. Lento, A. Winterstern, A. P. Levy, Haptoglobin genotype is a major determinant of the amount of iron in the human atherosclerotic plaque. *J Am Coll Cardiol.* (2008) 52, 1049-1051.
- [187] F. D. Kolodgie, H. K. Gold, A. P. Burke, D. R. Fowler, H. S. Kruth, D. K. Weber, A. Farb, L. J. Guerrero, M. Hayase, R. Kutys, Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *New England Journal of Medicine.* (2003) 349, 2316-2325.
- [188] A. S. Zadelaar, J. H. von der Thüsen, L. S. Boesten, R. C. Hoeben, M. M. Kockx, M. A. Versnel, T. J. van Berkel, L. M. Havekes, E. A. Biessen, B. J. van Vlijmen, Increased vulnerability of pre-existing atherosclerosis in ApoE-deficient mice following adenovirus-mediated Fas ligand gene transfer. *Atherosclerosis.* (2005) 183, 244-250.
- [189] A. C. Langheinrich, A. Michniewicz, D. G. Sedding, B. Lai, S. M. Jorgensen, R. M. Bohle, E. L. Ritman, Quantitative X-ray imaging of intraplaque hemorrhage in aortas of apoE(-)/LDL(-) double knockout mice. *Invest Radiol.* (2007) 42, 263-273.
- [190] T. S. Lee, M. S. Shiao, C. C. Pan, L. Y. Chau, Iron-deficient diet reduces atherosclerotic lesions in apoE-deficient mice. *Circulation.* (1999) 99, 1222-1229.
- [191] T. S. Lee, F. Y. Lee, J. H. Pang, L. Y. Chau, Erythrophagocytosis and iron deposition in atherosclerotic lesions. *Chin J Physiol.* (1999) 42, 17-23.
- [192] H. T. Lee, L. L. Chiu, T. S. Lee, H. L. Tsai, L. Y. Chau, Dietary iron restriction increases plaque stability in apolipoprotein-e-deficient mice. *J Biomed Sci.* (2003) 10, 510-517.
- [193] W. Li, M. Ostblom, L. H. Xu, A. Hellsten, P. Leanderson, B. Liedberg, U. T. Brunk, J. W. Eaton, X. M. Yuan, Cytocidal effects of atheromatous plaque components: the death zone revisited. *FASEB J.* (2006) 20, 2281-2290.
- [194] N. Stadler, R. A. Lindner, M. J. Davies, Direct detection and quantification of transition metal ions in human atherosclerotic plaques: evidence for the presence of elevated levels of iron and copper. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2004) 24, 949-954.
- [195] M. Moldovan, E. M. Krupp, A. E. Holliday, O. F. X. Donard, High resolution sector field ICP-MS and multicollector ICP-MS as tools for trace metal speciation in environmental studies: a review Presented at the 4th International Conference on High Resolution Sector Field ICP-MS, Venice, Italy, October 15-17, 2003. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry.* (2004) 19, 815.
- [196] M. Krachler, Environmental applications of single collector high resolution ICP-MS. *J Environ Monit.* (2007) 9, 790-804.
- [197] R. Barefoot, Determination of platinum group elements and gold in geological materials: a review of recent magnetic sector and laser ablation applications. *Analytica Chimica Acta.* (2004) 509, 119-125.
- [198] A. Taylor, S. Branch, M. P. Day, M. Patriarca, M. White, Atomic spectrometry update. Clinical and biological materials, foods and beverages. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry.* (2011) 26, 653.
- [199] J. Feldmann, A. Kindness, P. Ek, Laser ablation of soft tissue using a cryogenically cooled ablation cell. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry.* (2002) 17, 813-818.

- [200] J. L. Sullivan, Iron and the sex difference in heart disease risk. *Lancet*. (1981) 1, 1293-1294.
- [201] E. Chiancone, P. Ceci, A. Ilari, F. Ribacchi, S. Stefanini, Iron and proteins for iron storage and detoxification. *Biometals*. (2004) 17, 197-202.
- [202] R. Stocker, J. F. Keane, Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev*. (2004) 84, 1381-1478.
- [203] C. Rice-Evans, R. Burdon, Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Prog Lipid Res*. (1993) 32, 71-110.
- [204] W. Li, A. Hellsten, L. H. Xu, D. M. Zhuang, K. Jansson, U. T. Brunk, X. M. Yuan, Foam cell death induced by 7beta-hydroxycholesterol is mediated by labile iron-driven oxidative injury: mechanisms underlying induction of ferritin in human atheroma. *Free Radic Biol Med*. (2005) 39, 864-875.
- [205] X. Yuan, W. Li, The iron hypothesis of atherosclerosis and its clinical impact. *Annals of Medicine*. (2003) 35, 578-591.
- [206] J. H. Pang, M. J. Jiang, Y. L. Chen, F. W. Wang, D. L. Wang, S. H. Chu, L. Y. Chau, Increased ferritin gene expression in atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*. (1996) 97, 2204-2212.
- [207] R. B. Frankel, G. C. Papaefthymiou, G. D. Watt, Variation of superparamagnetic properties with iron loading in mammalian ferritin. *Hyperfine Interactions*. (1991) 66, 71-82.
- [208] A. R. Olzinski, G. H. Turner, R. E. Bernard, H. Karr, C. A. Cornejo, K. Aravindhan, B. Hoang, M. A. Ringenberg, P. Qin, K. B. Goodman, R. N. Willette, C. H. Macphee, B. M. Jucker, C. A. Sehon, P. J. Gough, Pharmacological inhibition of C-C chemokine receptor 2 decreases macrophage infiltration in the aortic root of the human C-C chemokine receptor 2/apolipoprotein E-/- mouse: magnetic resonance imaging assessment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. (2010) 30, 253-259.
- [209] F. A. Jaffer, M. Nahrendorf, D. Sosnovik, K. A. Kelly, E. Aikawa, R. Weissleder, Cellular imaging of inflammation in atherosclerosis using magnetofluorescent nanomaterials. *Mol Imaging*. (2006) 5, 85-92.
- [210] M. A. Hunt, A. G. Bagó, E. A. Neuwelt, Single-dose contrast agent for intraoperative MR imaging of intrinsic brain tumors by using ferumoxtran-10. *AJNR Am J Neuroradiol*. (2005) 26, 1084-1088.
- [211] B. Gleich, J. Weizenecker, Tomographic imaging using the nonlinear response of magnetic particles. *Nature*. (2005) 435, 1214-1217.
- [212] D. Wenzel, S. Rieck, S. Vosen, O. Mykhaylyk, C. Trueck, D. Eberbeck, L. Trahms, K. Zimmermann, A. Pfeifer, B. K. Fleischmann, Identification of magnetic nanoparticles for combined positioning and lentiviral transduction of endothelial cells. *Pharm Res*. (2012) 29, 1242-1254.
- [213] C. Harms, A. L. Datwyler, F. Wiekhorst, L. Trahms, R. Lindquist, E. Schellenberger, S. Mueller, G. Schütz, F. Roohi, A. Ide, M. Fuchtemeier, K. Gertz, G. Kronenberg, U. Harms, M. Endres, U. Dirnagl, T. D. Farr, Certain types of iron oxide nanoparticles are not suited to passively target inflammatory cells that infiltrate the brain in response to stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. (2013) 33, e1-e9.
- [214] A. Beduneau, Z. Ma, C. B. Grotepas, A. Kabanov, B. E. Rabinow, N. Gong, R. L. Mosley, H. Dou, M. D. Boska, H. E. Gendelman, Facilitated monocyte-macrophage uptake and tissue distribution of superparamagnetic iron-oxide nanoparticles. *PLoS One*. (2009) 4, e4343.

- [215] D. P. Cormode, G. O. Skajaa, A. Delshad, N. Parker, P. A. Jarzyna, C. Calcagno, M. W. Galper, T. Skajaa, K. C. Briley-Saebo, H. M. Bell, A versatile and tunable coating strategy allows control of nanocrystal delivery to cell types in the liver. *Bioconjugate chemistry*. (2011) 22, 353-361.
- [216] A. Antonelli, C. Sfara, S. Battistelli, B. Canonico, M. Arcangeletti, E. Manuali, S. Salamida, S. Papa, M. Magnani, New strategies to prolong the in vivo life span of iron-based contrast agents for MRI. *PLoS One*. (2013) 8, e78542.
- [217] D. R. Absolom, Opsonins and dysopsonins: an overview. *Methods in enzymology*. (1985) 132, 281-318.
- [218] S. M. Moghimi, A. C. Hunter, J. C. Murray, Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacological reviews*. (2001) 53, 283-318.
- [219] D. V. Devine, A. J. Bradley, The complement system in liposome clearance: can complement deposition be inhibited? *Advanced drug delivery reviews*. (1998) 32, 19-29.
- [220] R. A. Trivedi, C. Mallawarachi, J. M. U-King-Im, M. J. Graves, J. Horsley, M. J. Goddard, A. Brown, L. Wang, P. J. Kirkpatrick, J. Brown, J. H. Gillard, Identifying inflamed carotid plaques using in vivo USPIO-enhanced MR imaging to label plaque macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. (2006) 26, 1601-1606.
- [221] G. Korosoglou, R. G. Weiss, D. A. Kedziorek, P. Walczak, W. D. Gilson, M. Schär, D. E. Sosnovik, D. L. Kraitchman, R. C. Boston, J. W. Bulte, R. Weissleder, M. Stuber, Noninvasive detection of macrophage-rich atherosclerotic plaque in hyperlipidemic rabbits using "positive contrast" magnetic resonance imaging. *J Am Coll Cardiol*. (2008) 52, 483-491.
- [222] F. K. Swirski, M. J. Pittet, M. F. Kircher, E. Aikawa, F. A. Jaffer, P. Libby, R. Weissleder, Monocyte accumulation in mouse atherogenesis is progressive and proportional to extent of disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2006) 103, 10340-10345.
- [223] Y. Yang, Y. Yang, N. Yanasak, A. Schumacher, T. C. Hu, Temporal and noninvasive monitoring of inflammatory-cell infiltration to myocardial infarction sites using micrometer-sized iron oxide particles. *Magn Reson Med*. (2010) 63, 33-40.
- [224] A. Phinikaridou, M. E. Andia, A. Protti, A. Indermuehle, A. Shah, A. Smith, A. Warley, R. M. Botnar, Noninvasive magnetic resonance imaging evaluation of endothelial permeability in murine atherosclerosis using an albumin-binding contrast agent. *Circulation*. (2012) 126, 707-719.
- [225] Y. Kim, M. E. Lobatto, T. Kawahara, B. Lee Chung, A. J. Mieszawska, B. L. Sanchez-Gaytan, F. Fay, M. L. Senders, C. Calcagno, J. Becraft, M. Tun Saung, R. E. Gordon, E. S. Stroes, M. Ma, O. C. Farokhzad, Z. A. Fayad, W. J. Mulder, R. Langer, Probing nanoparticle translocation across the permeable endothelium in experimental atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2014) 111, 1078-1083.
- [226] S. Wagner, J. Schnorr, H. Pilgrimm, B. Hamm, M. Taupitz, Monomer-coated very small superparamagnetic iron oxide particles as contrast medium for magnetic resonance imaging: preclinical in vivo characterization. *Invest Radiol*. (2002) 37, 167-177.
- [227] M. Taupitz, S. Wagner, J. Schnorr, I. Kravec, H. Pilgrimm, H. Bergmann-Fritsch, B. Hamm, Phase I clinical evaluation of citrate-coated monocrystalline very small superparamagnetic iron oxide particles as a new contrast medium for magnetic resonance imaging. *Invest Radiol*. (2004) 39, 394-405.





## Abkürzungsverzeichnis

---

®	Eingetragenes Warenzeichen
±	Plus Minus
∅	Durchschnitt
≥	größer gleich
≤	kleiner gleich
Δ	delta
°	<i>flip angle</i> , Anregungswinkel
°C	Grad Celsius
$\omega_0$	Larmorfrequenz
$\gamma_0$	gyromagnetisches Verhältnis
$\sigma$	Standardabweichung
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	Maghemit
3D	Dreidimensional
A	Ampere
<i>ad libitum</i>	„nach Belieben“
ApoE	Apolipoprotein E
ApoE <sup>-/-</sup>	<i>Knockout</i> des für Apolipoprotein E kodierenden Gens
B <sub>0</sub>	externes Magnetfeld
ca.	circa
CT	Computertomographie
CTA	Computertomographische Angiographie
DAB	Diaminobenzidin
Da	Dalton
DMSA	Dimercaptobernsteinsäure
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm

eNOS	<i>endothelial Nitric synthase</i>
<i>et al.</i>	„und andere“ ( <i>et alii</i> )
<i>ex vivo</i>	„außerhalb des Lebendigen“
F	Fraktion
FCS	Fetales Kälberserum
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Magnetit
FLASH	<i>Fast Low-Angle Shot</i>
FOV	<i>field of view</i>
g	Erdbeschleunigung
GAG	Glykosaminoglykane
GD	Gadolinium
g/L	Gramm pro Liter
h	<i>hour</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HDL	<i>high-density lipoprotein</i> ; Lipoprotein hoher Dichte
HEDP	1-Hydroxyethyliden-1,1-Diphosphonsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hz	Hertz
HZK	hepatozelluläres Karzinom
ICAM-1	<i>intracellular adhesion molecule</i>
IDL	<i>intermediate-density lipoprotein</i> ; Lipoprotein mittlerer Dichte
IFN-γ	Gamma-Interferon
IL	Interleukin
<i>in situ</i>	„am Ort“
<i>in vitro</i>	„im Glas“
<i>in vivo</i>	„im Lebendigen“
i.v.	intravenös
IVUS	Intravaskulärer Ultrasound
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm

---

kHz	Kilohertz
L min <sup>-1</sup>	Liter pro Minute
LA-ICP-MS	Laserablation induktiv gekoppelte Plasma Massenspektrometrie
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i> ; Lipoprotein niederer Dichte
LM	<i>low melting</i>
M	Molar
m	Meter
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
MCP-1	<i>monocyte chemoattractan protein-1</i>
MHz	Megahertz
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	millimolar
mm	Millimeter
mol/L	Mol pro Liter
MPS	<i>magnetic particle spectroscopy</i>
MPS	mononukleares Phagozytensystem
MRA	Magnetresonanzangiographie
MRT	Magnetresonanztomographie
ms	Millisekunde
mT	Milli Tesla
mV	Millivolt
N	Normalität
NaOH	Natronlauge
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NSF	Nephrogene systemische Fibrose
oxLDL	oxidiertes LDL
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase-chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglykol

PES	Polyethersulfon
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PFA	Paraformaldehyd
RES	retikuloendotheliales System
RF	Radiofrequenz
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RT	Raumtemperatur
SD	<i>standard deviation</i>
SED	<i>standard error of the mean</i> ; Standardfehler des Mittelwertes
sek	Sekunde(n)
SPECT	<i>Single-Photon-Emission-computed-tomography</i>
SPIO	<i>Super Paramagnetic Iron Oxide</i>
SR-A	<i>scavenger receptor A</i>
T	Tesla
T1	longitudinale Relaxationszeit
T2	transversale Relaxationszeit
T2*	transversale Relaxationszeit in Kombination mit der Dephasierung durch Feldinhomogenitäten
TE	<i>time to echo</i> ; Echozeit
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TF	<i>tissue factor</i> ; Gewebefaktor
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor beta</i>
TR	<i>time to repetition</i> ; Repetitionszeit
USPIO	<i>UltraSmall SuperParamagnetic Iron Oxide</i>
UTE	<i>ultra short time of echoes</i>
(v/v)	Volumenanteil
VCAM-1	<i>vascular adhesion molecule-1</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VLDL	<i>very low-density lipoprotein</i> ; Lipoprotein sehr geringer Dichte
VSMC	<i>Vascular smooth muscle cell</i>
VSOP	<i>very small iron oxide nanoparticles</i>
(w/v)	Massenkonzentration

(w/w)	Massenanteil
W	Watt
z. B.	zum Beispiel
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer
$\mu\text{mol}$	Mikromol
$\mu\text{S}$	mikrosiemens
$\mu\text{s}$	Mikrosekunde



## Publikationsliste

---

**C. Scharlach**, H. Kratz, F. Wiekhorst, C. Warmuth, J. Schnorr, G. Genter, M. Ebert, S. Mueller, E. Schellenberger, 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*. (2015) Feb 4. pii: S1549-9634(15)00026-X. doi: 10.106/j.nano.2015.01.002.