

2 Superparamagnetische Eisenoxid-Partikel als Kontrastmittel für MR-Tomographie und Therapie

2.1 Einleitung

Der Begriff des Superparamagnetismus wurde 1952 erstmalig genannt (111) und beschreibt die Eigenschaft von sehr kleinen Eisenoxid-Partikeln in Pulvern oder Suspensionen, sich im Magnetfeld ähnlich wie ein Ferromagnet (z.B. Stabmagnet) stark magnetisieren zu lassen, im Gegensatz zum Ferromagneten jedoch nach Abschalten des Magnetfeldes keine Restmagnetisierung aufzuweisen (12). Im Biomedizinischen Bereich führte die Möglichkeit, am organischen Hüllmaterial solcher Partikel chemisch funktionelle Gruppen (Antikörper oder Antigene) zu binden, zur Verwendung dieser Partikel für die Trennung von biologischen Materialien unter Einfluss eines Magnetfeldes, z.B. in Immunoassays (117). Eine logische Konsequenz war daher im Jahr 1986 der Vorschlag, entsprechend markierte superparamagnetische Eisenoxidpartikel (superparamagnetic iron oxide, SPIO) als immunospezifisches Kontrastmittel für die damals aufkommende MR-Tomographie zu verwenden (181). Die Eigenschaft von Zellen des Mononukleären Phagozytierenden Systems (MPS), unspezifisch Partikel aus der Blutbahn aufzunehmen, führte 1987 zur Entdeckung von SPIO als intravenös applizierbares MRT-Kontrastmittel für die Organe des MPS, insbesondere für die MR-Tomographie der Leber und der Milz (83, 192). Seit dieser Zeit sind SPIO in vielfältiger Weise weiterentwickelt worden. Neben der Diagnostik von Tumoren der Leber und Milz liegen Schwerpunkte auf der Lymphknotendiagnostik sowie auf morphologischen und funktionellen MR-Untersuchungen des Knochenmarks. Das Einsatzspektrum von SPIO beschränkt sich allerdings nicht mehr nur auf die Organe des MPS. Verschiedene Varianten dieser Partikel werden präklinisch oder klinisch als Kontrastmittel für mehrere Aspekte der Gefäßdiagnostik geprüft: Für die MR-Angiographie, für die funktionelle Diagnostik von atherosklerotischen Plaques sowie für die Thrombosedagnostik. Des Weiteren sind Ansätze zu nennen, SPIO als Kontrastmittel für Perfusionsstudien, z.B. des Myokards, oder auch zur Untersuchung der Vaskularisation von Tumoren zu verwenden. Schließlich liegen zahlreiche Publikationen zum Einsatz von SPIO als Kontrastmittel für die so genannte „Molekulare Bildgebung“ vor. Neben diagnostischen Ansätzen sind gerade in jüngster Zeit auch therapeutische Anwendungsmöglichkeiten aufgezeigt worden, unter anderem mit SPIO in der Gentherapie oder auch als Vermittler für die Hyperthermie. Dieses Kapitel gibt einen Überblick über die wesentlichen physikalisch-chemischen und biologischen Eigenschaften der verschiedenen SPIO, den aktuellen Stand der präklinischen und klinischen Entwicklung bzw. klinischen Anwendung sowie Ausblicke auf

zukünftige Indikationen.

In Bezug auf den experimentellen und klinischen Teil der vorgelegten Arbeit sind hier besonders die einleitenden Kapitel zu Terminologie (Kapitel 2.2.1), Partikelzusammensetzung und Biodegradation (Kapitel 2.2.2), sowie zur Relaxationswirksamkeit (Kapitel 2.2.3) von Bedeutung, des Weiteren die Kapitel zur Anwendung von SPIO in der MR-Diagnostik der Leber (Kapitel 2.3.1) und in der MR-Angiographie (Kapitel 2.4.1). Ergänzend werden in Kapitel 2.8 die Struktur und magnetische Eigenschaften von Eisenoxiden sowie mögliche Herstellungswege erläutert.

2.2 Partikelarten und –eigenschaften

2.2.1 Terminologie

SPIO ist der Überbegriff für alle in der MR-Tomographie als Kontrastmittel experimentell oder klinisch eingesetzten superparamagnetischen Eisenoxid-Partikel (SPIO: Superparamagnetic Iron Oxide). Innerhalb dieser Substanzgruppe findet sich die Untergruppe der Partikel mit vergleichsweise größerem Durchmesser (etwa 50 – 150 nm oder größer), die historisch bedingt auch im engeren Sinne als SPIO bezeichnet wird. Der ebenfalls für diese Untergruppe der größeren Partikel verwendete Begriff der Standard SPIO (SSPIO) (251) ist weniger gebräuchlich. Hiervon wird die Untergruppe der Partikel mit kleinerem Durchmesser um etwa 20 nm abgegrenzt und als Ultrakleine Superparamagnetische Eisenoxid-Partikel bezeichnet (USPIO: Ultrasmall SPIO). Weitere Bezeichnungen berücksichtigen den Partikelbau, wie z.B. Monokristalline Eisenoxid-Partikel (MION: Monocrystalline Iron Oxide Nanoparticles), die sich jedoch nicht wesentlich von den als USPIO bezeichneten Partikeln unterscheiden. Die gezielte Quervernetzung des Hüllmaterials führt zur Bezeichnung CLIO (Cross Linked Iron Oxide). Die als SPIO, USPIO oder MION bekannten Partikel sind mit Polymeren, wie z.B. Dextran oder Carboxydextran umhüllt. Der Begriff „Magnetite“ wurde frühzeitig in Verbindung mit magnetischen bzw. superparamagnetischen Eisenoxid-Partikeln für biomedizinische Anwendungen, insbesondere als Kontrastmittel für die MR-Tomographie, verwendet (9, 267). Allerdings ist dieser Begriff nicht ganz korrekt, da diese Eisenoxid-Partikel in der Regel aus einem Magnetit-Maghämit Gemisch bestehen (siehe Kapitel 2.8)

2.2.2 Zusammensetzung, Biodegradation

Grundlage für den Superparamagnetismus sind sehr kleine Eisenoxidkristalle mit einer so genannten inversen Spinell-Struktur mit einem Durchmesser von wenigen nm (251) (siehe Kapitel 2.8). Um eine für die intravenöse Injektion geeignete Präparation von SPIO zu erhalten, müssen die Partikel mit einer Umhüllung versehen werden (siehe auch Abschnitt

2.8 dieses Kapitels). In größeren Partikeln bilden zahlreiche Eisenoxidkristalle zusammen mit dem Hüllmaterial Konglomerate mit bis zu mehreren 100 nm Durchmesser, so genannte polykristalline Partikel (192). Bei sehr kleinen Partikeln sind einzelne Kristalle separat mit dem Hüllmaterial beschichtet (monokristalline Partikel). Als Hüllmaterial wurden bislang Polymere wie Dextran (z.B. AMI 25, AMI 227, AMI 228) (170, 192), Carboxydextran (SHU 555 A, SHU 555 C) (121), Albumin (267), Stärke (113), Polyethylenglycol (187) oder eine liposomale Umhüllung (161) verwendet (Tabelle 2.1 und Tabelle 2.2). Im Vergleich zum Körpereisenpool sind diagnostische Dosierungen von ca. 0,01 bis 0,05 mmol Fe/kg gering und entsprechen ca. 5 – 10 % der Gesamteisenmenge. Nach intravenöser Injektion werden die Partikel abgebaut, das Eisen wird in den Körpereisenpool überführt (265).

2.2.3 Relaxationsverstärkende Eigenschaften:

T₂-Effekt versus T₁-Effekt

Alle MR-Kontrastmittel („Relaxationsagentien“), sowohl Gadolinium-haltige Verbindungen als auch Eisenoxid-basierte, partikuläre Substanzen verkürzen gleichzeitig die T₁- und die T₂-Relaxationszeit ihres umgebenden Mediums. Diese Wirkung wird eher umgangssprachlich als T₁- bzw. T₂-Effekt oder -Verkürzung bezeichnet. Die korrektere Beschreibung ist die der T₁- bzw. T₂-Relaxationszeit verkürzende Wirkung. Als Maß für die Verkürzung der Relaxationszeiten einer bestimmten Substanz wird die Relaxivität (T₁-Relaxivität (r₁) bzw. T₂-Relaxivität (r₂)) mit der Einheit l/(mmol*s) oder auch l*mmol⁻¹*s⁻¹ verwendet. SPIO sind zu Beginn ihres Einsatzes als Kontrastmittel in der MR-Tomographie als so genanntes „negatives“ MR-Kontrastmittel entdeckt und für die MR-Tomographie entwickelt worden. Grund für die Verwendung als negatives Kontrastmittel war die im Vergleich zu den Gadolinium-haltigen Substanzen wesentlich stärkere T₂- und T₂*-verkürzende Wirkung (hohe T₂-Relaxivität) mit entsprechend stark signalminderndem Effekt nicht nur in T₂- bzw. T₂*-gewichteten Sequenzen sondern auch in T₁-gewichteten Techniken.

Theoretisch war für SPIO ihre ebenfalls starke T₁-verkürzende Wirkung zwar bekannt, konnte jedoch aufgrund messtechnischer Limitationen nicht genutzt werden. Diese Limitationen bestanden in den relativ langen, minimalen Echozeiten, die an klinischen Geräten bis etwa 1995 eingestellt werden konnten. Mit Verfügbarkeit von MR-Tomographen mit leistungsfähigeren Gradientensystemen konnten insbesondere in Gradientenechosequenzen Echozeiten von 5 ms und weniger gewählt werden. Dies schaffte die Möglichkeit, auch den T₁-verkürzenden Effekt von SPIO im Bild sichtbar zu machen.

Tabelle 2.1: Übersicht über die derzeit in klinischer Entwicklung befindlichen oder zugelassenen SPIO-basierten Kontrastmittel

Substanz	Indikation	Dosis	Applikation	Handelsname	Hersteller	Status
AMI-25	Leber/Milz	0,015 mmol Fe/kg (Europa)	Infusion	Endorem® (Europa)	Guerbet	zugelassen
		0,010 mmol Fe/kg (USA, Japan)		Feridex (USA)	Berlex	zugelassen
SHU 555 A	Leber/Milz	ca. 0,008 mmol Fe/kg	Bolusinjektion	Resovist®	Schering AG	zugelassen
AMI-227	Lymphknoten MR-Angiographie	0,030 – 0,045 mmol Fe/kg	Infusion	Sinerem®	Guerbet	Phase III
	Leber ¹			Combidex®	Advanced Magnetics	Phase III
AMI-228	MR-Angiographie	bis 0,75 mmol Fe/kg	Bolusinjektion	-	Advanced Magnetics	Phase I
NC100150 ²	MR-Angiographie	50 – 100 µmol Fe/kg	Bolusinjektion	Clariscan®	Amersham	Phase III
	Perfusion	7 µmol Fe/kg				
SHU 555 C	MR-Angiographie		Bolusinjektion	Supravist®	Schering AG	Phase II
OMP	Orale Kontrastierung	0,5 g Fe/l, 400–600 ml	oral	Abdoscan®	Amersham	zugelassen
AMI-121	Orale Kontrastierung	1,5-3,9 mmol Fe/l, 400–600 ml	oral	Lumirem®	Guerbet	zugelassen
				Gastromark®	Advanced Magnetics	zugelassen

Anmerkung:¹nach pilotartiger Studie nicht weiter geprüft²klinische Entwicklung wird derzeit nicht weitergeführt

Tabelle 2.2: Partikeleigenschaften einiger SPIO mit Indikationen für die intravenösen Injektion. Zum Vergleich sind ein makromolekulares Gd-haltiges (Gadomer) und ein niedermolekulares, Gd-haltiges (Gadopentetat Dimeglumin, Gd-DTPA) Kontrastmittel mit aufgeführt.

Substanz	Quelle	Partikelgröße	Hüllmaterial	T ₁ -Relaxivität (R ₁) [l/(mmol*s)]	T ₂ -Relaxivität (R ₂) [l/(mmol*s)]	r ₁ /r ₂
AMI-25	(98)	80 – 150 nm	Dextran	30	100	0,3
SHU 555 A	(121)	50 – 100 nm	Carboxydextran	25	164	0,15
AMI-227	(229)	20 – 40 nm	Dextran	31	78	0,39
AMI-228	(170) (71)	ca. 18 nm	Carboxymethyldextran	35,3	64,8	0,54
NC100150	(187)	20 nm	Stärke/PEG	20	35	0,57
SHU 555 C	(108)	ca. 20 nm	Carboxydextran	18	41	0,44
Gadomer	(43)	35 kDa	-	18,7	29	0,64
Gd-DTPA ¹	(98)	0,7 kDa	-	4	6	0,66

Anmerkung: Alle Werte wurden nach Angabe der Quelle bei 0,47 T ermittelt; zu ein und derselben Substanz können in verschiedenen Quellen gelegentlich leicht differierende Angaben zu den Relaxivitäten gefunden werden. PEG: Polyethylenglycol.

SPIO weisen in Abhängigkeit ihrer Größe deutlich unterschiedliche Werte für die T_1 - und T_2 -Relaxivität auf. Ob SPIO bei entsprechender Wahl der Pulssequenz eher als negatives oder positives Kontrastmittel nutzbar sind, wird durch das Verhältnis von T_1 - zu T_2 -Relaxivität (r_1/r_2) bestimmt (Tabelle 2.2). Große Partikel mit einem Durchmesser von ca. 50 nm oder mehr besitzen ein niedriges r_1/r_2 und sind eher nur als negatives Kontrastmittel nutzbar, kleine Partikel mit Durchmessern von etwa 20 nm oder weniger besitzen ein hohes r_1/r_2 und können sowohl als positives als auch als negatives Kontrastmittel genutzt werden (29, 108).

Neben der Partikelbeschaffenheit beeinflusst in vivo auch die zelluläre Aufnahme der Partikel ihre signalverändernde Wirkung. SPIO, die frei in der Blutbahn zirkulieren oder sich im Extrazellulärraum befinden, zeigen im wesentlichen die unter in vitro Bedingungen bestimmten Eigenschaften. Demgegenüber steigt nach intrazellulärer Aufnahme der Partikel, z.B. in den Kupffer-Zellen der Leber, der signalmindernde Effekt (155).

2.3 SPIO als Kontrastmittel für Organe des Mononukleären Phagozytierenden Systems

Zu den Organen des Mononukleären Phagozytierenden Systems (MPS) zählen Leber, Milz, Knochenmark und Lymphknoten, die auch im engeren Sinne als Organe des Retikuloendothelialen Systems (RES) bezeichnet werden. Zur Phagozytose befähigte Zellen sind jedoch auch z.B. Gliazellen in Zentralen Nervensystem. Daher kann im weiteren Sinne von SPIO auch als Kontrastmittel für das MPS gesprochen werden.

2.3.1 Leber und Milz

Der Einsatz von SPIO als Kontrastmittel für die MRT von Leber und Milz basiert auf der Eigenschaft von Zellen des RES, unspezifisch Partikel aus dem Blut aufzunehmen (192). Diese Phagozytose erfolgt im Allgemeinen für größere Partikel schneller und vollständiger als für kleinere Partikel. Daher sind für die MRT von Leber und Milz insbesondere größere Partikel geeignet. Bislang für die MRT von Leber und Milz zugelassene Substanzen sind Endorem® (seit 1994) und Resovist® (seit 2002). Es hat sich jedoch gezeigt, dass auch kleinere Partikel bei entsprechend höherer Dosierung zu einem nutzbaren Signalverlust in der Leber führen (29).

Die Aufnahme der SPIO-Partikel in Leber und Milz hängt von der Verteilung und Funktionsfähigkeit der Kupffer-Zellen bzw. Milz-Makrophagen ab. Für die MRT der Leber ergibt sich daher als wichtige Indikation der Nachweis von nicht Makrophagen-haltigem Fremdgewebe (fokale Leberläsionen). Dies sind im Wesentlichen Metastasen, Cholangiozelluläre Karzinome, entdifferenzierte Hepatozelluläre Karzinome und

Lymphominfiltrationen. Neben dem Nachweis fokaler Leberläsionen wird die Beurteilung diffuser Leberveränderungen als Indikation für den Einsatz von SPIO geprüft.

Für beide, heute klinisch in der Leberdiagnostik anwendbare Substanzen (Endorem®, Resovist®) wurde gezeigt, dass im Vergleich zur Nativuntersuchung die Detektion fokaler Leberläsionen signifikant verbessert wird (10, 22, 55, 74, 103). Müller und Mitarbeiter fanden im Vergleich zur biphasischen Spiral-CT für die SPIO-verstärkte MRT eine verbesserte Detektion maligner Lebertumoren (152). In der präoperativen Diagnostik von Lebertumoren hatte bislang die CTAP aufgrund der hohen Sensitivität ihren Stellenwert. Es konnte gezeigt werden, dass die SPIO-verstärkte MRT im Vergleich zur CTAP eine ähnliche Sensitivität im Nachweis von Lebermetastasen hat bei jedoch geringerer Rate an falsch positiven Befunden (10).

Die Verwendung von SPIO in der Diagnostik fokaler Leberläsionen liefert neben der verbesserten Detektion von Metastasen auch Zusatzinformationen zur Tumorcharakterisierung. Basis hierfür ist, dass Fokale Noduläre Hyperplasien, Adenome und gut differenzierte Hepatozelluläre Karzinome ebenfalls Kupffer-Zellen beinhalten. Dies führt nach SPIO Applikation zu einem Signalverlust der Läsionen, so dass diese primären Lebertumoren von sekundären Tumoren abgegrenzt werden können (70, 220, 244). Hierbei zeigen Adenome im allgemeinen eine geringere Aufnahme von SPIO als Fokale Noduläre Hyperplasien. Adenome und gut differenzierte Hepatozelluläre Karzinome zeigen allerdings eine große Variationsbreite der SPIO-Aufnahme, so dass zur weiteren Differenzierung dieser lebereigenen Tumoren untereinander Zusatzinformation wie die Binnenstruktur in der Nativuntersuchung und der Postkontrastaufnahme herangezogen werden müssen (11, 16).

Neben der Nutzung des signalmindernden Effektes in statischen T_2 -gewichteten postkontrast Aufnahmen kann die Information aus T_1 -gewichteten dynamischen und statischen postkontrast Aufnahmen die Differenzierung von Lebertumoren verbessern (151, 188, 189, 190). Voraussetzung für die dynamische Untersuchung ist, dass die Substanz als Bolus injiziert werden kann.

Da die Funktionsfähigkeit der Kupffer-Zellen durch diffuse Lebererkrankungen, z. B. Leberzirrhose oder Hepatitis, oder auch durch eine Bestrahlung eingeschränkt wird, resultiert eine verminderte oder inhomogene Aufnahme von SPIO im Leberparenchym. Hieraus resultieren Ansätze, nach intravenöser Injektion von SPIO Art und Ausmaß einer Leberparenchymschädigung zu bestimmen (45, 102). Des Weiteren gelingt es mit diesem Ansatz, eine Leberfibrose nachzuweisen und in ihrem Ausmaß zu bestimmen (134).

2.3.2 Lymphknoten

In Analogie zur Lymphszintigraphie mit kolloidalen Isotopen-markierten Substanzen führte der Partikelcharakter von SPIO zu dem Schluss, dass diese Kontrastmittel auch für die MR-tomographische Lymphknotendiagnostik einsetzbar sein sollten. In der Lymphszintigraphie werden die Substanzen interstitiell in den Einzugsbereich der zu untersuchenden Lymphknotengruppen bzw. peritumoral injiziert. Somit war es nicht so bemerkenswert, dass sich im Experiment an der Ratte SPIO nach interstitieller Injektion in normalen Lymphknoten anreichern und hier im MR-Bild zu einem Signalabfall führen bzw. eine fehlende Anreicherung einen metastatischen Befall von Lymphknoten anzeigten (233, 258). Untersuchungen mit endolymphatischer Injektion am Kaninchen zeigten, dass schon sehr geringe Mengen von SPIO einen starken Signalabfall in gesunden Lymphknoten herbeiführen (76) und deuteten an, dass selbst kleine Metastasen in nicht vergrößerten Lymphknoten detektiert werden können (233). Überaus überraschend war die Entdeckung, dass USPIO nach intravenöser Injektion in normalen Lymphknoten akkumuliert werden (259). Voraussetzung hierfür ist ein sehr kleiner Partikeldurchmesser von etwa 20 nm (USPIO) sowie eine geeignete Oberflächenbeschichtung aus dicht gelagerten Dextranmolekülen. Diese beiden Merkmale – kleine Partikelgröße, dichte Beschichtung mit Dextranen - führen zu einer Maskierung der Partikel gegenüber den Makrophagen, so dass die für größere Partikel typische rasche Aufnahme in Leber und Milz unterbleibt (260). Während der resultierenden langen intravasalen Zirkulationszeit (Halbwertszeit von mehreren Stunden) können diese kleinen Partikel in die Lymphknoten gelangen (44, 61, 150, 182). Die systemische Kontrastierung der Lymphknoten nach intravenöser Injektion dieser USPIO hat zum Begriff der intravenösen MR-Lymphographie geführt (259). Ein Problem hinsichtlich eines Erfolges dieser Methode ist die starke Variabilität des Lymphflusses in Abhängigkeit z.B. des Kreislaufzustandes oder der Muskelaktivität eines Individuums, was zu deutlichen intra- und interindividuellen Schwankungen der Anreicherung der USPIO in Lymphknoten nach intravenöser Injektion führt und damit auch die Detektion von Lymphknotenmetastasen beeinflussen kann (61, 182, 248).

Die einzige Substanz, die derzeit klinisch für die intravenöse MR-Lymphographie geprüft wird, ist aus AMI-227 (Advanced Magnetics, Cambridge, USA) hervorgegangen (In Europa: Sinerem® (Guerbet, Paris), in den USA: Combidex® (Advanced Magnetics)). Seit etwa 1995 werden zu zahlreichen Indikationen klinische Studien zur intravenösen MR-Lymphographie mit Sinerem® bzw. Combidex® durchgeführt, z.B. bei Patienten mit HNO-Tumoren, Mammakarzinom, Bronchialkarzinom oder Malignomen des Beckens. Ziel der Studien ist zu prüfen, ob mit der intravenösen MR-Lymphographie gegenüber der nativen

MRT bzw. auch klinischer Beurteilung die Treffsicherheit bezüglich der Detektion von Lymphknotenmetastasen verbessert wird, weitergehend auch, ob für bestimmte Primärtumoren, z.B. das Prostatakarzinom, eine diagnostische Lymphadenektomie überflüssig wird oder das Ausmaß einer Lymphadenektomie besser geplant werden kann, wie z.B. bei HNO-Tumoren. In mehreren Studien hat sich gegenüber der nicht kontrastverstärkten Untersuchung ein Trend zu einer Verbesserung der Detektion oder auch eine signifikante Verbesserung der Detektion von Lymphknotenmetastasen gezeigt, auch mit potenzieller Auswirkung auf das weitere klinische Management (17, 56, 78, 80, 86, 89, 135). Allerdings wurde auch in mehreren Studien beobachtet, dass reaktiv vergrößerte Lymphknoten nicht sicher von metastatischen Lymphknoten unterschieden werden können (79, 158). Einem Durchbruch der Methode steht bislang noch die limitierte räumliche Auflösung und das Auftreten von Bewegungsartefakten entgegen, die eine Beurteilung der sehr kleinen Binnenstrukturen von nicht vergrößerten Lymphknoten verhindern (86, 214).

2.3.3 Knochenmark

Schon die native MRT ist bezüglich des Nachweises von fokalen Tumoren oder einer diffusen Infiltration des Knochenmarkraumes relativ aussagekräftig. Diagnostische Schwierigkeiten können bei der Unterscheidung von sehr zellreichem Knochenmark gegenüber malignen Veränderungen bestehen, z.B. im Kinder- und Jugendalter oder bei der so genannten Rekonversion. Intravenös applizierte SPIO werden auch von Makrophagen des Knochenmark aufgenommen, und zwar kleinere Partikel (USPIO) in stärkerer Masse als größere Partikel (SPIO). Hieraus resultiert eine verbesserte Abgrenzung von fokalen oder diffusen Tumormanifestationen im Knochenmark (212), insbesondere auch bei Vorliegen eines hyperplastischen Knochenmarks (54). Ein weiterer interessanter Aspekt der Anwendung von SPIO in der MRT des Knochenmarks ist die Möglichkeit, bestrahlungsbedingte funktionelle Veränderungen des Endothels oder der Makrophagenaktivität abzuschätzen (51, 53).

2.3.4 Andere MPS-bezogene Anwendungen von SPIO

Die im ZNS lokalisierten Mikrogliazellen zeigen unter normalen Verhältnissen keine Phagozytoseaktivität. Durch einen pathologischen Prozess, z.B. Entzündung oder Tumor, werden Mikrogliazellen im Rahmen der Immunantwort zur Phagozytose aktiviert. Begrenzung und Ausläufer von Gliomen lassen sich auch mit Gd-verstärkter MRT häufig nur schlecht bildgebend erfassen. Maligne Tumore des ZNS sind zu einem bedeutenden Teil von aktivierter Mikroglia durchsetzt und umgeben. Fleige und Mitarbeiter zeigten experimentell, dass aktivierte Mikroglia in hohem Maße USPIO phagozytiert und somit

einerseits morphologisch eine indirekte Darstellung der Tumorgrenzen über die Kontrastierung der aktivierten Mikroglia möglich wird, sowie, dass funktionelle Informationen über die immunologische Reaktion auf den Tumor zugänglich sein kann (64).

Die Rejektion von transplantierten Organen wird von einer Infiltration des Organes durch Makrophagen begleitet. Hierauf beruht der Ansatz, nach intravenöser Injektion der Partikel und Signalintensitätsbestimmung im Transplantatorgan das Vorliegen bzw. das Ausmaß einer Rejektion zu bestimmen. Eine Signalabnahme weist auf eine vermehrte Akkumulation der Partikel und damit auf eine Rejektion hin. Hierzu liegen experimentelle Untersuchungen zum Rejektionsnachweis von Herz-, Lungen und Nierentransplantaten vor (13, 100, 101). Die Beurteilung einer Rejektion von Lebertransplantaten beruht demgegenüber auf einer verminderten Aufnahme der Partikel, da im Zuge der Rejektion die Funktion der Kupffer-Zellen beeinträchtigt wird (148).

2.4 *Gefäßdiagnostik mit SPIO: MR-Angiographie, Plauecharakterisierung, Thrombosedagnostik, Perfusionsstudien*

2.4.1 Kontrastverstärkte MR-Angiographie

Wie im Abschnitt „Relaxationsverstärkende Eigenschaften“ (Kapitel 2.2.3) ausgeführt, weisen SPIO neben einer hohen T_2 -Relaxivität (signalmindernde Wirkung) auch eine hohe T_1 -Relaxivität (signalsteigernde Wirkung) auf. Mit abnehmender Partikelgröße nimmt die T_2 -Relaxivität ab und in der Regel das Verhältnis zwischen T_1 - und T_2 -Relaxivität zu, so dass für die Gefäßdarstellung insbesondere kleine Partikel (USPIO) geeignet sind (3). SPIO gehören zu den Kontrastmitteln mit verlängerter intravasaler Verweildauer, die als Blut-Pool Kontrastmittel bezeichnet werden. Mit abnehmender Partikelgröße verlängert sich im Allgemeinen die intravasale Verweildauer und damit der Blut-Pool Effekt von SPIO.

Schon für die vergleichsweise großen, für die MRT der Leber entwickelten SPIO mit überwiegender T_2 -Relaxationszeitverkürzung konnte mit entsprechend stark T_1 -gewichteten Sequenzen ein angiographischer Effekt nachgewiesen werden (242). Diese Erkenntnisse sind insofern von Bedeutung, dass im Rahmen einer MRT der Leber, z.B. mit Endorem® oder Resovist®, neben der Tumordarstellung in T_2 -gewichteter Technik auch die größeren Lebergefäße (Pfortader, Lebervenen) in T_1 -gewichteten Sequenzen verbessert beurteilt werden können (109, 173, 201). Der Blut-Pool Charakter von Endorem® konnte bei der Fragestellung einer tiefen Venenthrombose bzw.

Lungenarterienembolie für eine umfassende MR-angiographische Untersuchung der tiefen Beinvenen, der großen Abdominalvenen und der Lungenarterien in einem Untersuchungsgang nach Infusion der Substanz genutzt werden (202). Der Einsatz dieser für die Leberdiagnostik optimierten, großen SPIO für die MR-Angiographie kann allerdings nur als hilfswesiger Ansatz gesehen werden.

Mittlerweile sind verschiedene USPIO speziell für die Indikation der kontrastverstärkten MR-Angiographie entwickelt worden und befinden sich in der präklinischen oder klinischen Prüfung. Da SPIO in der Regel aus einem Gemisch von Partikeln verschiedener Größe bestehen, kann über bestimmte Auftrennungsverfahren die Fraktion der kleinen Partikel separiert werden. Allkemper und Mitarbeiter haben für verschiedene Fraktionen von SHU 555 experimentell belegt, dass auf diesem Weg die Eignung der Partikel für die MR-Angiographie optimiert werden kann. Die Fraktion der kleinsten Partikel war bezüglich der intravasalen Signalsteigerung während der ersten Kontrastmittelpassage vergleichbar mit einem niedermolekularen Gd-haltigen Kontrastmittel, hat jedoch gleichzeitig einen lang anhaltenden intravasalen Kontrast bewirkt (3). Clarke und Mitarbeiter zeigten in einer experimentellen Studie, dass diese kleinen Partikel (SHU 555 C) qualitativ einen ähnlich guten angiographischen Effekt aufweisen wie klassische Blut-Pool Kontrastmittel für die MR-Angiographie, z.B. Gd-haltige Makromoleküle, obwohl nach quantitativen Kriterien der signalsteigernde Effekt der USPIO nicht den des Gd-haltigen Makromoleküls erreicht (43). Eine andere Herangehensweise besteht in der Herstellung primär kleiner, für eine hohe Signalverstärkung optimierter Partikel, wie z.B. NC-100150, oder die in der vorliegenden Arbeit behandelten VSOP (104, 231). Derzeit befinden sich drei USPIO-Kontrastmittel für die MR-Angiographie in der klinischen Prüfung (SHU 555 C, AMI 228, VSOP-C184).

Angesichts der sehr guten Ergebnisse der First-Pass MR-Angiographie mit niedermolekularen, unspezifischen Kontrastmitteln (z.B. Magnevist®, Omniscan®) in Kombination mit schnellen 3D-GRE Sequenzen in nahezu sämtlichen Gefäßterritorien (Arterien des Körperstamms, periphere Arterien, supraaortale Arterien) ist noch unklar, inwieweit überhaupt bzw. für welche Indikationen Bedarf an einem Blut-Pool Kontrastmittel besteht. Wenn der Blut-Pool Effekt mit länger dauernden Messungen und erhöhter Ortsauflösung ausgenutzt werden soll, muss mit einer venösen Überlagerung gerechnet werden, was die Auswertbarkeit der MR-Angiogramme beeinträchtigt (219). Eine Indikation, die zweifellos von der Verwendung eines Blut-Pool Kontrastmittels profitieren könnte, ist die MR-Angiographie der Koronararterien (87).

Unter experimentellen Bedingungen konnten für verschiedene USPIO viel versprechende Ergebnisse hinsichtlich einer Verbesserung der Darstellung der Koronararterien erzielt

werden (95). Erste Ergebnisse klinischer Studien deuten zwar eine Verbesserung der kontrastunterstützten MR-Angiographie der Koronararterien mit NC100150 an (14, 110, 194), hier sind jedoch noch technische Fortschritte bezüglich der Akquisitionstechnik notwendig, insbesondere, um nicht nur die proximalen Anteile der Koronararterien, sondern auch distale Segmente zu visualisieren.

In der kardialen Bildgebung kann der Blut-Pool Charakter von USPIO neben der MR-Angiographie zur Darstellung der Koronararterien auch für die Kontrastierung des Herzbinnenraumes zur verbesserten Kontrastierung gegenüber dem Myokard eingesetzt werden, um in entsprechenden Cine Techniken die Auswertbarkeit von Funktionsuntersuchungen zu erleichtern (4).

2.4.2 Charakterisierung atherosklerotischer Plaques

Die Grundlage für die funktionelle Plaquediagnostik mit SPIO ist in der Pathophysiologie der Plaquentstehung zu sehen. Nach heutiger Auffassung bestimmen nicht so sehr bereits verkalkte Plaques das Risiko eines ischämischen Ereignisses, z.B. eines Myokardinfarktes oder eines peripheren Gefäßverschlusses. Es sind vielmehr so genannte vulnerable Plaques, die unter Umständen keine oder nur eine geringe Gefäßverengung verursachen, jedoch eine hohe entzündliche Aktivität aufweisen mit gesteigertem Risiko für eine Plaqueruptur und damit verbundener Freisetzung von thrombogenen Substanzen mit konsekutivem thrombotischem Verschluss des Gefäßes. Derartige vulnerable Plaques weisen einen hohen Gehalt von Makrophagen auf. Es konnte für verschiedene USPIO am Tiermodell für atherosklerotische Plaques (Watanabe Heritable Hyperlipidemic rabbits, WHHL-Kaninchen (252)) eine Akkumulation der Partikel in Plaques mit entsprechendem fokalen Signalverlust in der Gefäßwand im MR-Bild nachgewiesen werden. Schmitz und Mitarbeiter zeigten, dass die Anreicherung von Carboxydextran-ummantelten USPIO für Dosierungen bis 0,2 mmol Fe/kg in diesem Tiermodell vor allem in Plaques mit erhöhter endothelialer Permeabilität und hohem Makrophagengehalt auftritt, somit in Plaques mit etablierten Kriterien entzündlicher Aktivität (203). Mit einer Substanz aus Dextran-ummantelten USPIO, die derzeit klinisch für die MR-Diagnostik von Lymphknoten geprüft wird (Sinerem), konnte ebenfalls am Tiermodell eine Anreicherung in atherosklerotischen Plaques demonstriert werden, allerdings mit der sehr hohen Dosierung von 1 mmol Fe/kg (186). Für dieses Kontrastmittel wurde im Rahmen einer klinischen Studie zur Lymphknotendiagnostik bei einem Teil des Patientenkollektivs auch eine fokale Kontrastierung in der Wand der Bauchorta sowie der Beckenarterien gefunden (204). Ein Vergleich der MR-Bildgebung der tierexperimentellen Untersuchungen legt nahe, dass es sich hierbei um eine

Anreicherung der USPIO in atherosklerotischen Plaques handeln muss. Somit kann dies als die erste klinische Beobachtung einer funktionellen Plaquedarstellung in der MRT angesehen werden. Das überraschende an dieser Beobachtung war, dass eine kräftige Kontrastierung dieser mutmaßlichen Plaques im Gegensatz zu den experimentellen Studien bei der vergleichsweise geringen Dosis von 0,045 mmol Fe/kg auftrat.

2.4.3 Weitere vaskuläre Anwendungen von SPIO

Thrombosedagnostik: Die intravasale Signalsteigerung von SPIO bzw. USPIO als Blut-Pool Kontrastmittel kann für die Visualisierung von venösen Thromben als Kontrastmittelaussparung in der MR-Angiographie genutzt werden (202). Mit diesem Ansatz kann Lokalisation und Ausmaß einer venösen Thrombose exakt dargestellt werden. Weiterführend wurde experimentell gezeigt, dass venöse Thromben nach intravenöser Injektion von USPIO altersabhängig Signalveränderungen zeigen und somit auch für eine Altersbestimmung von Thrombosen dienen könnten (205). Ein weiterer Ansatz zur Thrombosedagnostik ist die Verwendung des RGD-Peptid, einem Zelladhäsionspeptid, das in der Thrombusbildung eine Rolle spielt, als Oberflächenbestandteil von SPIO (93).

Interventionsführung: Der lang anhaltende intravasale Signalanstieg von USPIO kann dazu genutzt werden, eine MR-kontrollierte Gefäßintervention, z.B. das Platzieren von Gefäßstents, über die verbesserte Visualisierung sowohl der Gefäße als auch des Katheters zu ermöglichen (245).

Blutungsnachweis: Der Nachweis einer Blutungsquelle stellt häufig ein diagnostisches Problem dar. Blut-Pool Kontrastmittel akkumulieren am Blutungsort, ihre Akkumulation kann dann MR-tomographisch nachgewiesen werden. Experimentell gelang der Nachweis von pulmonalen Hämorrhagien nach intravenöser Injektion von NC100150 in Verbindung mit einer 3D-MR-Angiographie Sequenz (255).

2.4.4 Perfusionsstudien

Bei Verwendung von niedermolekularen MR-Kontrastmitteln (z.B. Magnevist®, Omniscan®), die rasch in das Interstitium extravasieren, können Parameter der Gewebepfusion lediglich durch schnelle Messungen während der Anflutungsphase nach intravenöser Injektion erhoben werden. Dies limitiert die räumliche Auflösung bzw. das Volumen bei der Abbildung des Zielgebietes. Intravasal verbleibende Kontrastmittel, wie z.B. SPIO oder USPIO ermöglichen Messungen sowohl während der Anflutungs- als auch Equilibriumphase, wodurch mehr Flexibilität bezüglich der Messtechnik bzw. der Volumendeckung besteht. Aufgrund der physikalischen Eigenschaften von SPIO können

für die Bildgebung entweder T1-gewichtete oder T2-gewichtete Sequenzen eingesetzt werden. Die Bestimmung von Parametern für die Gewebepfusion ist einerseits in der Bildgebung von Tumoren relevant, etwa im Zusammenhang mit Fragen der Angiogenese, andererseits können Daten zur Perfusion von gesundem Gewebe, insbesondere jedoch von ischämischem Gewebe (z.B. Myokard, Cerebrum) erhoben werden.

Tumorperfusion: Die dynamische, T1-gewichtete Bildgebung während der Anflutungsphase nach intravenöser Injektion von USPIO erlaubte an experimentellen Mammatumoren die Bestimmung der mikrovaskulären Permeabilität und des fraktionalen Plasmavolumens (239, 240). Aus der guten Korrelation der mikrovaskulären Permeabilität mit der histologisch ermittelten mikrovaskulären Dichte können daher nicht invasiv Parameter über die Angiogenese ermittelt werden. Es konnte auch gezeigt werden, dass aus den Daten der Perfusionsstudien mit USPIO Rückschlüsse auf das Tumorgrading möglich sind. Insbesondere deutet sich in diesen experimentellen Studien eine Unterscheidungsmöglichkeit zwischen benignen und malignen Mammatumoren an, wobei benigne Tumoren im Gegensatz zu Malignomen keine Zeichen einer mikrovaskulären Permeabilität aufweisen. USPIO scheinen in gleicher Weise wie die schon seit längerem hierfür verwendeten Gd-haltigen Makromoleküle (z.B. Gd-DTPA-Albumin) für experimentelle Untersuchungen der Tumolvaskularisation geeignet zu sein (241). In einer klinischen Studie zur MR-Diagnostik von Mammatumoren konnte für das USPIO NC100150 (Clariscan®) gezeigt werden, dass der aus dem Signalverhalten ermittelte Wert für die mikrovaskuläre Permeabilität signifikant mit dem histologisch ermittelten Tumorgrad korrelierte und somit ein positiver prädiktiver Wert für den Nachweis von Malignität von 78% erzielt wurde (52). In einer klinischen Studie an Patienten mit hepatozellulären Karzinomen korrelierte das Ausmaß des intratumoralen Signalabfalles in der dynamischen T2-gewichteten Untersuchung nach bolusförmiger intravenöser Injektion von SPIO (SHU 555 A) gut mit dem Differenzierungsgrad der Tumoren (91).

Myokardperfusion: Schon 1991 zeigten Rozenman und Mitarbeiter für AMI-25 experimentell in Messungen während der Equilibriumphase mit T2-gewichteten Sequenzen für normales Myokard eine Signalminderung, für Myokard, das einem Koronararterienverschluss nachgeschaltet war, eine unveränderte Signalintensität und für reperfundiertes Myokard eine im Vergleich zum normalen Myokard verstärkte Signalminderung. Sie schlossen hieraus die Möglichkeit, mit SPIO normales, ischämisches und reperfundiertes Myokard unterscheiden zu können (184). Bjerner und Mitarbeiter fanden in einer klinischen Anwendung von USPIO (NC100150) mit Untersuchungen in der Anflutungsphase einen signifikanten Signalabfall in normal

perfundiertem Myokard und schließen aus ihren Ergebnissen, dass mit der T2-gewichteten Messung während der Anflutungsphase die myokardiale Perfusion quantifiziert werden kann (20). Unter Ausnutzung des T1-Effektes von USPIO können mit T1-gewichteten Sequenzen die myokardiale Perfusion sowohl in der Anflutungs- als auch Equilibriumphase dargestellt und ischämische Areale abgegrenzt werden (19, 159). Es wird in einigen dieser Arbeiten auch aufgezeigt, dass weitere messtechnische Verbesserungen vor einem Einsatz in der klinischen Diagnostik erforderlich sind.

2.5 *Rezeptor- und Antikörper-vermittelte Kontrastierung, Zellmarkierung*

Sehr kleine SPIO (z.B. USPIO, MION) bieten aus zwei Gründen gute Voraussetzungen für diese Formen der „Molekularen Bildgebung“. Zum einen können an die Hülle Antigene oder Antikörper gebunden werden, wobei der Gesamtdurchmesser der Partikel klein genug bleibt, um ihre Extravasation durch Kapillarfenestrationen oder über interendotheliale Zwischenräume zu ermöglichen, was eine Voraussetzung für das Funktionieren derartiger Ansätze in vivo ist. Zum anderen können die Partikel durch ihre starke signalbeeinflussende Wirkung MR-tomographisch noch in geringen Konzentrationen nachgewiesen werden. Hieraus haben sich Ansätze zur Rezeptor- und Antikörper-vermittelten Kontrastierung verschiedenen Zielgewebes sowie zur Markierung von Zellen zur in-vivo Darstellung der Zellmigration entwickelt. Ein generelles Problem dieser Ansätze besteht in der Anreicherung der Partikel in Leber und Milz durch unspezifische Phagozytose von RES-Zellen.

2.5.1 *Rezeptor-vermittelte Kontrastierung*

Die Bindung eines Antigens an bestimmte Rezeptoren auf der Zelloberfläche führt zur Internalisierung dieses Komplexes in das Zellinnere, das Antigen wird hier freigesetzt, der Rezeptor erscheint erneut auf der Zelloberfläche. Es konnte experimentell beispielhaft gezeigt werden, dass die Kopplung von USPIO oder MION an ein Antigen zu einer intrazellulären Anreicherung der Partikel über eine solche Rezeptor-vermittelte Endozytose führen kann. USPIO, die mit Arabinogalactan oder Asialofetuin beschichtet sind, werden durch Asialoglykoproteinrezeptoren auf Hepatozyten gebunden und internalisiert. Es kommt daher zu einer Anreicherung der Partikel in der Leber nicht durch die unspezifische Phagozytose der Kupffer-Zellen, sondern durch die Rezeptor-vermittelte Aufnahme der Partikel in Hepatozyten (197, 264). Experimentell konnte weitergehend gezeigt werden, dass mit diesem Ansatz nicht nur Lebermetastasen verbessert MR-tomographisch dargestellt werden, sondern auch lebereigene von sekundären

Lebertumoren differenziert werden können (175, 177). Des Weiteren zeigen experimentelle Daten, dass auf diesem Weg eine diffuse Leberschädigung oder eine Regeneration des Lebergewebes festgestellt werden kann (125). Pankreasgewebe konnte experimentell mit Cholecystokinin-beschichteten USPIO kontrastiert werden, wodurch sich Pankreastumore verbessert abgrenzen ließen (178). Zahlreiche Tumoren weisen auf ihren Zelloberflächen eine hohe Dichte an Transferrin-Rezeptoren auf. Daher reichern diese Tumoren Transferrin-beschichtete USPIO nach intravenöser Injektion an. Hieraus ergibt sich ein Ansatz zur verbesserten MR-tomographischen Diagnostik solcher Tumoren (114). Apoptotische Zellen lassen sich mit Konjugaten aus CLIO und Annexin V oder Synaptotagmin I markieren (198, 275). Aus diesen Ansätzen könnten sich Methoden zum Beispiel zur verbesserten Kontrolle einer Tumorthherapie entwickeln.

2.5.2 Antikörper-vermittelte Kontrastierung

Konjugate aus SPIO und Antikörpern werden seit langem zum in-vitro Nachweis von Bestandteilen von Blut oder Serum verwendet. Für etliche SPIO-Antikörper Kombinationen konnte experimentell eine prinzipielle Eignung zur spezifischen Kontrastierung pathologischer Gewebeveränderungen nachgewiesen werden (41, 180). Mit einem Komplex aus MION und polyklonalem IgG konnten Weissleder und Mitarbeiter entzündliche Muskelareale in einem Modell für Myositis MR-tomographisch darstellen. Allerdings wurde ein großer Anteil des Kontrastmittels auch unspezifisch in Leber und Milz aufgenommen (261). Weitere ähnliche Ansätze sind die Markierung eines Myokardinfarktes mit einem Konjugat aus MION und Antimyosin Fab (262) oder der Nachweis einer E-Selectin Expression mit einem Konjugat aus CLIO und Anti E-Selectin Fragmenten mit der Perspektive, Angiogenese oder Atherosklerose zu detektieren (99). Eine tumorspezifische Diagnose könnte aus der Kopplung von USPIO und Antikörpern gegen Carcinoembryonales Antigen (237), gegen Gliomzell-Oberflächenantigen (224) oder gegen Rezeptoren für epidermalen Wachstumsfaktor (223) resultieren. Die lokale Konzentration von SPIO-Antikörper Konjugaten hängt einerseits von seiner Gewebekonzentration und damit der applizierten Dosis und andererseits von der Dichte des entsprechenden Antigens im Zielgewebe ab. Da mit diesem Ansatz keine aktive Akkumulation verbunden ist, sind für einen im MR-Bild sichtbaren Effekt relativ hohe Dosen des Kontrastmittels notwendig (200 $\mu\text{mol Fe/kg}$ und mehr).

2.5.3 Magnetische Zellmarkierung

In den letzten Jahren haben Entwicklungen in der Stammzelltherapie einen Bedarf an Techniken zur Kontrolle des Verbleibs der implantierten Zellen geweckt. Zu diesem so genannten in vivo Monitoring der Zellmigration sind SPIO besonders geeignet, da sie

durch Inkubation in der entsprechenden Zellkultur intrazellulär über spezifische oder unspezifische Mechanismen angereichert werden (65, 209, 257). Nach Implantation der Zellen in das Zielgewebe kann dann die MR-tomographische Kontrolle des Verbleibs dieser Zellen erfolgen. Magnetisch markierte neurale Progenitorzellen konnten in vivo bis zu sechs Wochen nach Implantation nachgewiesen werden (34, 35, 68, 126). Mit ähnlichen Ansätzen können auch Entzündungszellen wie z.B. T-Zellen oder Neutrophile Granulozyten ex vivo mit USPIO oder MION markiert werden. Nach ihrer Injektion reichern sich diese Zellen an Entzündungsherden an (42, 115, 272, 273). Hieraus ergibt sich eine Möglichkeit des MR-tomographischen Entzündungsnachweises.

2.6 Magen-Darm Kontrastierung

Im Gegensatz zu den vorgenannten Präparationen von SPIO, die mit bioabbaubaren Materialien umhüllt sind, besitzen SPIO zur Kontrastierung des Magen-Darm-Traktes eine nicht abbaubare Umhüllung (131). Dies soll eine Resorption von Bestandteilen der Kontrastmittel verhindern. Zusätzlich sind diese oralen Präparationen mit Quellstoffen (z.B. Stärke oder Cellulose) versetzt, die eine gleichmäßige Verteilung der Partikel gewährleisten sollen. Hiermit wird verhindert, dass es zu lokalen Konzentrationen der Partikel und damit zu Suszeptibilitätsartefakten kommt (30). Es sind derzeit zwei Substanzen für die klinische Anwendung zugelassen (Abdoscan®, Fa. Amersham und Lumirem®, Fa. Guerbet). Die Partikel haben im Vergleich zu Substanzen zur intravenösen Anwendung größere Durchmesser (ca. 3,5 µm bzw. 300 nm) und führen vorwiegend zu einer T₂-Verkürzung und damit zu einem Signalverlust im Lumen des Magen-Darm-Traktes. Der diagnostische Nutzen besteht einerseits in einer Verminderung von Bewegungsartefakten von Inhalt des Magen-Darm-Traktes durch Peristaltik und damit verbesserter Darstellung von Umgebungsstrukturen, z.B. retro- oder intraperitonealer Raumforderungen bzw. von Pankreasveränderungen, andererseits zu einer verbesserten Abgrenzbarkeit der Darmwand selbst. Hier hat sich die Beurteilung von entzündlichen Darmveränderungen (Morbus Crohn, Colitis ulcerosa) als wichtige Indikation erwiesen (50).

2.7 SPIO in der Therapie: Drug Carrier, Hyperthermie

2.7.1 SPIO als Drug Carrier, Gentherapie

Mit dem Ziel, Medikamente, insbesondere Zytostatika in der Tumorthherapie, nach intravenöser oder intraarterieller Injektion in das Zielgewebe zu bringen, sind verschiedene so genannte Drug Carrier erprobt worden. Hierbei ist vor allem die liposomale Verkapselung von Doxorubicin experimentell und klinisch eingesetzt worden.

SPIO eignen sich theoretisch ebenfalls als Träger für Medikamente, die auf der Oberfläche der Partikel gebunden werden. Techniken, um die Partikel in das Zielgewebe zu bringen, umfassen die Akkumulation mit einem entsprechend platzierten, starken Magnetfeld, die transarterielle Embolisation der versorgenden Arterien oder auch die zusätzliche Beschichtung mit spezifisch in dem Zielgewebe bindenden Molekülen, z.B. mit entsprechenden Antikörpern (105, 161). Allerdings sind die Erfahrungen mit SPIO als Drug Carrier noch begrenzt. In diesem Zusammenhang sind experimentelle Ansätze interessant, SPIO gleichzeitig als Träger sowie auch als Marker für die Kontrolle einer Gentherapie einzusetzen (263). Bei der so genannten Magnetotransfektion werden Nukleotide an SPIO gebunden und diese Konstrukte mit einem Magnetfeld in das Zielgewebe dirigiert. Der Erfolg dieser Einbringung kann anschließend MR-tomographisch kontrolliert werden (199).

2.7.2 SPIO in der Hyperthermie

In der Tumorthherapie ist der Effekt einer Hyperthermie seit langem bekannt (8). Eine lokalisierte Hyperthermie in einem externen elektromagnetischen Wechselfeld kann durch SPIO vermittelt werden. Nach Einbringung von SPIO in das Zielgewebe entweder über eine direkte perkutane Injektion oder über eine transarterielle Embolisation führt ein externes magnetisches Wechselfeld zu einer Erwärmung dieser Partikel und damit des Tumors mit Therapieeffekt (96, 97, 147, 193). Als Mechanismen für diese Erwärmung wird für superparamagnetische Partikel mit Größen unter ca. 100 nm die kinetische Erwärmung angeführt. Größere, ferromagnetische Partikel können ebenfalls zur Vermittlung einer Hyperthermie angewendet werden, hier führt die hysteretische Erwärmung zu dem gewünschten Effekt. Interessant erscheint hier das experimentelle Ergebnis, dass die Einbringung der Partikel über eine transarterielle Embolisation im Vergleich zur direkten perkutanen Injektion bei einer vergleichbaren intratumoralen Temperatursteigerung auf ca. 48°C zu einem deutlich besseren Therapieeffekt bis hin zur vollständigen Tumorremission führt (146).

2.8 *Aufbau, Herstellung, physikalische Eigenschaften magnetischer Eisenoxid-Partikel*

2.8.1 *Aufbau magnetischer Eisenoxid-Partikel*

Eisen existiert in der Natur hauptsächlich in Form von Verbindungen, z.B. als Eisenoxid (Magnetit). Heute werden Magnetite mit verschiedenen Herstellungsverfahren für zahlreiche technische (z.B. Datenträger) und medizinische Anwendungen (z.B. MR-Kontrastmittel) entwickelt (Abbildung 2.1). Metallisches Eisen findet sich nur im Erdinnern

und in Meteoriten. Neben der geologischen Verbreitung von Magnetiten gibt es auch „physiologische“ Vorkommen z. B. in Pflanzen (138) und in niederen Tieren („magnetotaktische“ Bakterien), aber auch in Säugern (Walfisch). Magnetische Eisenoxide sind auch im menschlichen Gehirn entdeckt worden (106). Die magnetischen Eigenschaften der Eisenoxide werden durch die Kristallstruktur festgelegt. Das Eisen-III-oxid Fe_2O_3 (Ferrioxid, Roteisenstein) tritt in verschiedenen rotbraunen Modifikationen auf: Das Alpha- Fe_2O_3 (Hämatit, „Rost“), die häufigste Form, ist paramagnetisch und kristallisiert in Rhomboedern („hexagonal dichteste Packung des Sauerstoffes“). Das Gamma- Fe_2O_3 , kristallisiert kubisch („kubisch dichteste Packung des Sauerstoffs“) und entsteht bei vorsichtiger Oxidation von nanopartikulärem Fe_3O_4 unter 270 Grad Celsius. Das braunschwarze Eisen-II,III-oxid $\text{Fe}^{2+}(\text{Fe}^{3+})_2\text{O}_4$ (Ferroferrioxid, Magnetit) ist auf nanopartikulärer Ebene das unbeständigste Eisenoxid (Abbildung 2.2). In Anwesenheit von Sauerstoff oxidiert es bereits bei Raumtemperatur zu Maghämmit und bei hohen Temperaturen über 270 Grad Celsius zu dem stabilen Hämatit. Hieraus ergibt sich der Name Maghämmit, welcher aus Magnetit und Hämatit zusammengesetzt wurde. Die Bezeichnung Magnetit geht wahrscheinlich auf den ersten Fundort nahe der kleinasiatischen Stadt Magnesia (Makedonien) zurück (Magnetis lithos = Stein aus Magnesia). Der Name Hämatit entstammt von dem griechischen Wort „hämateios“, welches „blutig“ bedeutet. Ebenfalls auf die rote Farbe des Minerals spielt die deutsche Bezeichnung „Roteisenstein“ an.

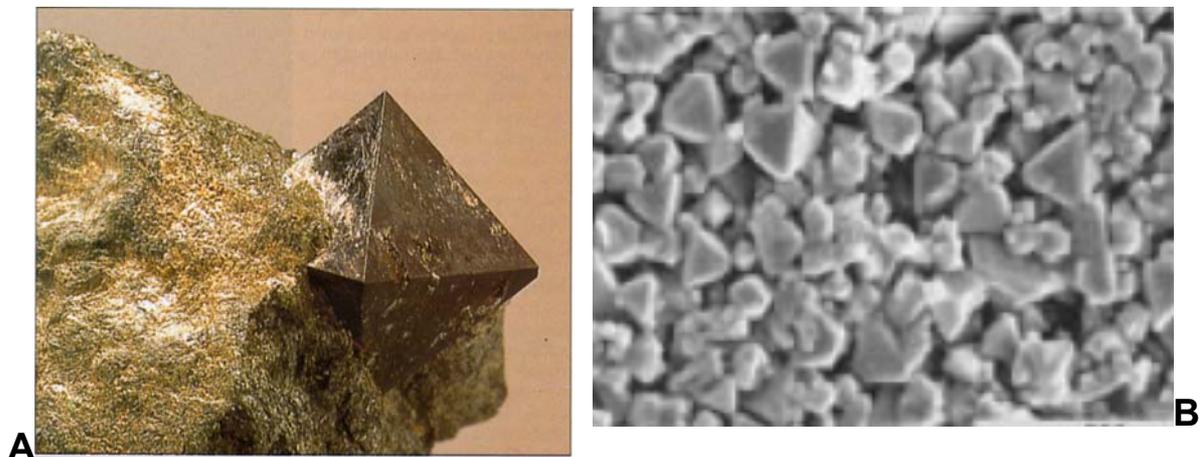


Abbildung 2.1: (A) Natürlicher Magnetitkristall in oktaedrischer Form (aus (167))
 (B) Synthetische nanopartikuläre Magnetitkristalle in einer rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme (aus (85))

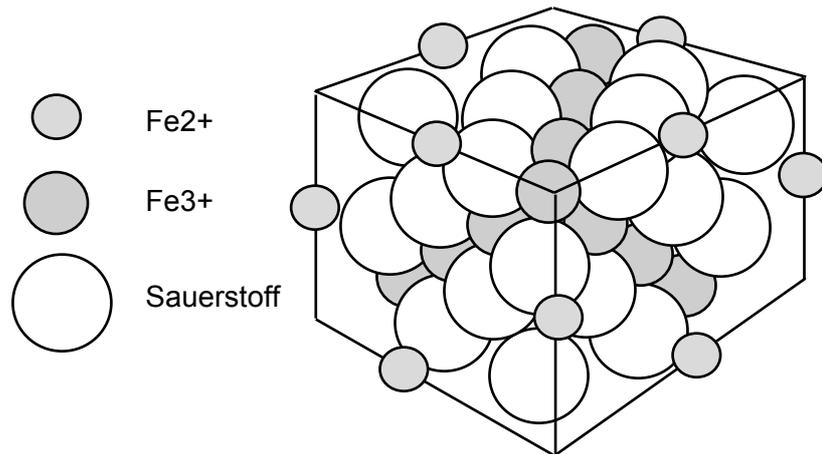


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des Kristallgitters des Magnetit (nach (217))

Bei den magnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln, die Anwendung als Kontrastmittel in der MR-Tomographie finden, handelt es sich um ein Magnetit-Maghämit-Gemisch in der Regel mit einem Anteil von zweiwertigen Eisenionen unter 6% vom Gesamteisenanteil. Generell unterscheidet sich das Kristallgitter von Magnetit und Maghämit nicht. Die Sauerstoff-Ionen liegen in dichtester kubischer Kugelpackung vor, während die Eisen(II)- und Eisen(III)-Ionen genau festgelegte Plätze in oktaedrischen bzw. tetraedrischen Lücken dieser Packung einnehmen. In dem reinen Magnetit besetzen die Eisenionen die Hälfte der vorhandenen Oktaederlücken und die Hälfte der vorhandenen Tetraederlücken. Die Aufteilung der zwei- und dreiwertigen Eisenionen erfolgt entsprechend einem inversen Spinell, das heißt, eine Hälfte der dreiwertigen Eisenionen besetzt die Tetraederlücken und die andere Hälfte, zusammen mit den zweiwertigen Ionen besetzt die Oktaederlücken. Der Maghämit leitet sich von dieser Struktur ab, mit dem Unterschied, dass nur dreiwertiges Eisen existiert und zum Ladungsausgleich Leerstellen auf den Oktaederplätzen entstehen. Die Eisenleerstellen können sich je nach Darstellungsbedingungen auf zwei verschiedene Weisen anordnen. Einerseits erfolgt eine statistische Leerstellenverteilung, wobei die kubische Raumgruppe erhalten bleibt, oder andererseits führt eine regelmäßige Anordnung der Leerstellen dazu, dass die Elementarzelle in eine Raumrichtung verdreifacht werden muss, um den Maghämit zu beschreiben. Es entsteht somit eine tetragonale Struktur. Diese Anordnung bewirkt, dass der Elektronentransfer zwischen den Eisen-Ionen nur in bestimmten Richtungen abläuft. Aus dieser vektoriellen Stromrichtung resultieren gerichtete magnetische Felder, die zum magnetischen Verhalten des Magnetits und Maghämits führen.

2.8.2 Physikalische Eigenschaften magnetischer Eisenoxid-Partikel

Bei makroskopischer Betrachtung sind Magnetit und Maghämmit ferrimagnetisch. Der Ferrimagnetismus entspricht im Prinzip dem Ferromagnetismus. Dies bedeutet, dass bei Anlegen eines äußeren Magnetfeldes eine Magnetisierung stattfindet, die nach Abschalten im Sinne der magnetischen Remanenz erhalten bleibt. Aufgrund dieser Eigenschaften findet das Maghämmit Anwendung bei elektronischen Datenspeichern, da die Magnetisierung nach Abschalten des äußeren Magnetfeldes bestehen bleibt und die Information speichert. Dem Maghämmit wird dabei aufgrund der höheren chemischen Stabilität gegenüber dem Magnetit der Vorzug gegeben, da das Maghämmit erst bei Temperaturen über 200°C zu dem Hämatit oxidiert.

Beim Ferromagnetismus ist die Magnetisierung nur parallel zum äußeren Magnetfeld ausgerichtet. Beim Ferrimagnetismus kommt es aufgrund der unterschiedlichen Platzierung der dreiwertigen Eisenionen auf Oktaeder- bzw. Tetraederplätze im Magnetit und Maghämmit zu einer parallelen und gleichzeitig antiparallelen Magnetisierung, welche die parallele Magnetisierung abschwächt. Ferrimagneten weisen daher eine schwächere Nettomagnetisierung auf als Ferromagneten. Anhand der Abbildung erkennt man zudem, dass beim Übergang des Magnetit zum Maghämmit mit Abnahme der Eisenionen der Oktaederplätze (Kristallebene B) die Magnetisierung in paralleler Richtung abnimmt. Für das Maghämmit ist daher die makroskopisch messbare Sättigungsmagnetisierung geringer als für das Magnetit.

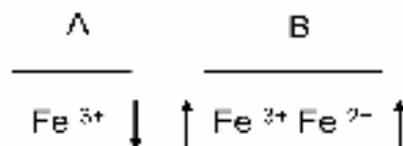


Abbildung 2.3: Ferrimagnetische Eigenschaft des Magnetit mit paralleler und antiparallel gerichteter Magnetisierung in Abhängigkeit der Ebene des Kristallgitters (A) mit dreiwertigen Eisenionen in den Tetraederlücken und (B) den zwei- und dreiwertigen Eisenionen in den Oktaederlücken. Da beim Maghämmit die Anzahl der Eisenionen in den Oktaederlücken abnimmt, wird die Magnetisierung in die parallele Richtung geringer. Dadurch wird die Nettomagnetisierung geringer.
Aus (37)

Beim Unterschreiten der Kristallit-Größe unter ca. 200 nm führen quantenmechanische Vorgänge innerhalb der Kristalle dazu, dass die Magnetisierung nach Abschalten des äußeren Magnetfeldes innerhalb der Magnetit- oder Maghämite-Kristalle zerstört wird. Man spricht dabei von so genannten „Single Domain“ Partikeln. In einer wässrigen Lösung wird die makroskopisch messbare Entmagnetisierung zusätzlich durch die Brownsche Molekularbewegung der einzelnen Partikel beschleunigt. Diese makroskopisch messbare Eigenschaft wird als Superparamagnetismus bezeichnet.

Alle Eisenoxid-basierten Nanopartikel, die als Kontrastmittel in der MRT-Diagnostik eingesetzt werden, besitzen die Eigenschaft des Superparamagnetismus. Für die Kontrastbeeinflussung hat dies verschiedene Konsequenzen. Da in der vorliegenden Studie die Entwicklung eines Eisenoxid-basierten Kontrastmittels für die MR-Angiographie im Vordergrund steht, ist besonders der T_1 -Relaxationszeit verkürzende Effekt von Bedeutung. Der T_2 -Relaxationszeit verkürzende Effekt ist dabei eher störend, da dies zu einem Signalverlust führen kann. Bei der Herstellung kann ein günstiges Verhältnis von T_1 - zu T_2 -Relaxationszeit verkürzender Wirkung durch Erhöhung des Maghämite-Anteils im Kristall erreicht werden, was bei den kleinen Kristallitgrößen von unter 8 nm, die im Zusammenhang mit MR-Kontrastmitteln relevant sind, z.B. durch einfache Wärmezufuhr unter Sauerstoffatmosphäre erreicht werden kann.

2.8.3 Herstellungswege

Die Synthese der Eisenoxide vom Spinell-Typ unterscheidet zwei wesentliche Verfahren: Das Sinterverfahren mit hoher Temperatur und anschließender mechanischer Zerkleinerung und die Synthese in Lösung. Für pharmazeutische Anwendungen werden wegen der erforderlichen geringen Partikelgrößen nur die nasschemischen Synthesen angewandt. Bei der nasschemischen Herstellung der Partikel werden saure $Fe^{2+}/3+$ -Lösungen ($FeCl_3$ und $FeCl_2 \cdot 4H_2O$) in der Wärme unter nicht oxidierender Atmosphäre durch Zugabe von Lauge (NaOH, NH_4OH) auf einen basischen pH-Wert eingestellt. Das sich bildende Magnetit wird in Anwesenheit des Hüllmaterials stabilisiert (Eintopfverfahren) oder das Hüllmaterial nach Kristallbildung zugesetzt (Zweitopfverfahren) (81, 162).

Durch diese nasschemische Fällung entsteht primär überwiegend Magnetit. Bei Partikeln über 10 nm kann eine Oxidation zu Maghämite durch die Zugabe von Eisen-(III)-Nitrat erfolgen (15). Sehr kleine Partikel zeigen eine spontane Oxidation durch den im wässrigen Medium gelösten Luftsauerstoff. Bei Raumtemperatur sind diese Oxidationsprozesse sehr langsam und dauern Wochen bis Monate. Durch einfache Erhitzung wird dieser Prozess beschleunigt und ab 80°C kann eine komplette Oxidation

zu Maghämät innerhalb von einer Stunde erreicht werden (228). Wichtig hierbei ist, dass aufgrund der Enge des Kristallgitters die Umwandlung von Magnetit zu Maghämät durch Wanderung der Eisenionen innerhalb des Sauerstoffgitters an die Partikeloberfläche stattfindet und nicht durch Veränderung des Sauerstoffgitters.

Die Synthesebedingungen wie Art der Eisensalze, Temperatur, Hüllpolymer- oder monomer, Titrationsgeschwindigkeit, Alkaliwahl, Reinigung und/oder Fraktionierung beeinflussen die physikalisch-biologischen Eigenschaften der Eisenoxide. Die genauen Reaktionsbedingungen entscheiden die pharmazeutisch-galenische Qualität und sind „Betriebsgeheimnis“ der Herstellerfirmen. Gemeinsames Merkmal der für die MR-Diagnostik synthetisierten Eisenoxide ist die magnetitartige Kristallstruktur, die die Voraussetzung für das superparamagnetische Verhalten ist.

Eine mögliche Herstellung Citrat-stabilsierter Eisenoxide besteht in der Zugabe von konzentrierter Ammoniumhydroxyd-Lösung zu einer wässrigen Lösung aus Eisen-(II)-Chlorid und Eisen-(III)-Chlorid mit Trinatriumcitrat (140, 163). Dabei bedingt die Konzentration des Trinatriumcitrats bzw. das molare Verhältnis von Eisen zu Trinatriumcitrat die Größe der entstehenden Partikel. So entstehen bei einem molaren Anteil von 2% Trinatriumcitrat im Verhältnis zum Gesamteisen Partikel über 10 nm. Je höher der Anteil von Trinatriumcitrat ist, umso kleiner werden die Partikel. Allerdings werden die Partikel ab einem Anteil von über 10% so klein, dass sie zum Aggregieren neigen und die kolloidale Lösung dadurch instabil wird.

Nach der Primärfällung erhält man ein polydisperses Partikelgemisch, aus dem man durch verschiedene Filtrationsschritte den gewünschten Partikelanteil heraustrennen kann.

Damit die Partikel nach der Herstellung stabil und in Lösung bleiben sowie auch während oder nach der i.v. Injektion nicht aggregieren, werden die Eisenoxid-Kerne mit einer entsprechenden Oberflächenbeschichtung versehen. Diese Stabilisierung wird für biomedizinische Anwendungen in der Regel durch eine Beschichtung mit polymeren Substanzen realisiert, z.B. mit Dextran (170, 192), Carboxydextran (121), Albumin (267), Stärke (113) u.a.m.. Die voluminösen Molekülanteile der Beschichtung verhindern im Sinne eines Abstandshalters zwischen den Partikelkernen eine Aggregation der Partikel. Daher wird diese Art der Stabilisierung auch sterische Stabilisierung genannt. Eine weitere Möglichkeit der Stabilisierung führt über die Beschichtung der Eisenoxid-Kerne mit Substanzen, die eine negative oder positive Ladung aufweisen. Dies führt zur Abstossung der Partikel untereinander aufgrund elektrostatischer Effekte (122). Diese Art der Stabilisierung wird daher elektrostatische Stabilisierung genannt (Abbildung 2.4). Als

Beschichtungsmaterial können verschiedene niedermolekulare aliphatische Di- oder Polycarbonsäuren oder deren Derivate verwendet, wie z.B. Apfelsäure, Weinsäure, Citronensäure oder Asparaginsäure. Wenn Präparationen von Eisenoxid-Nanopartikeln entsprechend stabilisiert in einem flüssigen Medium dauerhaft gleichmäßig verteilt bleiben, d.h. sich nicht entmischen oder absetzen, kann von einer Lösung gesprochen werden.

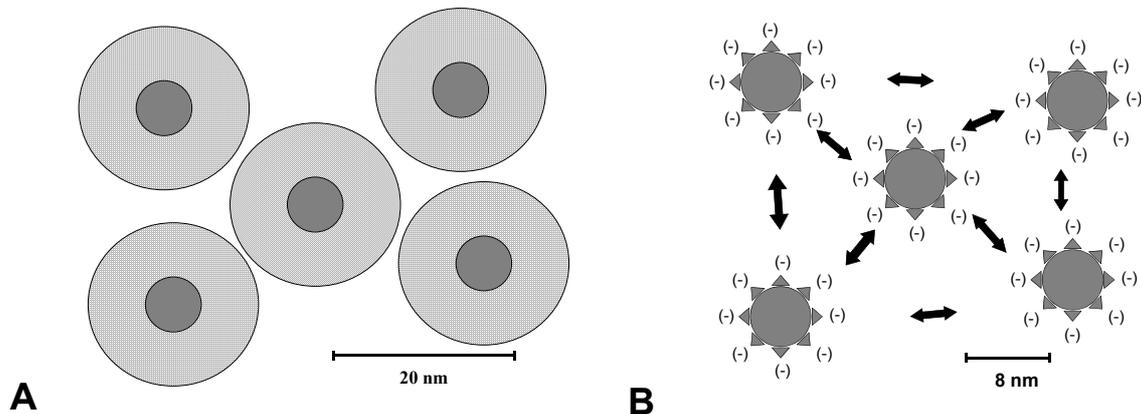


Abbildung 2.4

Schematischer Vergleich von zwei Methoden zur Stabilisierung von Eisenoxid-Nanopartikeln: (A) Die Umhüllung der Partikelkerne mit einer polymeren Substanz verhindert ihre Aggregation durch die Funktion des Hüllmaterials als mechanischer Abstandhalter (=sterische Stabilisierung); (B) die Umhüllung der Partikelkerne mit geladenen Molekülen, in diesem Fall mit einer negativ geladenen monomeren Substanz, verhindert die Aggregation der Partikel durch elektrostatische Abstoßung (=elektrostatische Stabilisierung).

Ein weiterer Aspekt bei der Herstellung von magnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln, der insbesondere für die *in vivo* Anwendung am Tier oder am Menschen von Bedeutung ist, betrifft die Herstellung einer endgültigen galenischen Formulierung. Ihr Ziel liegt primär in der Einstellung des pH-Wertes und der Osmolalität auf physiologische Werte.