

**Herstellung und Charakterisierung  
neuer nanopartikulärer SPIO-Kontrastmittel  
für die Magnetresonanztomographie**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der  
Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Biowissenschaften  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
von  
Jessica Lohrke  
geboren am 06.11.1977 in Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. Karsten Mäder  
2. Prof. Dr. Thomas Groth  
3. Prof. Dr. Werner Weitschies

Halle (Saale), den 17. August 2009

Verteidigungsdatum: 15. Februar 2010

*Ein Gelehrter in seinem Laboratorium ist nicht nur ein Techniker; er steht auch vor den Naturgesetzen wie ein Kind vor der Märchenwelt.*

*(Marie Curie)*

## **Hinweise zur verwendeten Nomenklatur:**

Zur Unterscheidung der unterschiedlichen Synthese- und Formulierungsstufen der *superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikel (SPIO-Partikel bzw. SPIOs)* wurde einheitlich die folgende Nomenklatur verwendet. Nach der Synthese wurden die SPIO-Partikel als *SPIO-Rohdispersion* bezeichnet. Die Fraktionen mit unterschiedlichen Partikelgrößen, welche mittels magnetischer Separation aus der SPIO-Rohdispersion gewonnen wurden, wurden *SPIO-Fraktionen* genannt. Nach der Formulierungsentwicklung, das heißt nach Hilfsstoffzugabe und Sterilisation der SPIO-Fraktionen, wurden die SPIOs als *SPIO-Formulierungen* bzw. verkürzt, im Folgenden auch als *SPIO-Chargen* bezeichnet.

Die nach der Chargenbezeichnung in Klammern stehende Partikelgröße in nm entspricht der Zielgröße der SPIO-Fraktionen während der magnetischen Separation. Diese Zielgröße war ausschlaggebend beim Zusammenfassen ähnlich großer SPIO-Fraktionen nach der magnetischen Separation und entspricht nicht der tatsächlichen Partikelgröße der hergestellten SPIO-Formulierungen. Die Zielgröße ist jedoch annähernd vergleichbar mit den hydrodynamischen Durchmessern der DLS „in-batch“ Methode.

Als *DLS „in-batch“* Methode wird eine dynamische Lichtstreuungsmessung der gesamten zu analysierenden Probe ohne vorherige Partikelgrößenseparation bezeichnet. Diese Differenzierung war notwendig, da in der vorliegenden Arbeit die dynamische Lichtstreuung auch mit der asymmetrischen Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung (*A4F/DLS*-Methode) gekoppelt wurde und die SPIO-Partikel in diesem Fall im A4F-Trennkanal in verschiedene Partikelgrößen aufgetrennt werden, bevor sie mittels DLS vermessen werden.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Zielsetzung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Theoretische Grundlagen</b>	<b>3</b>
2.1	Magnetresonanztomographie	3
2.1.1	Physikalische Grundlagen der Magnetresonanztomographie	3
2.1.2	Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie	6
2.2	Grundlagen des Magnetismus	8
2.2.1	Magnetismus in Festkörpern	8
2.2.2	Superparamagnetismus	11
2.3	Superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel	13
2.3.1	Anwendungen superparamagnetischer Eisenoxid-Nanopartikel	13
2.3.2	Aufbau und Struktur der SPIO-Partikel	15
2.3.3	Relaxationstheorie superparamagnetischer Eisenoxidpartikel	17
2.3.4	Pharmakologie von SPIO-Partikeln	20
2.4	Asymmetrische Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung	24
2.4.1	Trennprinzip der A4F	24
2.4.2	Anwendungen der asymmetrischen Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung	27
2.4.3	Geräteaufbau der verwendeten A4F-Methode	29
2.4.4	Dynamische Lichtstreuung	30
2.4.5	Mehrwinkellichtstreuung	31
2.4.6	Polydispersitätsindex	33
2.4.7	Morphologie der Partikel - Formfaktor	34
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>35</b>
3.1	Herstellung der SPIO-Fraktionen	36
3.1.1	Synthese der SPIO-Rohdispersion	36
3.1.2	Herstellung der SPIO-Fraktionen mittels magnetischer Separation	36
3.1.3	Ultrafiltration zur Einstellung des Eisengehaltes	37
3.1.4	Eisenbestimmung mit ICP-OES	38
3.2	Teilchengrößenanalytik	38
3.2.1	Partikelgrößenstandards	38
3.2.2	Dynamische Lichtstreuung und Zetapotential	39

3.2.3	Mehrwinkellichtstreuung .....	40
3.2.4	Asymmetrische Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung .....	40
3.2.5	Analytische Ultrazentrifugation .....	41
3.2.6	Transmissionselektronenmikroskopie .....	42
3.2.7	Kleinwinkel-Röntgenstreuung .....	43
3.3	Magnetische Eigenschaften .....	44
3.3.1	Supraleitende Quanteninterferenzeinheit .....	44
3.3.2	Magnetische Suszeptibilität .....	45
3.3.3	Relaxivitätsmessungen .....	45
3.3.4	Phantom-Messung der SPIO-Formulierungen .....	46
3.4	Zellkultur-Untersuchungen .....	46
3.4.1	Kultivierung der P388-Zellen .....	46
3.4.2	Lichtmikroskopische Aufnahme und Färbung der P388-Zellen .....	47
3.4.3	Quantitative Eisenbestimmung in P388-Zellen nach Phagozytose .....	48
3.4.4	MRT-Phantom-Messung mit SPIO-Partikeln beladener P388-Zellen .....	49
3.5	<i>In vivo</i> Charakterisierung .....	50
3.5.1	Versuchstiere und Haltungsbedingungen .....	50
3.5.2	Inhalationsnarkose mit Isofluran .....	50
3.5.3	Injektionsnarkose Xylazin/Ketamin .....	51
3.5.4	Bestimmung der Bluthalbwertszeiten bei der Ratte .....	51
3.5.5	Bestimmung der Leberhalbwertszeiten bei der Ratte .....	52
3.6	Signifikanztest .....	53
3.7	Ausreissertest nach Grubbs .....	53
3.8	Chemikalien .....	53
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>54</b>
4.1	Herstellung der SPIO-Formulierungen .....	54
4.1.1	Formulierungsentwicklung der SPIO-Fraktionen .....	54
4.1.2	Stabilität der hergestellten SPIO-Formulierungen .....	56
4.2	Teilchengrößenanalytik der SPIO-Formulierungen .....	57
4.2.1	Dynamische Lichtstreuung und Zetapotential .....	57
4.2.2	Validierung der asymmetrischen Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung .....	58
4.2.3	A4F-Analyse von SHU 555 A .....	62
4.2.4	A4F-Analyse der hergestellten SPIO-Formulierungen .....	62

4.2.5	Polydispersitätsindex.....	67
4.2.6	Formfaktor.....	68
4.2.7	Analytische Ultrazentrifugation.....	69
4.2.8	Transmissionselektronenmikroskopie.....	71
4.2.9	Kleinwinkel-Röntgenstreuung.....	74
4.3	Magnetische und bildgebende Eigenschaften der SPIO-Formulierungen.....	78
4.3.1	Messungen mit der supraleitenden Quanteninterferenzeinheit.....	78
4.3.2	Sättigungsmagnetisierungen.....	80
4.3.3	Magnetische Suszeptibilitäten.....	81
4.3.4	R <sub>1</sub> - und R <sub>2</sub> -Relaxivitäten.....	83
4.3.5	MRT-Phantom-Messung.....	84
4.4	<i>In vitro</i> Zellversuche mit den hergestellten SPIO-Formulierungen.....	86
4.4.1	Aufnahme der SPIO-Chargen in P388-Zellen.....	86
4.4.2	MRT-Zellphantom-Messung.....	88
4.5	<i>In vivo</i> Charakterisierung der SPIO-Formulierungen.....	90
4.5.1	Bluthalbwertszeit.....	90
4.5.2	Leberhalbwertszeit.....	92
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>96</b>
5.1	Stabilität der hergestellten SPIO-Formulierungen.....	96
5.2	Partikelgröße und Morphologie.....	96
5.2.1	Eignung A4F-Trennmethode.....	96
5.2.2	Hydrodynamische Radien der SPIO-Chargen.....	97
5.2.3	Polydispersitäten der hergestellten SPIO-Chargen.....	99
5.2.4	Analytische Ultrazentrifugation.....	100
5.2.5	Transmissionselektronenmikroskopie.....	102
5.2.6	Kleinwinkel-Röntgenstreuung.....	104
5.3	Effektivität der SPIO-Formulierungen in der MRT-Bildgebung.....	106
5.3.1	Magnetische Eigenschaften.....	106
5.3.2	Protonenrelaxation in Gegenwart der SPIO-Chargen.....	108
5.4	Phagozytoseaktivität der hergestellten Formulierungen.....	110
5.5	Einfluss der Partikelgröße auf die Bluthalbwertszeit.....	112
5.6	Einfluss der Partikelgröße auf die Leberhalbwertszeit.....	114

<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>116</b>
<b>7</b>	<b>Abstract</b> .....	<b>118</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>121</b>
8.1	Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie.....	121
8.2	Relaxationstheorie superparamagnetischer Eisenoxidpartikel.....	122
8.3	Mehrwinkellichtstreuung - Winkelabhängigkeit der Streulichtintensitäten .....	123
8.4	Kleinwinkel-Röntgenstreuung .....	124
8.5	Reproduzierbarkeit der A4F-Methode .....	125
8.6	Analytische Ultrazentrifugation .....	125
8.7	Superconducting Quantum Interference Device (SQUID) .....	126
8.8	Sättigungsmagnetisierungen.....	126
8.9	Anfangssuszeptibilität .....	127
8.10	Bestimmung des Feinpartikelanteils in Charge E mittels A4F.....	127
8.11	Komplexometrische Phenanthrolinfärbung.....	128
8.12	TEM-Bilder zur Größenbestimmung .....	128
8.13	Berechnung von Partikelgrößenverteilungen .....	129
8.14	Partikelanzahl der hergestellten SPIO-Chargen .....	130
	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>131</b>

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha_i$	Virialkoeffizienten ( $i = 1,2,3\dots$ )
$A_2$	zweiter Virialkoeffizient
A4F	Asymmetrische Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung
AFM	Rasterkraftmikroskop (engl. atomic force microscope)
AUZ	Analytische Ultrazentrifugation
$B_0$	Magnetfeldstärke
BHWZ	Bluthalbwertszeit
$c$	Konzentration
$D$	Diffusionskoeffizient
$\rho$	Dichte (g/ml)
$d_H$	hydrodynamischer Durchmesser (DLS)
DLS	Dynamische Lichtstreuung
$d_{LS}$	Durchmesser (Lichtstreuung)
$dn/dc$	Brechungsindexinkrement
$d_{TEM}$	Durchmesser (TEM)
emu	elektromagnetische Einheit (engl. electro magnetic unit)
FFF	Feld-Fluss-Fraktionierung
$\gamma$	gyromagnetisches Verhältnis
$F_S$	Anzahl superparamagnetische Maghemit- oder Magnetitkerne
$H$	Magnetfeldstärke
$H_C$	Koerzitivfeldstärke
HF-Impuls	Hochfrequenzimpuls
ICP-OES	Optische Emissionsspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma (engl. Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy)
$K$	Lichtstreuungskonstante
$k_B$	Bolzmannkonstante
$K_C/R_0$	Lichtstreuintensität
KM	Kontrastmittel
$\omega_0$	Lamorfrequenz
$\lambda_0$	Laserwellenlänge der statischen Lichtstreuung (632.8 nm)
LAF	Laminar Air Flow



LHWZ	Leberhalbwerzzeit
M	Magnetisierung
$\vec{\mu}$	magnetisches Moment
m	magnetische Quantenzahl
M	Magnetisierung
M/H-Kurve	Hysteresekurve
MALLS	Multi Angle Laser Light Scattering, Mehrwinkellichtstreuung
max	Maximalwert
max <sub>norm</sub>	Maximalwert, normiert auf 1
min	Minimalwert
min <sub>norm</sub>	Minimalwert, normiert auf 0
M <sub>n</sub>	anzahlgewichtete mittlere Molmasse
MPS	Mononukleäres Phagozytensystem
M <sub>R</sub>	magnetische Remanenz, Restmagnetisierung
MRT	Magnetresonanztomographie
M <sub>S</sub>	Sättigungsmagnetisierung
$\mu_0$	magnetische Permeabilität des Vakuums ( $\mu_0 = 4 \pi \cdot 10^{-7} \text{ T}^2 \text{ m}^3 \text{ J}^{-1}$ )
MSB	magnetische Suszeptibilitätswaage (engl. Magnetic Susceptibility Balance)
$\chi_{\text{mass}}$	magnetische Massensuszeptibilität
$\chi_{\text{mol}}$	molare magnetische Suszeptibilität
$\chi_v$	magnetische Volumensuszeptibilität
M <sub>w</sub>	volumengewichtete mittlere Molmasse
M <sub>xy</sub>	Transversalmagnetisierung
M <sub>z</sub>	Longitudinalmagnetisierung
$\mu_{+z}$	parallele Ausrichtung eines Kernspins im Magnetfeld
$\mu_{-z}$	antiparallele Ausrichtung eines Kernspins im Magnetfeld
N	Anzahl der Eisenatome
n <sub>0</sub>	Brechungsindex
$\eta_0$	dynamische Viskosität des reinen Lösemittels
N <sub>A</sub>	Avogadro Konstante, $N_A = 6,0221367 \cdot 10^{23}$
NMR	Kernspinresonanz (engl. nuclear magnetic resonance)
$\vec{P}$	Gesamtdrehimpuls
p	Formfaktor

PDI	Polydispersitätsindex
PSS	Polystyrolstandard
Q	Polydispersitätsindex der Polymerchemie ( $Q > 1$ )
$R_0$	Rayleigh-Verhältnis
$R_1$	longitudinale Relaxivität eines Kontrastmittels (Einheit: $L \text{ mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )
$R_2$	transversale Relaxivität eines Kontrastmittels (Einheit: $L \text{ mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )
RES	Retikuloendotheliales System
$R_G$	Gyrationsradius oder Trägheitsradius
$R_{Gw}$	volumengewichteter Gyrationsradius
$R_H$	hydrodynamischer Radius
$R_{Hn}$	anzahlgewichteter hydrodynamischer Radius
$R_{Hw}$	volumengewichteter hydrodynamischer Radius
SAXS	Kleinwinkel-Röntgenstreuung (engl. Small Angle X-Ray Scattering)
SD	Standardabweichung
SLS	Statische Lichtstreuung (engl. Static Light Scattering)
$\theta$	Streuwinkel
SPIOs	superparamagnetische Eisenoxidpartikel
SPIO-Partikel	superparamagnetische Eisenoxidpartikel
SQUID	Superconducting Quantum Interference Device
T	absolute Temperatur (K)
$t_0$	Totzeit = Elutionszeit des reinen Lösungsmittels
$1/T_1$	longitudinale Relaxationsrate (Einheit: $s^{-1}$ )
$1/T_2$	Spin-Spin oder transversale Relaxationsrate (Einheit: $s^{-1}$ )
$T_1$	Spin-Gitter-Relaxation bzw. longitudinale Relaxation (Einheit: ms)
$T_2$	Spin-Spin-Relaxation bzw. transversale Relaxation (Einheit: ms)
$\tau_{1,2}^0$	Relaxationsrate der Flüssigkeit ohne Zugabe von Kontrastmittel
$\tau_1$	longitudinale Relaxationsrate
$\tau_2$	transversale Relaxationsrate
$\tau_B$	Brownsche Relaxationszeit
$T_C$	Curie Temperatur
$\tau_c$	effektive Korrelationszeit bzw. Relaxationszeit
TE	time to echo, Echozeit
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie oder Transmissionselektronenmikroskop

$t_{\max}$	Retentionszeit im Peakmaximum
$\tau_m$	Austauschrate zwischen innerer und äußerer Schicht nach Solomon-Bloembergen Gleichung
$T_N$	Néel Temperatur
$\tau_N$	Néel Relaxationsrate
$\tau_R$	Brownsche Relaxationsrate
$t_r$	Retentionszeit
$\tau_r$	Rotationsrelaxationszeit eines paramagnetischen Zentrums
TR	Repetitionszeit (time to repeat)
$t_{r25\%}$	Retentionszeit, bei der 25% der injizierten Probe den Kanal verlassen haben
$t_{r50\%}$	Retentionszeit, bei der 50% der injizierten Probe den Kanal verlassen haben
$t_{r75\%}$	Retentionszeit, bei der 75% der injizierten Probe den Kanal verlassen haben
USPIO	Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Particles
UV	Ultraviolettstrahlung (1 - 380 nm)
$v'$	Wertebereich, einer normalisierten Skala zwischen $\min_{\text{norm}}$ (0) und $\max_{\text{norm}}$ (1)
VK	Variationskoeffizient
$V_0$	Totvolumen des Trennkanals der A4F
$V_C$	Querflussrate der A4F
VIS	visueller Bereich des Lichtspektrums
$V_{\text{out}}$	Detektorflussrate der A4F
$V_Z$	Injektorflussrate
w	Kanalhöhe

# 1 Einleitung und Zielsetzung

Die Nanotechnologie ist Teil unseres täglichen Lebens. Von Sonnencremes über kratzfeste Oberflächenbeschichtungen, Molybdänsulfid-Nanoröhren als Schmiermittel bis hin zu neuen innovativen Datenspeichermedien – Nanopartikel sind in vielen Bereichen von großer Bedeutung und finden in der Industrie breite Anwendung [1, 2]. Das interdisziplinäre Wissenschaftsgebiet der Nanotechnologie hat sich in den letzten 20 Jahren rasch entwickelt und zunehmend auch im Bereich der Medizin und Pharmazie an Bedeutung gewonnen.

In der pharmazeutischen Industrie haben Nanopartikel insbesondere aufgrund ihres potentiellen Einsatzes als gezielte Arzneistoffträger („drug targeting“ bzw. „drug delivery“) Aufmerksamkeit erweckt. Durch ein aktives Targeting von wirkstoffbeladenen Trägern können im Zielgewebe hohe Arzneistoffkonzentrationen erreicht und gleichzeitig toxische Nebenwirkungen im gesunden Gewebe vermieden werden [3]. Auch in der galenischen Pharmazie sind nanopartikuläre Arzneiformen von besonderem Interesse. So kann durch eine „Nanoisierung“ die Bioverfügbarkeit von schwer löslichen Arzneistoffen verbessert oder die Wirksamkeit von etablierten Arzneistoffen erhöht und deren Toxizität gesenkt werden („Life-Cycle-Management“). Ein Beispiel dafür sind lang zirkulierende, mit Doxorubicin beladene Liposomen. Durch eine veränderte Galenik gegenüber konventionellem Doxorubicin wird eine verminderte Kardiotoxizität erreicht. Die liposomale Doxorubicin-Formulierung ist bereits seit einigen Jahren zur Behandlung vom AIDS-assoziierten Kaposi-Sarkom und im gynäkologischen Bereich bei fortgeschrittenem Ovarialkarzinom zugelassen [4-7].

Nicht nur in der Krebstherapie spielen nanopartikuläre Formulierungen eine wichtige Rolle. In der diagnostischen Bildgebung werden superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel (SPIO-Partikel) als Kontrastmittel in der Magnetresonanztomographie eingesetzt. In Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Formulierung und der Partikelgröße der SPIO-Partikel, welche die Verteilung im Körper und die Ausscheidung beeinflussen, sind verschiedene klinische Anwendungen wie Angiographie und Leberdiagnostik möglich [8, 9]. Zur Detektion von fokalen Leberläsionen sind zwei intravenöse Formulierungen zugelassen und kommerziell erhältlich: Endorem<sup>®</sup> (Fa. Guerbet) und Ferucarbotran (Resovist<sup>®</sup>, Fa. Bayer Schering Pharma AG). Des Weiteren sind zwei orale Formulierungen zur Darstellung des Gastrointestinaltraktes zugelassen (Lumirem<sup>®</sup>, Fa. Guerbet; Abdoscan<sup>®</sup> Fa. Nycomed), welche größere SPIO-Partikel als die intravenös verabreichten Formulierungen enthalten. Eine weitere potentielle medizinische Anwendung ist der Einsatz von SPIO-Partikeln in der hyperthermischen Therapie [10]. Ebenfalls

erfolgsversprechend ist die Anwendung von spezifischen SPIO-Partikeln im Bereich der molekularen Bildgebung. Kürzlich konnte beispielsweise eine aktive *in vivo* Anreicherung von Eisenoxid-Mangan-Herceptin SPIO-Partikeln im Tumorgewebe gezeigt werden [11].

Ziel dieser Arbeit ist die Herstellung und Charakterisierung neuer nanopartikulärer SPIO-Partikel als Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie (MRT). Die magnetischen Eigenschaften und die Pharmakokinetik der SPIO-Partikel sind stark von Partikelgröße, Breite der Verteilung, Partikelbeschichtung, Ladung und Partikelmatrix abhängig [12-16]. Ziel ist es, Partikelchargen herzustellen, die sich ausschließlich in ihrer Partikelgröße unterscheiden und eine enge Partikelgrößenverteilung aufweisen. Der Einfluss der Partikelgröße auf die magnetischen Eigenschaften, Pharmakokinetik und MRT-Bildqualität wurde zwar bereits in der Literatur diskutiert, jedoch werden häufig neben der Partikelgröße auch weitere Parameter wie Beschichtung und Ladung variiert [13, 15, 17-21]. Erst die Herstellung von Chargen, die sich lediglich in ihrer Partikelgröße unterscheiden, ermöglicht eine systematische Untersuchung der magnetischen Eigenschaften und des *in vitro* und *in vivo* Verhaltens der SPIO-Partikel.

Ein Schwerpunkt der Arbeit liegt im Bereich der physikochemischen Charakterisierung der hergestellten SPIO-Formulierungen. Im Zusammenhang mit der Bestimmung der Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung wird die Eignung der asymmetrischen Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung zur Charakterisierung von SPIO-Partikeln überprüft. Die Ergebnisse werden mit anderen Methoden wie Transmissions-elektronenmikroskopie, Kleinwinkel-Röntgenstreuung und analytische Ultrazentrifugation verglichen. Des Weiteren wird mit Hilfe der supraleitenden Quanteninterferenzeinheit überprüft, ob die hergestellten SPIO-Formulierungen superparamagnetisch sind und wie sich die Sättigungsmagnetisierungen in Abhängigkeit von der Partikelgröße ändern. Auch die Suszeptibilitäten der hergestellten Formulierungen werden mit Hilfe einer magnetischen Suszeptibilitätswaage in Abhängigkeit von der Partikelgröße untersucht. Die substanzspezifischen  $R_1$ - und  $R_2$ -Relaxivitäten werden spektroskopisch bei 1,41 Tesla und mit Hilfe der MRT-Bildgebung bei 1,5 Tesla untersucht. Nach einer detaillierten Charakterisierung wird die phagozytotische Aktivität und das *in vivo* Verhalten der hergestellten SPIO-Formulierungen in Abhängigkeit von der Partikelgröße untersucht.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Magnetresonanztomographie

#### 2.1.1 Physikalische Grundlagen der Magnetresonanztomographie

Die Magnetresonanztomographie (MRT) ist ein nicht invasives, diagnostisches Verfahren, das zur Darstellung von Struktur und Funktion der Gewebe und Organe im Körper eingesetzt wird. Bei der MRT wird das Phänomen der kernmagnetischen Resonanz (engl. nuclear magnetic resonance, Abk. NMR) ausgenutzt. Es müssen drei notwendige Bedingungen erfüllt sein, um den NMR-Effekt messen zu können: Atomkerne mit Kernspin, ein externes statisches Magnetfeld (zur Ausrichtung der Kernspins) und ein Hochfrequenzimpuls (zur Übertragung von Energie auf die Kernspins) [22].

Elemente mit ungerader Anzahl Nukleonen (Protonen und Neutronen) haben generell einen so genannten Kernspin. Der Kernspin (auch Richtungsquantenzahl genannt) ist eine quantenmechanische Eigenschaft und kann vereinfacht als Gesamtdrehimpuls eines Atomkerns beschrieben werden. Typische Kerne mit dieser Eigenschaft sind Wasserstoff ( $^1\text{H}$ ,  $^2\text{H}$ ), Kohlenstoff ( $^{13}\text{C}$ ), Stickstoff ( $^{14}\text{N}$ ), Fluor ( $^{19}\text{F}$ ) und Phosphor ( $^{31}\text{P}$ ) (Tab. 1, [23]).

Tab. 1: Eigenschaften für eine Auswahl von Atomkernen mit einem Kernspin [23].

Kern	ungepaarte Protonen	ungepaarte Neutronen	Spin	gyromagnetische Konstante, $\gamma$ (MHz/T)
$^1\text{H}$	1	0	$\frac{1}{2}$	42,58
$^2\text{H}$	1	1	1	6,54
$^{13}\text{C}$	0	1	$\frac{1}{2}$	10,71
$^{14}\text{N}$	1	1	1	3,08
$^{19}\text{F}$	1	0	$\frac{1}{2}$	40,08
$^{31}\text{P}$	0	1	$\frac{1}{2}$	17,25

In der klinisch angewandten Magnetresonanztomographie wird bisher nur der Kernspin der *Protonen* in Wasser ausgenutzt. Dafür sind zwei Gründe ausschlaggebend: Protonen kommen mit Abstand am häufigsten in biologischen Geweben vor und Protonen haben von allen stabilen Isotopen das größte gyromagnetische Verhältnis (42,58 MHz/T). Das gyromagnetische Verhältnis ist ein Proportionalitätsfaktor zwischen dem magnetischen Moment und dem Spin eines Kerns und ist für jede Teilchenart charakteristisch.

In Abwesenheit eines *externen Magnetfeldes* sind die Protonenspins zufällig im Raum ausgerichtet (isotrop), so dass die Nettomagnetisierung gleich null ist. Wird jedoch ein

externes statisches Magnetfeld angelegt, richten sich die Protonenspins, ähnlich einer Kompassnadel im Magnetfeld der Erde, entlang der Magnetfeldlinien aus (Abb. 1) [24].

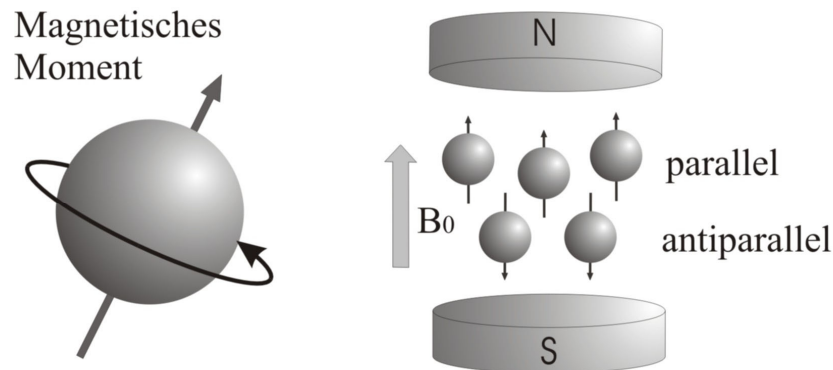


Abb. 1: Der Kernspin ist eine quantenmechanische Eigenschaft und kann vom Standpunkt der klassischen Physik vereinfacht als Eigendrehimpuls der Protonenspins bzw. magnetischer Kreisel verbildlicht werden (links). Die Protonenspins rotieren um eine Achse und induzieren durch die bewegte elektrische Ladung ein magnetisches Moment. In einem externen Magnetfeld der Stärke  $B_0$  (rechts) richten sich die Protonenspins aufgrund ihres magnetischen Moments parallel oder antiparallel zum angelegten Feld aus.

Die parallele Ausrichtung  $\mu_{+z}$  wird dabei bevorzugt, da sie energetisch günstiger als die antiparallele  $\mu_{-z}$  Ausrichtung ist [25]. Die Protonen stehen dabei nicht still, sondern präzedieren um die Achse der Magnetfeldstärke und induzieren eine oszillierende Magnetisierung in Richtung von  $B_0$ . Die Frequenz der präzedierenden Protonen,  $\omega_0$ , kann mit Hilfe der Larmor Gleichung beschrieben werden.

$$\omega_0 = \gamma \cdot B_0 \quad (\text{Gl. 1})$$

Dabei ist  $\gamma$  die gyromagnetische Konstante und  $B_0$  die angelegte Magnetfeldstärke. Befindet sich das System im Gleichgewicht, so ergibt sich eine Nettomagnetisierung in Richtung des angelegten Magnetfeldes, welche auch als *Longitudinalmagnetisierung* ( $M_z$ ) bezeichnet wird. Im Vergleich zur angelegten Magnetfeldstärke  $B_0$  ist der Vektor  $M_z$  sehr klein und kann nicht direkt vermessen werden (Abb. 2).

Bereits 1946 entdeckten Bloch und Purcell, dass das Spin-System Energie in Form von Radiowellen absorbieren kann [26, 27]. Wird eine *Radiowelle (HF-Impuls)* der Frequenz  $\omega_0$  (Larmor-Frequenz, Gl. 1) eingestrahlt, so hat dies zwei Effekte. Erstens nehmen einige der parallel ausgerichteten Protonen ( $\mu_{+z}$ ) Energie auf und richten sich antiparallel ( $\mu_{-z}$ ) zum Magnetfeld aus, wodurch die *Longitudinalmagnetisierung* ( $M_z$ ) in Richtung des angelegten Magnetfeldes verringert wird (Abb. 2). Zweitens wird durch den eingestrahlt HF-Impuls

eine Synchronisation der Protonenspins erreicht. Es entsteht ein neuer Magnetvektor, der senkrecht zum angelegten Magnetfeld ausgerichtet ist, die so genannte *Transversalmagnetisierung* ( $M_{xy}$ ). Durch die rotierende *Transversalmagnetisierung* ( $M_{xy}$ ) wird ein Strom induziert, der mit Hilfe einer Aufnahmespule des Scanners vermessen werden kann (Abb. 2).

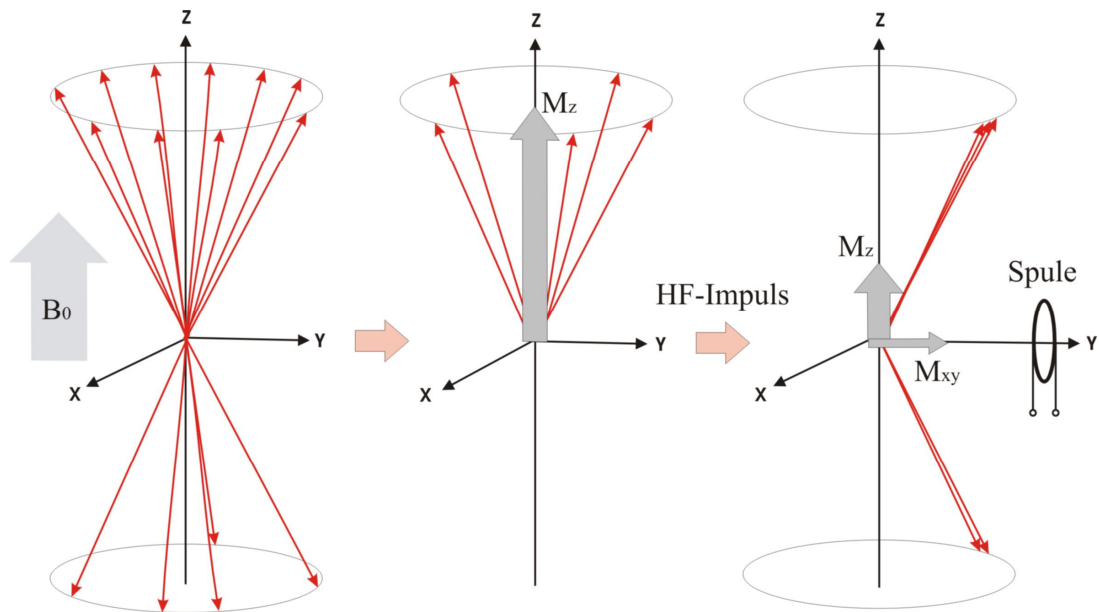


Abb. 2: Parallele und antiparallele Ausrichtung der Protonenspins nach Einbringen in ein Magnetfeld (links). Nach Vektoraddition ergibt sich eine Nettomagnetisierung in Richtung des angelegten Magnetfeldes (Longitudinalmagnetisierung,  $M_z$ ) (Mitte). Wird ein Hochfrequenzimpuls der Frequenz  $\omega_0$  (Lamorfrequenz) eingestrahlt (rechts), entsteht ein transversaler Magnetvektor (Transversalmagnetisierung  $M_{xy}$ ).

Nach dem Abstellen des HF-Impulses relaxieren die angeregten Protonenspins aufgrund der Wechselwirkung mit benachbarten Kernspins zurück in ihre ursprüngliche Ausgangsstellung (Gleichgewichtszustand). Dabei wird zwischen der *longitudinalen* ( $T_1$ -Kurve, Abb. 3 A) und der *transversalen Relaxation* ( $T_2/T_2^*$ -Kurve, Abb. 3 B, S. 7) unterschieden. Während der longitudinalen Relaxation geben die Kernspins Energie an die Umgebung ab, weshalb sie auch als „Spin-Gitter-Relaxation“ bezeichnet wird. Bei der transversalen Relaxation interagieren hingegen die Spins untereinander, weshalb sie auch als „Spin-Spin-Relaxation“ bezeichnet wird. Die angeregten Protonenspins besitzen nicht mehr dieselbe Frequenz und zeigen eine schnelle Dephasierung, was wiederum die Abnahme der Transversalmagnetisierung verursacht.

Für die ortsabhängige Auflösung der gemessenen elektrischen Ströme ist es notwendig, einen Magnetfeldgradienten entlang der x-, y- und z-Richtung zu verwenden (Gradientenspule). Die Gradientenspule bewirkt ein lineares Gefälle der Magnetfeldstärke



und macht es möglich, dass die aufgenommenen Signale dem Ort der Entstehung zugeordnet werden können. Die *Transversalmagnetisierung* ( $M_{xy}$ ) ist abhängig vom Gewebetyp und Ort der vermessenen Protonen und bildet damit die Grundlage der MRT-Bildgebung.

In der Magnetresonanztomographie werden viele verschiedene Abfolgen von Hochfrequenzimpulsen (Sequenz) verwendet. Je nach Reihenfolge der HF-Impulse können mit Hilfe der Magnetresonanztomographie entweder  $T_1$ -,  $T_2$ - oder Protonendichte-gewichtete Bilder erstellt werden.

### **2.1.2 Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie**

In der nativen MRT-Bildgebung wird ausgenutzt, dass jedes Gewebe im Körper charakteristische Gewebeparameter aufweist. Verglichen mit Flüssigkeiten wie beispielsweise Liquor cerebrospinalis, die eine lange  $T_1$ - und  $T_2$ -Zeit haben, hat Fett eine kurze  $T_1$ - und  $T_2$ -Zeit [28]. Die natürlichen  $T_1$ - und  $T_2$ -Relaxationszeiten im Gewebe können stark durch die Gabe von Kontrastmittel (KM) beeinflusst werden. In  $T_1$ -gewichteten Bildern führt der Einsatz von Kontrastmitteln durch die  $T_1$ -Relaxationszeitverkürzung zu einer Signalintensitätserhöhung und in  $T_2$ -gewichteten Bildern zu einer Intensitätserniedrigung (Abb. 3).

Kontrastmittel werden nach ihrer Verteilung im Körper (extrazelluläre und gewebespezifische KM) und nach ihren magnetischen Eigenschaften (paramagnetische und superparamagnetische KM) eingeteilt. Einen Überblick über zugelassene MRT-Kontrastmittel gibt Tab. A 1 (Kap. 8.1, S. 121).

Paramagnetische Substanzen werden vor allem wegen ihres ausgeprägten  $T_1$ -Effektes verwendet. Sie erhöhen die Signalintensität, weshalb sie auch als positive Kontrastmittel bezeichnet werden. Als paramagnetische Kontrastmittel [29] werden überwiegend Metallionen der Übergangsmetalle (Kupfer, Eisen, Mangan) und so genannte „seltene Erden“ (Lanthanoide) verwendet. Der bedeutendste Vertreter der paramagnetischen Ionen ist das Gadolinium ( $Gd^{3+}$ ). Gadolinium besitzt sieben ungepaarte Elektronen, somit ein großes magnetisches Moment und ist hervorragend als MRT-Kontrastmittel geeignet. Da freie Gadolinium-Ionen toxisch sind, werden als Kontrastmittel stabile, chelatisierte  $Gd^{3+}$ -Komplexe verwendet [30, 31].

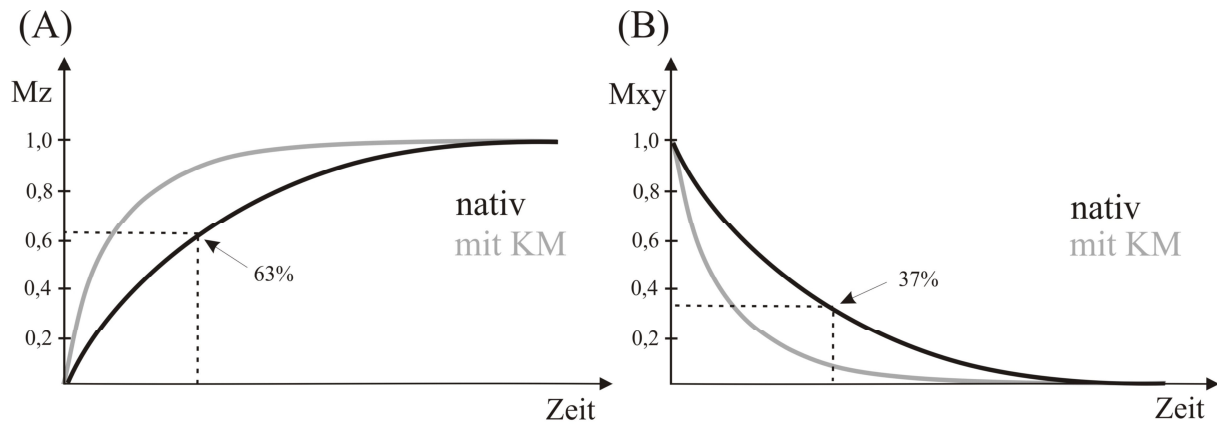


Abb. 3: Darstellung der longitudinalen ( $M_z$ ) und transversalen Magnetisierung ( $M_{xy}$ ) nach Abstellen des HF-Impulses als Funktion der Zeit. Die Magnetisierung in z und xy-Richtung vor Kontrastmittelgabe ist schwarz dargestellt. Nach Kontrastmittelgabe verkürzen sich sowohl die  $T_1$ - als auch die  $T_2$ -Zeit (graue Kurven). (A) Die  $T_1$ -Relaxationszeit (longitudinale Relaxation) wird definiert als Zeit, nach der 63 % der Ausgangsmagnetisierung wieder erreicht ist. (B) Die  $T_2$ -Relaxationszeit (transversale Relaxation) wird definiert als Zeit, nach der 37 % der Ausgangsmagnetisierung wieder erreicht ist.

Superparamagnetische Kontrastmittel haben eine hohe magnetische Suszeptibilität und dadurch ein eigenes lokal störendes Magnetfeld [8]. Sie besitzen, verglichen mit paramagnetischen Kontrastmitteln, ein wesentlich stärkeres magnetisches Moment. Die starken magnetischen Momente der superparamagnetischen Partikel verursachen während der Relaxation Feldinhomogenitäten, die die  $T_2$ - und  $T_2^*$ -Relaxationszeiten der Protonen stark beschleunigen. Sie erniedrigen in  $T_2$ -gewichteten Bildern die Signalintensität und werden daher auch als negative Kontrastmittel bezeichnet [32, 33]. SPIO-Partikel werden ausführlich in Kapitel 2.3 (S. 13) beschrieben.

Zur Bewertung von Kontrastmitteln im Hinblick auf ihre Effektivitäten in der MRT werden zwei weitere wichtige Parameter eingeführt: die Relaxationsraten ( $\tau_1$ ,  $\tau_2$ ) und die Relaxivitäten ( $R_1$  und  $R_2$ ). Die Relaxationsraten (Einheit:  $s^{-1}$ ) sind ein direktes Maß für den Kontrast in der MRT und sind definiert als reziproke Relaxationszeiten:

$$\tau_{1,2} = \frac{1}{T_{1,2}} \quad (\text{Gl. 2}).$$

Die Relaxationszeiten sind abhängig von der Konzentration des Kontrastmittels. Als konzentrationsunabhängiges Maß wird die Relaxivität (Einheit:  $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) eingeführt.

Die Relaxivität ( $R_{1,2}$ ) ist definiert als lineare Steigung der Relaxationsrate ( $\tau_1, \tau_2$ ) über der Konzentration des Kontrastmittels:

$$R_{1,2} = \frac{(\tau_{1,2} - \tau_{1,2}^0)}{c} \quad (\text{Gl. 3})$$

Dabei gibt  $c$  die Kontrastmittelkonzentration [mM] an und  $\tau_{1,2}^0$  die Relaxationsrate der Flüssigkeit ohne Zugabe von Kontrastmittel (z.B. Wasser:  $\tau_1^0 = 1/T_1^0 = 1/3700$  ms). Die Relaxivität ( $R_{1,2}$ ) kann nur für einen bestimmten Konzentrationsbereich direkt aus der Steigung der Relaxationsraten errechnet werden, denn bei sehr niedrigen Kontrastmittelkonzentrationen verhält sich die Relaxationsrate nicht linear zur Kontrastmittelkonzentration, da der Beitrag von  $\tau_{1,2}^0$  (Relaxationsrate der reinen Flüssigkeit) im Verhältnis gesehen größer wird. In der vorliegenden Arbeit wurde für einen Konzentrationsbereich von  $\sim 10$  bis  $300 \mu\text{mol}$  Eisen pro Liter ein linearer Zusammenhang bestimmt (vgl. Kap. 4.3.4).

## 2.2 Grundlagen des Magnetismus

### 2.2.1 Magnetismus in Festkörpern

Magnetismus ist ein kooperatives Phänomen und hängt von der Atomstruktur (Atome, Ionen, Elektronen) einer Substanz und von der Temperatur ab. Traditionell wird die Antwort eines Materials (Magnetisierung,  $M$ ) auf ein angelegtes Magnetfeld ( $H$ ) definiert als magnetische Volumenssuszeptibilität ( $\chi_v$ ):

$$M = \chi_v \cdot H \quad (\text{Gl. 4})$$

Neben der magnetischen Volumenssuszeptibilität sind zwei weitere Maße für die magnetische Suszeptibilität gebräuchlich: die magnetische Massenssuszeptibilität ( $\chi_{mass}$ ) und die molare magnetische Suszeptibilität ( $\chi_{mol}$ ):

$$\chi_{mass} = \chi_v / \rho \quad (\text{Gl. 5})$$

$$\chi_{mol} = M \cdot \chi_{mass} \quad (\text{Gl. 6})$$

Dabei ist  $\rho$  die Dichte und  $M$  die Molmasse. In Festkörpern können fünf verschiedene Arten von Magnetismus auftreten: Dia-, Para-, Ferro-, Ferri- und Antiferromagnetismus, die sich in Bezug auf ihre magnetischen Suszeptibilitäten unterscheiden.

*Diamagnetische* Stoffe ( $-1 \leq \chi_v < 0$ ) sind Materialien mit ausschließlich gepaarten Elektronen wie z.B. Stickstoff, Blei und Gold. Wird ein diamagnetisches Material in ein äußeres Magnetfeld eingebracht, werden die Magnetfeldlinien nach außen abgelenkt (Abb. 4).

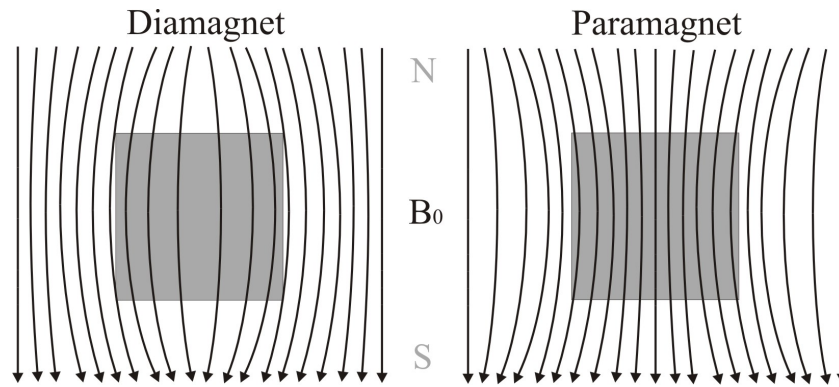


Abb. 4: Darstellung eines diamagnetischen und eines paramagnetischen Stoffes im Magnetfeld der Stärke  $B_0$ .

*Paramagnetische* Stoffe, wie z.B. Gadoliniumionen (vgl. Tab. A 1, S. 121), besitzen eine magnetische Volumenssuszeptibilität von größer als null ( $\chi_v > 0$ ). Wird eine paramagnetische Probe in ein Magnetfeld eingebracht, so richten sich die atomaren magnetischen Momente (Elektronenspins) bevorzugt in Richtung der magnetischen Feldlinien aus. Die Feldlinien im Inneren des Stoffes werden dadurch verdichtet und das lokale Magnetfeld wird verstärkt (Abb. 4). Ein charakteristisches Merkmal dabei ist, dass sich die einzelnen Elektronenspins unabhängig voneinander ausrichten. Nach Entfernen des magnetischen Feldes bleibt keine Restmagnetisierung zurück.

*Ferromagnetische* Materialien haben eine sehr große magnetische Volumenssuszeptibilität ( $\chi_v \gg 0$ ). Ferro-, Ferri- und Antiferromagnetismus sind kollektive magnetische Eigenschaften. Innerhalb kleiner Kristallbereiche, die als Domänen oder Weiss'sche Bezirke bezeichnet werden, tritt dabei eine Kopplung der Spins von einander benachbarten Atomen auf. Sind die Spinmomente innerhalb einer Domäne parallel ausgerichtet, wird dies als Ferromagnetismus bezeichnet (Abb. 5, links). Eine antiparallele Ausrichtung der Elektronenspins innerhalb eines Weiss'schen Bezirkes ist charakteristisch für *Ferri- und Antiferromagnetismus*. In *ferrimagnetischen* Materialien liegen zwei Arten von magnetischen Momenten vor (Beispiel: Magnetit,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), wobei gleichartige Elektronenspins innerhalb einer Domäne parallel und unterschiedliche antiparallel ausgerichtet sind (Abb. 5, Mitte). Die antiparallel ausgerichteten magnetischen Momente löschen sich gegenseitig nicht vollständig aus, so dass ein Gesamtmoment resultiert und sich diese Materialien ähnlich den Ferromagneten verhalten. In einem idealen *Antiferromagnet* heben sich die antiparallel

ausgerichteten Momente vollständig auf, so dass sie nach außen kein magnetisches Verhalten zeigen (Abb. 5, rechts). Für alle kollektiv magnetischen Eigenschaften gilt, dass die charakteristischen Ordnungen der Spins in den Domänen nur unterhalb einer bestimmten Temperatur vorhanden sind. Oberhalb der Temperatur verhalten sich Ferro-, Ferri- und Antiferromagnete paramagnetisch, da die hohe thermische Energie die Spin-Ordnung in den Domänen zerstört. Bei Ferromagneten wird diese Grenztemperatur als Curie-Temperatur bezeichnet. Gadolinium ist bei einer Temperatur von unter  $20\text{ °C}$  ( $T_C = 20\text{ °C}$ ) ferromagnetisch, während es bei Raumtemperatur paramagnetisches Verhalten zeigt [34]. Typische ferromagnetische Stoffe bei Raumtemperatur sind Kobalt ( $T_C = 1121\text{ °C}$ ), Eisen ( $T_C = 768\text{ °C}$ ), Nickel ( $T_C = 360\text{ °C}$ ) und deren Legierungen [35]. Bei Ferrimagneten wird die Grenztemperatur als Néel-Temperatur bezeichnet [36]. Für Magnetit und Maghemit ist die Néel-Temperatur bei Raumtemperatur weit unterschritten (Magnetit:  $T_N = 577\text{ °C}$  [37], Maghemit:  $T_N = 675\text{ °C}$  [38]). Demzufolge verhalten sich Magnetit und Maghemit bei Raumtemperatur ferrimagnetisch.

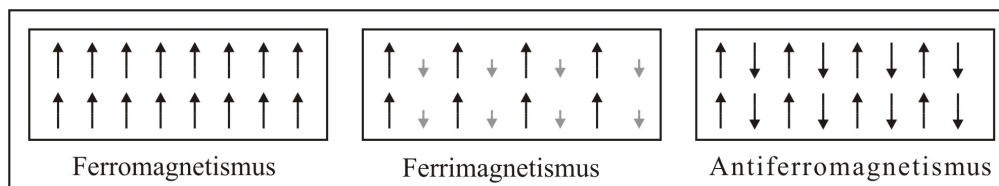


Abb. 5: Ordnung der Elektronenspins innerhalb einer Domäne für ferro-, ferri- und antiferromagnetische Materialien.

Die magnetischen Eigenschaften eines Materials werden durch ein äußeres Magnetfeld induziert. Bereits bei kleinen Feldstärken erreichen Ferromagnete aufgrund ihrer hohen Suszeptibilität eine hohe Magnetisierung ( $M$ ). Die Magnetisierung eines Ferromagneten ist nicht linear von der Feldstärke  $H$  abhängig, sondern folgt einer so genannten Hystereseschleife. Eine solche Hystereseschleife ist in Abb. 6 dargestellt und wird auch als M-H-Kurve oder Hysteresekurve bezeichnet.

Die Gleichrichtung der Domänen bleibt zum Teil auch nach Entfernen des äußeren Magnetfeldes erhalten. Die auftretende Restmagnetisierung ist charakteristisch für ferromagnetische Stoffe und wird als Remanenz ( $M_R$ ) bezeichnet. Sind alle Weiss'schen Bezirke parallel ausgerichtet, erreicht die Magnetisierung ihr Maximum (Sättigungsmagnetisierung,  $M_S$ ). Die Koerzitivfeldstärke ( $H_C$ ) ist die Feldstärke, die

aufgebracht werden muss, um das Material wieder vollständig zu entmagnetisieren. Permanentmagnete weisen beispielsweise eine hohe Koerzitivfeldstärke auf.

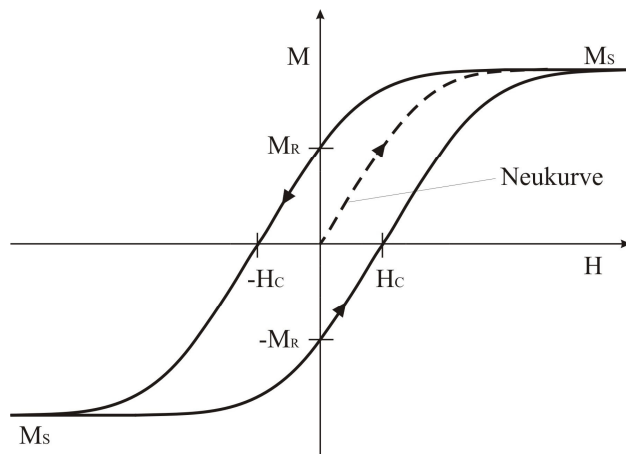


Abb. 6: Magnetisierungskurve eines ferro- oder ferrimagnetischen Materials.

### 2.2.2 Superparamagnetismus

Superparamagnetismus ist ein Grenzfall des Ferro- und Ferrimagnetismus und tritt auf, wenn ferro- oder ferrimagnetische Materialien als Nanopartikeldispersion vorliegen. Das Besondere einer Nanopartikeldispersion ist, dass die Kristallitgrößen der Nanopartikel kleiner als eine Weiss'sche-Domäne sein kann (Abb. 7). Ist die Kristallitgröße kleiner als eine magnetische Domänen (z.B. Magnetit oder Maghemit ca. 30 nm) verhalten sich die Nanopartikel superparamagnetisch [39, 40]. Weshalb jeder Partikel eine einzelne magnetische Domäne darstellt.

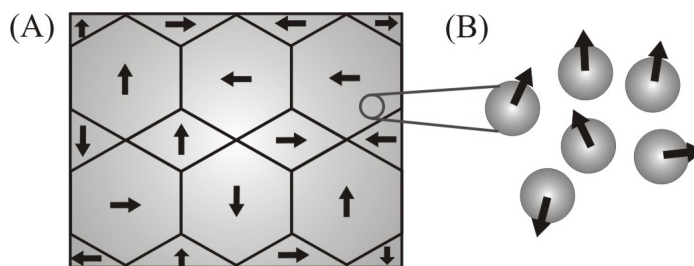


Abb. 7: (A) Darstellung der Weiss'schen Bezirke von ferri- oder ferromagnetischen Materialien. (B) Sind ferro- oder ferrimagnetische Nanopartikel kleiner als eine Weiss'sche-Domäne tritt das Phänomen des Superparamagnetismus auf. Abbildung verändert nach Pankhurst *et. al.* [39].

Wird ein externes Magnetfeld angelegt, richten sich die Nanopartikel parallel oder antiparallel zum angelegten Magnetfeld aus. In Lösungen ist normalerweise nur die energetisch günstigste Achse (parallele Ausrichtung) wichtig [41]. Bei sehr niedrigen Temperaturen haben die Partikel nicht genügend Energie, um die Umwandlung zwischen

parallel und antiparallel zu vollziehen. Bei ausreichend hoher Temperatur relaxieren die Nanopartikel nach Abstellen des Magnetfeldes durch die thermische Energie wieder. Dabei wird die Wechselrate zwischen parallel und antiparallel innerhalb eines Partikels als Néel Relaxationsrate (intrinsische Rotation) bezeichnet ( $\tau_N$ ) [42]:

$$\tau_N = \tau_0 \cdot \exp(KV/kT) \quad (\text{Gl. 7})$$

Dabei ist  $K$  die Anisotropiekonstante,  $V$  das Kristallvolumen (Kernvolumen) und  $\tau_0$  eine Konstante. Die Konstante  $\tau_0$  liegt im Bereich von  $10^{-9}$  s [36] bis  $10^{-10}$  s [43]. Für große Partikel ist die Néel-Relaxationszeit sehr lang, während für kleine Partikel ( $d < 6$  nm) der Wechsel zwischen parallel und antiparallel sehr schnell erfolgt und im Nanosekundenbereich liegt [25]. In wässrigen Lösungen wird die Bewegung der Nanopartikel neben der Néel Relaxationsrate auch durch die Brownsche Relaxationsrate ( $\tau_R$ ) beeinflusst [44]:

$$\tau_R = \frac{3\eta_0 V}{k_B T} \quad (\text{Gl. 8})$$

Die Brownsche Relaxation beschreibt die rotatorische Diffusion der Partikel in einer Flüssigkeit. Dabei ist  $\eta_0$  die Viskosität des reinen Lösemittels,  $V$  das Partikelvolumen,  $k_B$  die Boltzmannkonstante und  $T$  die absolute Temperatur [K].

Die resultierende Magnetisierung ( $M$ ) superparamagnetischer Nanopartikel in einem äußeren Magnetfeld kann mittels Langevin-Funktion,  $L(\alpha)$ , beschrieben werden [45].

$$M = F_S N \mu_s L\left(\frac{\mu_s H}{kT}\right) \quad (\text{Gl. 9})$$

$$L(\alpha) = \coth(\alpha) - 1/\alpha \quad (\text{Gl. 10})$$

Dabei ist  $M$  die Magnetisierung der SPIO-Partikel,  $F_S$  ist der Quotient aus der Anzahl superparamagnetischer Maghemit- oder Magnetitkerne und der Anzahl der Eisenatome ( $N$ ),  $\mu_s$  ist das magnetische Moment des Maghemit- oder Magnetitkerns,  $L(\alpha)$  ist die Langevin-Funktion und  $H$  beschreibt die angelegten Magnetfeldstärke [41].

Im Gegensatz zu Ferromagnetismus und Ferrimagnetismus (Abb. 6) zeigen superparamagnetische Materialien in der M-H-Kurve keine Remanenz und Koerzitivfeldstärke. Die M-H-Kurven superparamagnetischer Nanopartikel verlaufen direkt durch den Nullpunkt (Abb. 8) [39].

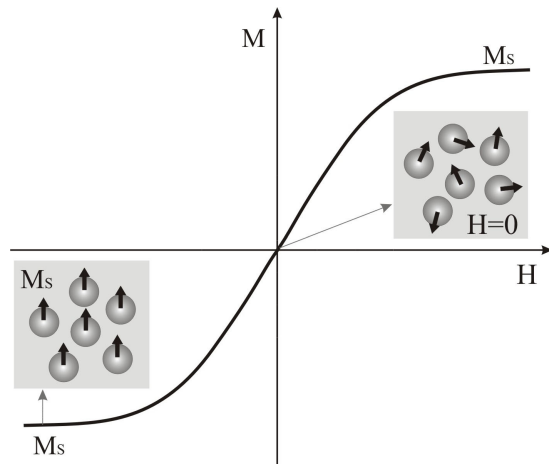


Abb. 8: Magnetisierungskurve für superparamagnetische Materialien.

## 2.3 Superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel

### 2.3.1 Anwendungen superparamagnetischer Eisenoxid-Nanopartikel

Superparamagnetische Eisenoxidpartikel (SPIOs) finden in der Biotechnologie, Biomedizin und Diagnostik sehr breite Anwendungen [46]. Magnetische Nanopartikel werden beispielsweise erfolgreich zur *Zellseparation* eingesetzt. Dabei werden Eisenoxidpartikel mit Hilfe von Liganden spezifisch an die Zelloberflächen gebunden, so dass diese dann magnetisch separiert werden können. Dadurch können z.B. toxische Substanzen oder Proteine, DNA und RNA in biologischen Flüssigkeiten von den Zellen getrennt werden [39, 47, 48]. Mit der gleichen Strategie können auch teure Substanzen, wie z.B. chirale Katalysatoren zurückgewonnen werden [49]. Dabei wird der Katalysator nach der Synthese über ein Magnetfeld abgetrennt und kann erneut eingesetzt werden.

Ebenfalls etabliert ist die Anwendung der SPIO-Partikel als *Kontrastmittel in der Magnetresonanztomographie*. SPIO-Kontrastmittel verkürzen die  $T_1$ - und  $T_2$ -Relaxationszeit und verbessern z.B. in der Leberdiagnostik die diagnostische Wertigkeit erheblich. Nach intravenöser Applikation werden die SPIO-Partikel schnell von den Zellen des mononukleären Phagozytensystems (MPS, vgl. Kap. 2.3.4), insbesondere von den Kupffer'schen Sternzellen in der Leber, aufgenommen und bewirken dort eine effiziente  $T_2$ -Relaxationszeitverkürzung. Pathologische Gewebereiche in der Leber wie Metastasen oder Tumorgewebe besitzen keine Kupffer'schen Zellen, demzufolge werden keine SPIO-Partikel aufgenommen. Dadurch erscheinen maligne Veränderungen in der Leber im Vergleich zum Hintergrund heller. Ein zugelassenes SPIO-Kontrastmittel zur Darstellung herdförmiger Leberschäden ist das Marktprodukt SHU 555 A (Resovist<sup>®</sup>). Es ist indiziert zur Detektion



unklarer Leberläsionen, wenn eine Untersuchung ohne Kontrastmittel keine eindeutige Diagnose ermöglicht hat [50]. In Abb. 9 ist ein Fallbeispiel dargestellt, es handelt sich um eine unklare Leberläsion, welche vor Kontrastmittelgabe (links) nicht klar gegen das umgebende Leberparenchym abgrenzbar ist [51]. Nach Gabe von SHU 555 A ist der Tumor deutlich erkennbar und gleichzeitig wird eine kleinere Metastase sichtbar (roter Pfeil, Abb. 9). Weitere zugelassene oder in der klinischen Entwicklung befindliche SPIO-Kontrastmittel sind in Tab. 3 (S. 21) zusammengefasst.

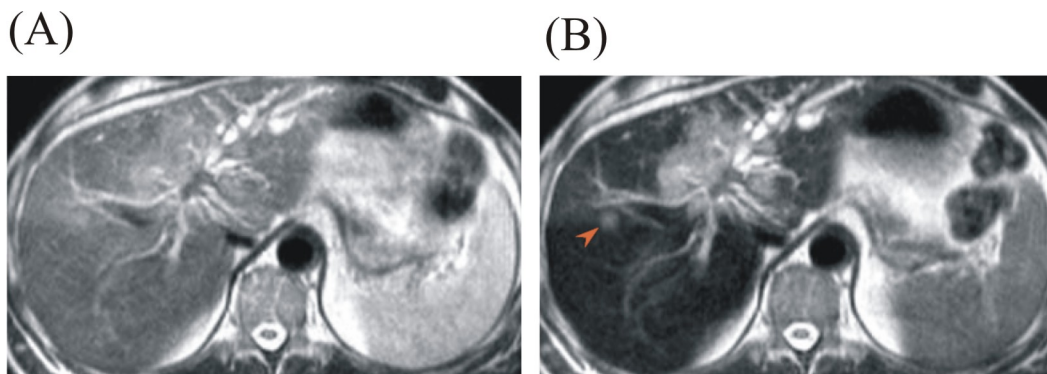


Abb. 9: Patient mit einem Gallengangskarzinom in der hepatischen Blutgefäßverzweigung. **(A)** T<sub>2</sub>-gewichtete MRT-Untersuchung vor Kontrastmittelgabe. Die Leberläsion ist fast isointens mit umgebendem Leberparenchym und nicht klar abgrenzbar. **(B)** 10 min nach intravenöser Injektion von 1,4 ml SHU 555 A ist die Abgrenzung des Tumors deutlich verbessert und zusätzlich wird ein kleinerer Tumorknoten besser sichtbar (roter Pfeil). Abbildung entnommen aus Blakeborough *et al.* [51].

Eine nahe liegende Anwendung der SPIO-Partikel ist die *Darstellung von Makrophagen*. Wie bereits erwähnt, werden die SPIO-Partikel vor allem von Zellen des mononukleären Phagozytensystems aufgenommen (MPS, vgl. Kap. 2.3.4). In entzündlich veränderten Geweben ist die Makrophagendichte besonders hoch und folglich die Anwendung von SPIO-Partikeln für die Darstellung entzündlicher Prozesse denkbar. Mehrere Arbeiten konnten eine erfolgreiche Anreicherung der SPIO-Partikel in arteriosklerotischen Plaques zeigen [52-55]. Auch der Einsatz für die Darstellung von Schlaganfällen, Myokardinfarkten, Minderperfusion, kardiovaskulären Ereignissen und Multipler Sklerose, wird in der Literatur diskutiert [8, 56, 57].

Neben den unspezifischen SPIO-Partikeln gibt es viele Ansätze zum *aktiven Targeting* der Partikel. Im Bereich der spezifischen Bildgebung sind Kopplungen der SPIO-Partikel mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern, Peptiden oder Proteinen wie z.B. HER2 [8], Transferrin, Lactoferrin, Ceruloplasmin, Elastin, Albumin, TAT-Peptide, RGD-Peptid und Folsäure bereits in der Literatur beschrieben [46]. Eine erfolgreiche, aktive Anreicherung

spezifischer Partikel konnte z.B. *in vivo* für Herceptin gekoppelte Eisenoxid-Mangan-Nanopartikel (MnMEIO-Herceptin) gezeigt werden [11]. Auch Transferrin-positive Tumore konnten *in vivo* mittels spezifischer SPIO-Antikörper-Konjugate nachgewiesen werden [58].

Eine weitere interessante Anwendung superparamagnetischer Nanopartikel ist der Einsatz in der hyperthermischen Therapie [10, 59]. Dabei werden magnetische Partikel lokal im pathologischen Gewebe angereichert (z.B. Tumor) und einem externen alternierenden Magnetfeld ausgesetzt. Durch das Wechselfeld wird Wärme induziert, welche die Tumorzellen gezielt zerstören kann. Es konnte bereits in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass die *Hyperthermie* kombiniert mit der konventionellen Radiotherapie das Tumorwachstum stärker hemmte als die Radiotherapie allein [60, 61].

SPIO-Partikel können auch zur *Markierung mesenchymaler Stammzellen* verwendet werden [62, 63]. Bei vielen genetischen und malignen Erkrankungen oder auch traumatischen Läsionen ist die Stammzelltherapie ein neuer Hoffnungsträger. Stammzellen zeichnen sich durch ihre Fähigkeit zur pluripotenten Differenzierung aus. Nach Injektion von Stammzellen besteht somit die Hoffnung, dass sich die Zellen z.B. zu Knochen, Sehnen, Knorpel oder Nervengewebe differenzieren. Werden die mesenchymalen Stammzellen (MSCs) vor Transplantation durch SPIO-Partikel markiert, kann der Verbleib der Zellen im Körper mittels MRT verfolgt werden („cell tracking“). So wurden zum Beispiel *in vivo* mit SPIO-Partikeln markierte mesenchymale Stammzellen nach intramyocardialer Injektion in den Infarktbereich [64, 65] und markierte B-Zellen der Langerhans Inseln des Pankreas nach hepatischer Transplantation mittels MRT dargestellt [66].

Eine viel versprechende Anwendungsmöglichkeit für magnetische Eisenoxidpartikel ist darüber hinaus der Einsatz als *gezielter Arzneistoffträger* („drug delivery“). Idee dabei ist, die mit Wirkstoff gekoppelten magnetischen Nanopartikel nach Injektion mit Hilfe von externen Magnetfeldern im erkrankten Gewebe anzureichern und zu fixieren. Wenn der wirkstoffbeladene Träger im Zielgewebe konzentriert ist, kann der Wirkstoff freigesetzt werden. So kann lokal eine therapeutisch wirksame Arzneistoffkonzentration erreicht werden, während toxische Nebenwirkungen im gesunden Gewebe vermieden werden können [3].

### **2.3.2 Aufbau und Struktur der SPIO-Partikel**

Die SPIO-Partikel in der vorliegenden Arbeit sind aus einem magnetischen Eisenoxidkern und einer Hülle aufgebaut (Abb. 10). Nanopartikel in Dispersionen besitzen eine große Oberfläche und neigen sehr stark zu Agglomeration. Zur Stabilisierung der

Nanopartikel in Lösung ist eine Beschichtung erforderlich. Die Beschichtung bzw. das Hüllmaterial ist ein Dextranderivat (Carboxydextran,  $M_w \sim 3500$  g/mol,  $M_n \sim 2000$  g/mol) und verhindert durch sterische Stabilisierung eine Agglomeration der Eisenoxidkerne.

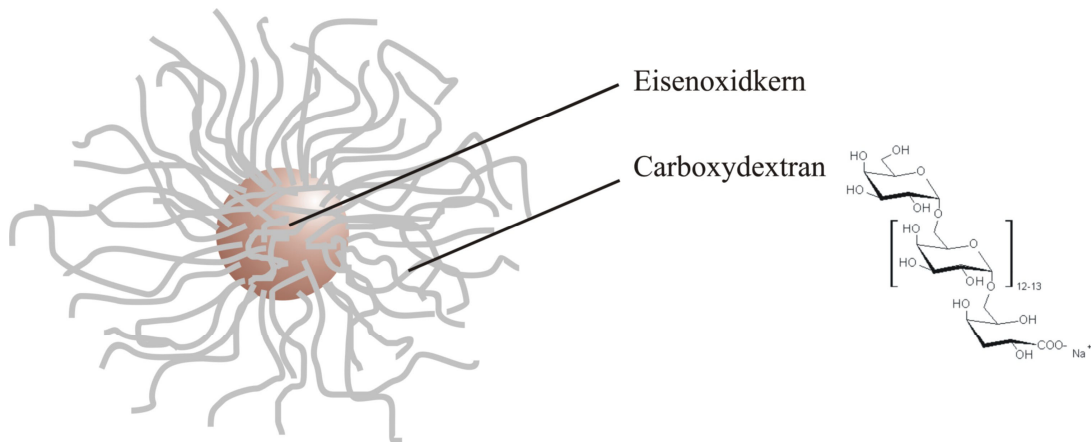


Abb. 10: Schematischer Aufbau der mit Carboxydextran beschichteten SPIO-Partikel.

Die Kerne bestehen, nach basischer Fällung, vorrangig aus Magnetit  $Fe_3O_4$ . Diese werden dann sorgfältig zu Maghemit ( $\gamma\text{-}Fe_2O_3$ ) oxidiert. Die kristalline Struktur des Kerns besteht vorrangig aus Maghemit und zu geringem Anteil aus Magnetit. Beide Kristallstrukturen sind isomorph und eine Form der inversen Spinell Struktur ( $AB_2X_4 = Fe_3O_4$  bzw.  $Fe^{II}(Fe^{III})_2O_4$ ), bei der die Sauerstoffatome kubisch sehr eng gepackt sind (Abb. 11). Im Magnetit ist ein 1/3 der Eisenionen tetraedrisch und 2/3 sowohl tetraedrisch als auch oktaedrisch ( $Fe^{2+}:Fe^{3+}$  Verhältnis 1:1) von Sauerstoff umgeben.

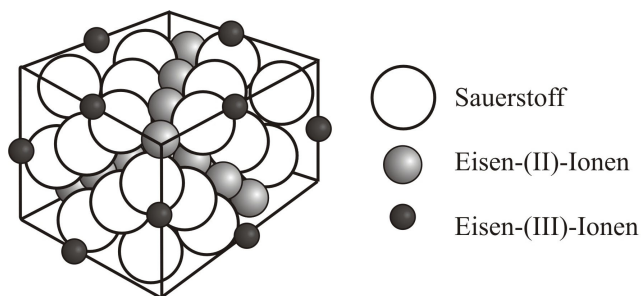


Abb. 11: Schematische Darstellung der inversen Spinellstruktur von Magnetit und Maghemit. Abbildung verändert nach Wang *et. al.* [40].

Beide Kristallstrukturen (Maghemit und Magnetit) sind ferrimagnetisch. Wenn jedoch die Partikelgrößen kleiner als eine Weiss'sche-Domäne (ca. 30 nm) sind, verhalten sich die Partikel superparamagnetisch (vgl. Kap. 2.2.2).

### 2.3.3 Relaxationstheorie superparamagnetischer Eisenoxidpartikel

Die Relaxationstheorie für superparamagnetische Eisenoxidpartikel ist von der Theorie für paramagnetische Substanzen abgeleitet. Daher ist es sinnvoll, zunächst die paramagnetische Relaxation zu betrachten.

Die paramagnetische Relaxation der Protonen in Wasser hat ihre Ursache in den Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen den Protonen-Kernspins und dem fluktuierenden lokalen Magnetfeld, welches durch die ungepaarten Elektronen-Spins der paramagnetischen Substanz hervorgerufen wird. Die Protonen in der Umgebung des Kontrastmittels werden eingeteilt in innere („inner-sphere“) und äußere Schicht („outer-sphere“) [67] (Abb. 12).

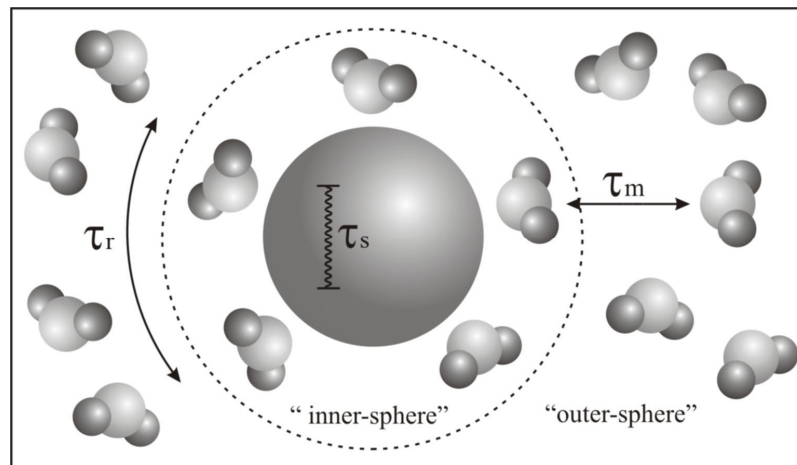


Abb. 12: Dargestellt sind die Beiträge zur effektiven Korrelationszeit der Protonen ( $\tau_c$ ) unter Einfluss eines paramagnetischen Kontrastmittels. Die innere Schicht („inner-sphere“) beschreibt die Protonen in direkter Umgebung des Kontrastmittels. Die Wassermoleküle, die sich nicht in der ersten koordinierten Schicht des Kontrastmittels befinden, werden zur so genannten äußeren Schicht („outer-sphere“) gezählt. Die effektive Korrelationszeit wird beeinflusst durch die Austauschrate zwischen innerer und äußerer Schicht ( $\tau_m$ ), durch die Elektronenspin-Relaxation des paramagnetischen Ions ( $\tau_s$ ) und durch die Rotation des paramagnetischen Ions ( $\tau_r$ ). Abbildung verändert nach Krause *et. al.* [31].

Der Anteil der „inner-sphere“ Relaxation ist geprägt von den Wechselwirkungen zwischen den Elektronenspins der paramagnetischen Ionen und den Protonen in der ersten koordinierten Schicht des Kontrastmittels. Die  $R_1$ - und  $R_2$ -Relaxivitäten für die Protonen der Wassermoleküle in der inneren Schicht können mit Hilfe der Solomon-Bloembergen-Gleichung [67] errechnet werden. Die effektive Korrelationszeit wird durch die Rotation des paramagnetischen Zentrums ( $\tau_r$ ), die Elektronenspin-Relaxation des paramagnetischen Ions

( $\tau_s$ ) und durch die Austauschrate der Wassermoleküle zwischen innerer und äußerer Schicht ( $\tau_m$ ) beeinflusst:

$$\frac{1}{\tau_c} = \frac{1}{\tau_r} + \frac{1}{\tau_s} + \frac{1}{\tau_m} \quad (\text{Gl. 12}).$$

Im Falle von gadoliniumhaltigen Kontrastmitteln ist der Anteil der „inner-sphere“ Relaxation an der Gesamt-Relaxation ca. 50 % [25]. Wenn der Anteil der Wassermoleküle in der Hydrathülle des paramagnetischen Kontrastmittels sinkt, gewinnt der Mechanismus der „outer-sphere“ Relaxivität zunehmend an Bedeutung. Die „outer-sphere“ Relaxation kann mit Hilfe der Feed Dichte-Funktion ( $J_F(\omega)$ ) theoretisch errechnet werden und ist in der Literatur von Lauffer [68] und König, Kellar [69] ausführlich beschrieben.

Durch die hohe Ordnung im Kristallgitter *superparamagnetischer Eisenoxid-Nanopartikel* sind die Wechselwirkungen zwischen den Elektronen in der Hydrathülle jedes  $\text{Fe}^{3+}$ -Ions mit den umgebenden Wasserprotonen nur geringfügig vorhanden. Lediglich an der Kristallgitteroberfläche könnten Interaktionen zwischen  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen und Wassermolekülen in der Bulklösung auftreten. Durch das Carboxydextran auf der Oberfläche sind jedoch nur sehr wenige oder sogar keine freien  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen zugänglich, so dass der Beitrag der „inner-sphere“ Relaxation im Falle von superparamagnetischen Nanopartikeln nur sehr gering ist und vernachlässigt werden kann.

Roch, Gillis und Muller präsentierten 1992, abgeleitet von der „outer-sphere“ Relaxationstheorie für paramagnetische Ionen, die erste Theorie zur Relaxation von Protonen in Gegenwart von superparamagnetischen Nanopartikeln [70]. Die ersten  $1/T_1$  und  $1/T_2$  NMRD (nuclear magnetic relaxation dispersion) Profile superparamagnetischer Nanopartikel wurden 1995 von König und Kellar beschrieben [69]. Roch und Gillis erweiterten das Modell für die Relaxation magnetischer Nanopartikel für alle Larmorfrequenzen und betrachteten zusätzlich den dominierenden Einfluss der Anisotropie bei niedrigen Feldern und den geringen Einfluss der Anisotropie bei hohen Feldern [71] (vgl. Anhang Kap. 8.2, S. 122). In ihrer Arbeit beschreiben sie die theoretische Abhängigkeit der longitudinalen und transversalen Relaxivität ( $R_1$  und  $R_2$ ) von der Partikelgröße für den gesamten Frequenzbereich (Abb. 13).

Wie in Abb. 13 zu sehen, weist die Relaxivität  $R_1$  im niedrigen Frequenzbereich für alle Partikelgrößen ein Plateau auf, mit höher werdender Larmorfrequenz steigt die Relaxivität sprunghaft an und fällt dann bei hohen Larmorfrequenzen gegen Null ab. Die transversale Relaxation zeigt einen ähnlichen Verlauf, wobei die Relaxivität auch bei hohen

Larmorfrequenzen nicht gegen Null abfällt, sondern in Abhängigkeit von der Partikelgröße ein charakteristisches Plateau erreicht.

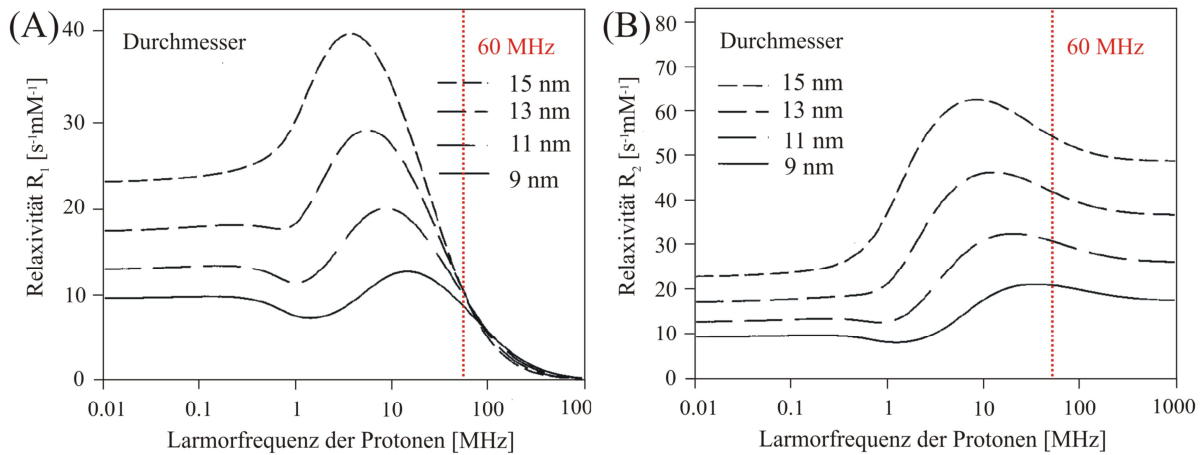


Abb. 13: Verändert nach Roch A, Muller RN und Gillis P, Journal of Chemical Physics 1999 [71]. **(A)** Dargestellt ist der Einfluss der Partikelgröße auf die longitudinale Relaxivität als Funktion der Lamorfrequenz. **(B)** Darstellung der Abhängigkeit der transversalen Relaxivität über den gesamten Larmorfrequenzbereich für unterschiedliche Partikelgrößen superparamagnetischer Nanopartikel (60 MHz = 1,41 Tesla).

Für die Anwendung SPIO-basierter Kontrastmittel ist vor allem die Relaxivität bei höheren Larmorfrequenzen relevant, da die klinischen Scanner bei hohen Magnetfeldstärken messen (1,5 bis 3 Tesla). Wird eine Frequenz von 60 MHz (1.41 Tesla) betrachtet, ergibt sich annähernd ein linearer Anstieg der Relaxivität ( $R_2$ ) mit zunehmender Partikelgröße (Abb. 14 [71]). Die  $R_1$ -Relaxivitäten bei 60 MHz werden hingegen nicht so stark von der Partikelgröße beeinflusst.

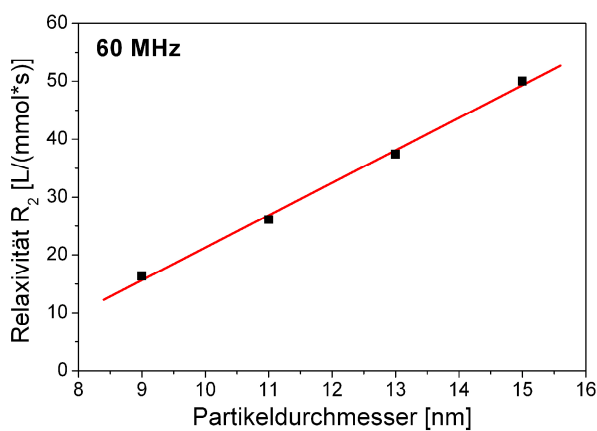


Abb. 14: Darstellung der Relaxivität  $R_2$  im hochfrequenten Feld (60 MHz) in Abhängigkeit von der Partikelgröße [71].

### 2.3.4 Pharmakologie von SPIO-Partikeln

#### Pharmakokinetik

Superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel werden nach intravenöser Applikation rasch im intravaskulären Raum verteilt. Durch eine selektive Aufnahme in Zellen des mononukleären Phagozytensystems (MPS) [8, 40] werden die Partikel schnell aus dem Blut bzw. Plasma entfernt.

Das MPS wurde früher auch als Retikuloendotheliales System (RES) bezeichnet und beschreibt die Gesamtheit aller Zellen des retikulären Bindegewebes. Das MPS ist als Teil der unspezifischen Immunabwehr und unter anderem für den Abbau überalterten oder geschädigten körpereigenen Gewebes sowie eingedrungenen körperfremden Materials (z.B. Bakterien) verantwortlich. Diese Aufgabe wird zu einem wesentlichen Teil von Makrophagen übernommen, welche diese Materialien aufnehmen (= phagozytieren) und teilweise intrazellulär abbauen. Das MPS wird in zwei Hauptgruppen unterteilt: die frei zirkulierenden Monozyten und die fixierten (bzw. nicht zirkulierenden) Makrophagen im Gewebe. Frei zirkulierende Monozyten sind z.B. neutrophile Granulozyten und Makrophagen im Blut. Ortsständige Makrophagen, so genannte Histiozyten kommen in vielen Geweben vor und sind gewebsspezifische Makrophagen [72]. Zu Ihnen gehören z.B. Kupffer'sche-Sternzellen in der Leber, Makrophagen in der Milz (rote Pulpa), alveoläre Makrophagen in der Lunge, interdigitierende dendritische Zellen in den lymphatischen Organen und Langerhans-Zellen in der Epidermis der Haut und in den Schleimhäuten.

Szintigraphische Untersuchungen zugelassener Kontrastmittel mit radioaktiv markierten Eisenoxid-Formulierungen ( $^{59}\text{Fe}$ ) zeigen, dass die Eisenoxid-Nanopartikel vor allem von Makrophagen in Leber, Milz und Knochenmark aufgenommen werden (Tab. 2, Humandaten) [73-76].

Tab. 2: Verteilung zugelassener SPIO-Kontrastmittel ( $^{59}\text{Fe}$ -gelabelt) im Körper eine Stunde nach Applikation.

<b>Substanz</b>	<b>Leber (human)</b>	<b>Milz (human)</b>
Endorem <sup>®</sup> (AMI-25) [73]	82,6 %	6,2 %
Resovist <sup>®</sup> (SHU 555 A) [76]	80 %	8-9 %

Da die Pharmakokinetik der verschiedenen Eisenoxid-Nanopartikel stark von der *Dosierung*, der *Partikelbeschichtung*, *Größe*, *Partikelmatrix* und *Ladung* der Partikel [12-15]

abhängig ist, variieren die Bluthalbwertszeiten in Humanstudien von einer Stunde bis hin zu 24-36 Stunden (Tab. 3 [8]).

Tab. 3: Übersicht über in der klinischen Entwicklung befindliche und zugelassene superparamagnetische Kontrastmittel und deren charakteristischen Eigenschaften [8].

<i>Substanz</i>	<i>Handelsname</i>	<i>Beschichtung (Hüllmaterial)</i>	$d_H$ (nm)	$t_{1/2}$ (human, klinische Dosis)	<i>Relaxivität<sup>1)</sup></i> ( $mM^{-1}s^{-1}$ )
SHU 555 A	Resovist <sup>®</sup>	Carboxydextran	60	2.4-3.6 h (8-12 $\mu\text{mol/kg}$ )	$R_1 = 9.7$ $R_2 = 189$
SHU 555 C	Supravist <sup>®</sup>	Carboxydextran	20	6 h (40 $\mu\text{mol/kg}$ )	$R_1 = 10.7^*$ $R_2 = 38^*$
AMI-25	Endorem <sup>®</sup> Feridex <sup>®</sup>	Dextran	120-180	2 h (30 $\mu\text{mol/kg}$ )	$R_1 = 10.1$ $R_2 = 120$
AMI-227	Sinerem <sup>®</sup> Combidx <sup>®</sup>	Dextran	15-30	24-36 h (45 $\mu\text{mol/kg}$ )	$R_1 = 9.9$ $R_2 = 65$
Ferumoxytol (Code 7228)	-	Carboxymethyl-dextran	30	10-14 h (18-12 $\mu\text{mol/kg}$ )	$R_1 = 15$ $R_2 = 89$
NC 100150	Clariscan <sup>®</sup>	PEG-ylierte Stärke	20	6 h (36 $\mu\text{mol/kg}$ )	$R_1 = 15.5$ $R_2 = 36$
VSOP-C184	-	Citrat	7	0.6-1.3 h (15-75 $\mu\text{mol/kg}$ )	$R_1 = 14$ $R_2 = 33.4$

1) Relaxivitäten bei 1,5 T und 37 °C, in Wasser oder \*Plasma gemessen

Für alle Eisenoxid-Nanopartikel sind die Bluthalbwertszeiten dosisabhängig. Hohe *Dosierungen* von SPIO-Partikeln bewirken aufgrund einer nur begrenzten Phagozytose-Kapazität in Leber und Milz eine verlängerte Bluthalbwertszeit [77]. Im Größenbereich der angewandten klinischen Dosierungen spielt jedoch die fortschreitende Sättigung der Makrophagen noch keine Rolle.

Die *Beschichtung* und *Ladung* der Partikel beeinflussen ebenfalls die Kinetik [78]. Ionisches Dextran, wie z.B. Carboxydextran oder Carboxymethyldextran, werden *in vitro* schneller von Makrophagen aufgenommen und zeigen bei gleich bleibender Partikelgröße *in vivo* eine kürzere Bluthalbwertszeit als Partikel mit nichtionischer Dextran-Beschichtung (Tab. 3) [18, 20, 79].

Wenn die Beschichtung und Matrix der Partikel gleich ist, hängt die Aufnahme der Partikel stark von ihrer *Größe* ab [80]. Kleinere Partikel zirkulieren, bedingt durch eine verlangsamte Aufnahme in die Kupffer'schen-Zellen, länger im Blutkreislauf und akkumulieren stärker im Knochenmark und in den Lymphknoten als größere Partikel (AMI-25 verglichen mit AMI-227 und SHU 555 C verglichen mit SHU 555 A) [14, 81]. Aufgrund der längeren Bluthalbwertszeit werden kleinere Partikel (USPIO, Ultrasmall



Superparamagnetic Iron Oxide Particles) bevorzugt für  $T_1$ -gewichtete angiographische Untersuchungen eingesetzt [82-84]. Größere Partikel hingegen werden schnell von der Leber aufgenommen und sind in der klinischen Praxis etablierte Kontrastmittel zur Diagnostik unklarer Leberläsionen ( $T_2$ -gewichtete, vgl. Abb. 9, S. 14) [50, 85-87].

Die Bluthalbwertszeiten beim Menschen sind meist länger als die im Tierversuch (Ratte, Hund) bestimmten Bluthalbwertszeiten [8, 76]. So beträgt die Bluthalbwertszeit von kleinen Carboxydextran beschichteten SPIO-Partikeln (SHU 555 C) bei Ratten nur rund 35 min (50  $\mu\text{mol/kg}$ ), beim Menschen hingegen ca. 6 Stunden (40  $\mu\text{mol/kg}$ ) [82]. Im Vergleich zur klinischen Humandosis werden im Tierversuch häufig höhere Dosierungen (200  $\mu\text{mol}$  bis 1000  $\mu\text{mol Fe/kg}$ ) verwendet [8].

Neben der szintigraphischen  $^{59}\text{Fe}$ -Methode wurden auch Studien durchgeführt, welche die  $T_2$ -Relaxationsraten im MRT ( $T_2$ -Methode) zur Bestimmung pharmakokinetischer Parameter verwenden [74, 76, 86]. Die Aufnahme der SPIO-Partikel in die Zellen des MPS wird von diesen Studien bestätigt. Ein direkter Vergleich der Bluthalbwertszeiten beider Methoden ist jedoch genau abzuwägen, da MRT-inaktive Metabolite (z.B. oxidierte Verbindungen und Hydroxide) mittels der  $T_2$ -Methode nicht erfasst werden [8, 74]. Ein Vergleich der experimentellen Methoden für Carboxydextran beschichtete Partikel (SHU 555 A) zeigt, dass die Bluthalbwertszeit nach  $T_2$ -Methode etwas kürzer bestimmt wird (12 min) als bei der  $^{59}\text{Fe}$ -Methode: (17.5 min; biphasischer Verlauf, 2. Halbwertszeit: 66 min [76]).

#### *Metabolisierung und Ausscheidung*

Die genaue Metabolisierung bzw. der Abbau der Partikel in den Zellen des mononukleären Phagozytensystems (MPS) ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt [88]. Bekannt ist, dass sich die SPIO-Partikel nach Aufnahme in die Zellen des MPS in den intrazellulären Vesikeln anreichern [89-92]. Arbab *et al.* konnte ferner zeigen, dass durch Phagozytose entstehende Endosomen mit Eisenoxidpartikeln angereichert sind und diese mit intrazellulären Lysosomen zu Endolysosomen verschmelzen [88]. Müller *et al.* beschrieb ebenfalls, dass sich dextranbeschichtete Ferumoxid-10 Partikel in Lysosomen und Endosomen sehr stark anreichern [93]. Die Ferumoxan-10 Partikel (AMI-227) werden innerhalb von sieben Tagen in den lysosomalen Kompartimenten der Makrophagen abgebaut [94]. Unter Einfluss von hydrolytischen Enzymen, Proteinen und einem niedrigen pH-Wert ( $\sim 4.5$ ) in den Lysosomen werden die SPIO-Partikel in Eisen und Sauerstoff abgebaut [84]. Das Eisen wird

anschließend in den physiologischen Eisenstoffwechsel eingeschleust [74, 88, 90, 91]. Letztendlich wird das Kontrastmittel-Eisen in Form von Ferritin in den Eisenspeicher aufgenommen und auf die gleiche Weise metabolisiert wie physiologisch verfügbares Eisen [95]. Der Eisenstoffwechsel des Menschen mit Transferrin für den Eisentransport sowie Ferritin und Hämosiderin als Depot- oder Reserve-Eisen ist in Abb. 15 schematisch dargestellt.

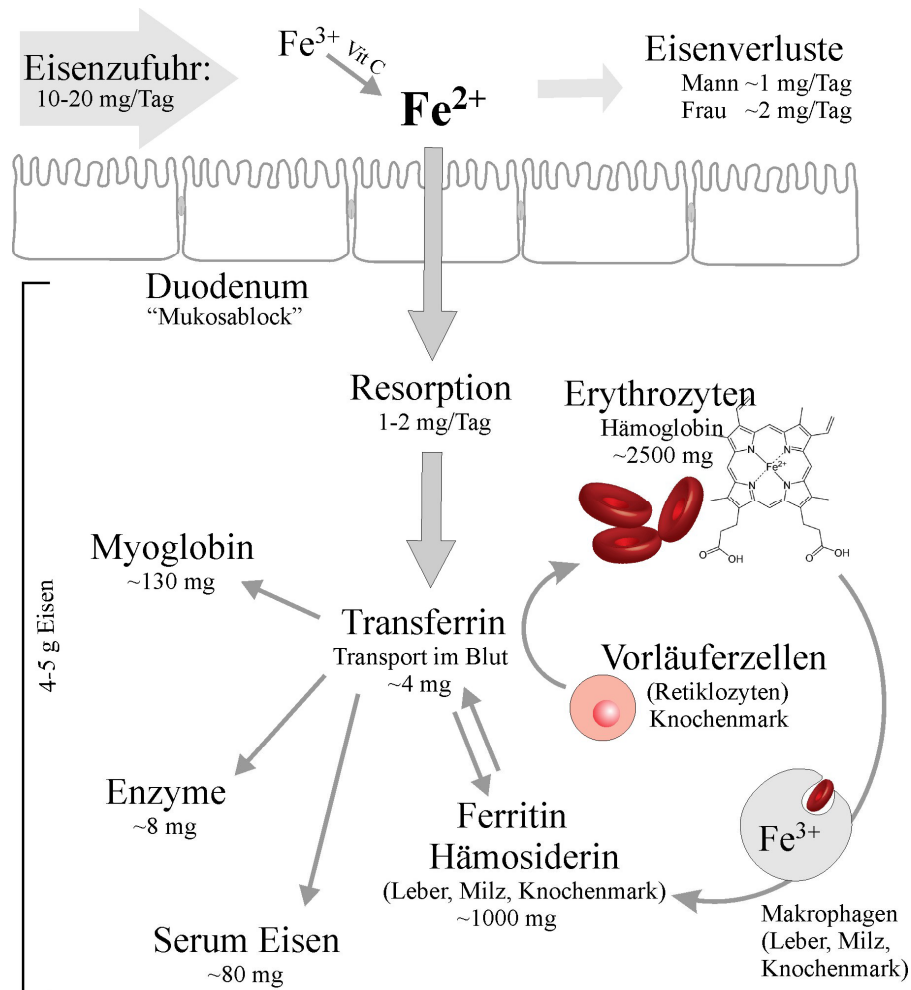


Abb. 15: Schematische Darstellung des Eisenstoffwechsels beim Menschen.

Ein Anstieg der Ferritin-Level wurde für verschiedene SPIO-basierende Kontrastmittel festgestellt [96-98]. Studien mit  $^{59}\text{Fe}$ -markiertem Eisen zeigen, dass das Eisen aus dem Kontrastmittel analog dem körpereigenen Eisen in Hämoglobin der Erythrozyten eingebaut wird. Mit Hilfe von  $^{59}\text{Fe}$ -Carboxydextran beschichteten Partikeln konnte gezeigt werden, dass nach sechs Wochen 72 % der applizierten Dosis im Hämoglobin wieder zu finden sind [76]. Auch für  $^{59}\text{Fe}$ -Dextran beschichtete Partikel (AMI-25) konnte gezeigt werden, dass das Eisen aus den Partikeln in das Hämoglobin der Erythrozyten eingebaut wird [73]. Wie das endogene

Eisen wird auch das Kontrastmittel-Eisen nur sehr langsam aus dem Körper ausgeschieden. Gesunde Männer haben im Normalfall eine Eisenausscheidung von ca. 1 mg pro Tag. Frauen im gebärfähigen Alter scheiden etwa 2 mg pro Tag aus. Die täglichen Eisenverluste kommen vor allem durch Zellabschilferungen (insbesondere Magen-Darm-Kanal) und/oder durch Blutverluste während der Menstruation zustande [99]. Das Eisen aus dem Kontrastmittel verbleibt mehrere Tage bis Wochen im Organismus. Der genaue Einfluss der Größe und der Beschichtung der Partikel auf die Abbaugeschwindigkeit und die Art des Abbaus ist dabei weitgehend ungeklärt und wurde bisher nur wenig untersucht [12, 20].

Die Eliminierung des Hüllmaterials Carboxydextran erfolgt hauptsächlich über die Nieren. So konnte in tierexperimentellen Untersuchungen (bei der Ratte) gezeigt werden, dass über 70 % des Carboxydextrans in SHU 555 A renal eliminiert wird. Circa 20 % des Carboxydextrans zeigen eine ähnliche Verteilung wie die Eisenoxidkerne von SHU 555 A, akkumulieren in den Organen des MPS (vorrangig Leber und Niere) und werden über die Leber verstoffwechselt [50].

## **2.4 Asymmetrische Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung**

Es ist bekannt, dass die Größe und Partikelgrößenverteilung von SPIO-Partikeln einen Effekt auf die Partikelstabilität, die Pharmakokinetik sowie auf den Kontrast im MRT hat [13]. Eine detaillierte Charakterisierung der Partikelgrößen und Verteilungen ist daher von großer Bedeutung. Die Partikelgrößenverteilungen von SPIO-Partikeln wurden aber bisher nur wenig untersucht. Neben etablierten Charakterisierungsmethoden wie analytische Ultrazentrifugation, Transmissionselektronenmikroskopie, Kleinwinkel-Röntgenstreuung und dynamische Lichtstreuung wurde die Anwendbarkeit einer asymmetrischen Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung (A4F) als Methode der pharmazeutischen Analytik zur Analyse der hergestellten SPIO-Chargen geprüft. Im folgenden Kapitel werden daher Anwendungen der A4F und das Trennprinzip vorgestellt.

### **2.4.1 Trennprinzip der A4F**

Die Feld-Fluss-Fraktionierung (FFF) wurde in den sechziger Jahren von Giddings entwickelt und umfasst ein breites Spektrum an analytischen Separationstechniken, wie die Sedimentations-Gravitations-FFF, die Thermische FFF, die Elektrische-FFF und die Fluss-FFF [100, 101]. Zur Familie der Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierungen gehört die asymmetrische Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung (A4F) [102-106]. Das zugrunde liegende Trennprinzip

(Abb. 16) ist vergleichbar mit anderen chromatographischen Methoden. Dabei wird die zu analysierende Probe über eine Probenschleife injiziert und anschließend über ein Kraftfeld aufgetrennt. Die Trennwirkung der A4F-Methode beruht auf einer spezifischen Verteilung der verschiedenen Probenbestandteile in Bereichen unterschiedlicher Strömungsgeschwindigkeiten.

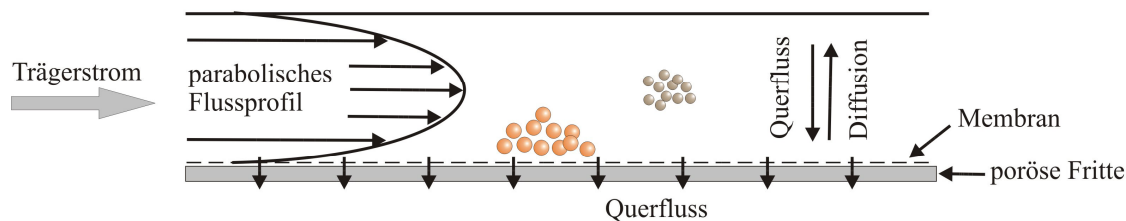


Abb. 16: Trennprinzip der asymmetrischen Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung.

Die Separation erfolgt in einem trapezförmigen, schmalen, flachen Kanal ( $\mu\text{m}$ -Bereich). In dem Kanal bildet sich, vergleichbar mit dem Meniskus in einer Kapillare, ein laminarer Fluss mit einem parabolischen Flussprofil (Abb. 16). Senkrecht zum laminaren Trägerstrom wird ein zweiter Fluss, der so genannte Querfluss, angelegt. Der Querfluss verlässt den Kanal durch eine spezielle Membran an der Unterseite und bewirkt eine Anreicherung der Probe in den unteren Schichten des Kanals. Dem entgegen wirkt die Diffusion (Brownsche Molekularbewegung). Je größer der Diffusionskoeffizient eines Teilchens ist, desto stärker kann es gegen den Querfluss Richtung Kanalmitte diffundieren. Innerhalb eines bestimmten Zeitraumes stellt sich ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Querflusskraft und Diffusionskraft ein. Für jedes Teilchen resultiert daraus ein charakteristischer Gleichgewichtsabstand von der Kanalunterseite. Das parabolische Flussprofil des Trägerstroms bewirkt, dass wandnahe Schichten deutlich langsamer durch den Kanal strömen als die Schichten in der Mitte. Somit werden kleinere Partikel, welche einen vergleichsweise großen Abstand zur Kanalunterseite haben, aufgrund der höheren Fließgeschwindigkeit in der Kanalmitte schneller eluiert als größere Partikel.

Für einen idealen Trennverlauf (*normale Elution*) sind die Retentionszeiten,  $t_r$ , in der A4F umgekehrt proportional zum Diffusionskoeffizienten ( $D$ ).

$$t_r = \frac{t_0 V_c w^2}{6 D V_0} \quad (\text{Gl. 13})$$

Die Retentionszeit ist die Zeit, die die Nanopartikel oder Moleküle bei angelegtem Querfluss zum Durchwandern der A4F-Kanals benötigen. Sie ist abhängig vom

Diffusionskoeffizienten, von der Totzeit ( $t_0$ ), vom Volumen des Kanals ( $V_0$ ), von der Kanalhöhe  $w$  und dem angelegten Querfluss  $V_C$ . Die Totzeit ist für alle untersuchten Proben gleich, denn es ist die Zeit, die der Eluent benötigt, um durch den A4F-Kanal zu wandern.

Unter Annahme einer sphärischen Partikelform kann mit Hilfe der Stokes-Einstein Gleichung aus dem Diffusionskoeffizienten der hydrodynamische Radius,  $R_H$ , errechnet werden:

$$R_H = \frac{k_B \cdot T}{6\pi \cdot \eta_0 \cdot D} \quad (\text{Gl. 14})$$

Dabei ist  $k_B$  die Boltzmannkonstante ( $\sim 1,38 \cdot 10^{-23}$  J/K),  $T$  die absolute Temperatur und  $\eta_0$  die dynamische Viskosität des Lösemittels.

Für sehr große Partikel ( $> 1 \mu\text{m}$ ) kann die Trennung invers verlaufen. Das Trennprinzip der so genannten *sterischen Elution* wurde erstmals von Giddings und Myers beschrieben [107]. In diesem speziellen Fall sind die Partikel so groß, dass sie in Folge des Querflusses zwar auf der Membran aufliegen, jedoch so weit in den Kanal hinein ragen, dass sie einer schnelleren Strömungsgeschwindigkeit ausgesetzt sind und entsprechend früher eluiert werden (Abb. 17) [108].

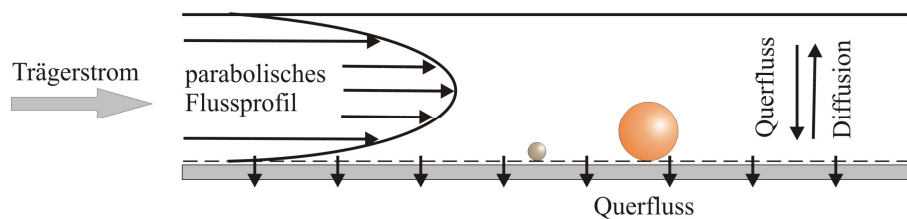


Abb. 17: Trennprinzip der sterischen Elution.

Die Berechnung der Partikelgrößen direkt aus den Retentionszeiten (Gl. 13 und Gl. 14) hat sich in der Vergangenheit als störungsanfällig erwiesen. So gilt die ideale Elutionstheorie z.B. nur für sphärische Partikel und unter der Voraussetzung, dass keinerlei Wechselwirkungen zwischen Probe und Membran auftreten. Des Weiteren können die Retentionszeiten auch durch Temperaturschwankungen, elektrostatische Abstoßungen zwischen den Partikeln, durch Überladungseffekte oder die Zusammensetzung des Eluenten beeinflusst werden [105, 109, 110]. Da sich störende Effekte und Wechselwirkungen in der Praxis nicht völlig ausschließen lassen, ist die Berechnung der absoluten Größen- und Molmassenverteilungen allein über die Retentionszeiten häufig mit Fehlern behaftet. Sinnvoller ist es, die Größen- und Molmassenverteilung einer Probe mit nachgeschalteten

Detektoren wie z.B. UV, RI, MALLS oder DLS zu bestimmen. Empfehlenswert ist nicht nur die Kombination mit Konzentrationsdetektoren (UV, IR), sondern vor allem die Kopplung mit Detektoren, die Molmassen bzw. Partikelgrößen direkt auswerten können (vgl. Kap. 2.4.3).

#### **2.4.2 Anwendungen der asymmetrischen Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung**

Der größte Vorteil der A4F ist die Anwendbarkeit der Methode in einem sehr breiten Größenbereich. So können Partikel zwischen 2 nm und 100 µm und Makromoleküle zwischen 1kDa und mehreren GDa analysiert werden [111]. Dieser breite Analysenbereich macht die A4F vor allem in der Polymer- und Biochemie zu einer wertvollen Analysenmethode. So wurden viele verschiedene Proteine wie z.B. humane Plasmaproteine, Thyreoglobulin, Aldolase und Ferritin mit der A4F erfolgreich untersucht [101, 112, 113]. Durch die Separation ist es dabei auch möglich, die Mono-, Di- und Trimere von Rinder- und humanem Serum Albumin zu unterscheiden oder verschiedene Immunglobuline voneinander zu trennen [101, 114, 115]. Auch Proteinagglomeration und Wechselwirkungen zwischen Arzneimitteln und Plasmaproteinen können mittels A4F gut untersucht werden [116, 117]. Komplexere und biologische Proben wie DNA, Ribosomen, Bakterien und Viren können ebenfalls mittels A4F analysiert werden [118].

Die Untersuchung von Makromolekülen mittels A4F hat eine besondere Bedeutung. Viele verschiedene Polymere und Polysaccharide wie: z.B. Polyvinylpyrrolidone [119] Xanthane, κ-Carrageene [120], wie Dextran und Pullulan [121] und auch Polyaminosaccharide wie Chitosan [122, 123] konnten auf diese Weise ausführlich charakterisiert werden. Besonders vorteilhaft ist dabei, dass eventuelle Verunreinigungen in Lösungen wie beispielsweise Ionen durch die Membran abgetrennt werden und dass auch die Molmasse sehr breit verteilter Makromoleküle sehr gut bestimmt werden kann [124]. Bisher beschreiben nur wenige Arbeiten die Anwendung der A4F zur Analytik von wässrigen, magnetischen Flüssigkeiten [125, 126].

Verglichen mit etablierten Methoden zur Partikelgrößenbestimmung wie analytische Ultrazentrifugation (AUZ), Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und dynamische Lichtstreuung (DLS „in-batch“) hat die A4F viele Vorteile. So können mittels A4F, ähnlich der AUZ, auch komplexe Partikelgrößenverteilungen bestimmt werden. Die Partikel eluieren, je nach Größe, zu unterschiedlichen Zeiten, so dass durch die Kopplung mit verschiedenen Detektoren (DLS, MALLS und UV, vgl. Kap. 2.4.3) die Partikelgrößen zu jedem Zeitpunkt der Trennung bestimmt werden können. Häufig ist bei einer „in-batch“ Methode die

Auflösung der Partikelgrößenverteilung problematisch. Werden die Partikel jedoch vor der Analyse mittels A4F aufgetrennt, ist dieses Problem stark reduziert. Zusätzlich können Staub und Aggregate in der Dispersion das Ergebnis nicht verfälschen. Dies stellt gegenüber der dynamischen Lichtstreuung („in-batch“), die gerade bei breiten oder polymodalen Verteilungen an ihre Grenzen stößt, einen sehr großen Vorteil dar [127]. Auch verglichen mit der Transmissionselektronenmikroskopie birgt die A4F einige Vorteile. Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ermöglicht eine visuelle Darstellung der Partikel und kann Informationen zur Größe und Form der Partikel geben. Problematisch ist jedoch die Probenvorbereitung. Dabei werden die Proben auf einem Grid getrocknet und anschließend vermessen. Aggregate, welche im TEM sichtbar sind, können entweder den realen Verhältnissen in Lösung entsprechen oder aber durch die Probenpräparation entstanden sein. Ferner ist die Beschichtung bei Kern/Hülle Strukturen nicht immer sichtbar, da das Hüllmaterial durch den Trocknungsprozess kollabieren kann oder der Kontrast im TEM nicht ausreicht. Ein TEM-Bild liefert zudem nur einen kleinen, stichprobenartigen Ausschnitt aus der Gesamtprobe. Zur Bestimmung der mittleren Partikelgröße sind jedoch viele zeitaufwendige Messungen erforderlich, um ein statistisch sicheres Ergebnis erzielen zu können. Die A4F misst hingegen direkt die Verhältnisse in wässriger Lösung und spiegelt die Verhältnisse der Gesamtprobe wider.

Verglichen mit anderen Separationsmethoden wie der Gelpermeationschromatographie (GPC) kann die A4F in einem breiteren Molmassen und Größenbereich angewandt werden und ist eine sehr gute Alternative. Die GPC ist durch eine Maximalgröße, die so genannte Ausschlussgröße (engl. „exclusion limit“) limitiert. Partikel oder Polymere, die zu groß sind, um in die Poren der stationären Phase eindringen zu können, werden nicht aufgetrennt. Auch geladene Partikel sind mittels GPC häufig problematisch zu analysieren, weil sie vielfältige Wechselwirkungen mit der stationären Phase aufweisen können. Auch stark adsorbierende Proben können in der GPC-Trennsäule festgehalten werden und die Interpretation der Ergebnisse erschweren [128]. In der A4F wird keine stationäre Phase verwendet, lediglich die Membran könnte mit geladenen oder stark adsorbierenden Proben Wechselwirkungen verursachen, jedoch ist die zur Verfügung stehende Oberfläche sehr gering. Vergleichende Untersuchungen zwischen GPC und A4F konnten zeigen, dass beide Methoden qualitativ gleichwertige Ergebnisse liefern bzw. größere Makromoleküle (> 50kDa) teilweise sogar besser mit der A4F aufgetrennt werden können [123, 129, 130].

### 2.4.3 Geräteaufbau der verwendeten A4F-Methode

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Separationsanlage ist in Abb. 18 dargestellt. Die Messparameter der verwendeten Methode werden ausführlich in Kapitel 3.2.4 beschrieben. Die Kopplung mit einem Mehrwinkellichtstreuendetektor (MALLS) ist etabliert und in der Literatur für viele Anwendungen bereits beschrieben. So wurde die A4F/MALLS Kopplung bereits erfolgreich zur Größenbestimmung von Polystyrol-Partikeln [131], Gelatine-Nanopartikeln [132] und zur Analytik verschiedener Biopolymere, wie z.B.  $\kappa$ -Carrageene und Xanthane [120], Pullulane und Dextrane [121] sowie Chitosane eingesetzt [133].

Eine Besonderheit der verwendeten Anlage ist die direkte Kopplung mit einem dynamischen Lichtstreuendetektor (DLS, vgl. 2.4.4). Durch eine technische Weiterentwicklung ist der DLS-Detektor in der Lage während der gesamten A4F-Trennung kontinuierlich zu messen. Es ist nicht mehr notwendig, den Trägerstrom anzuhalten, um dynamische Lichtstreuendaten zu gewinnen.

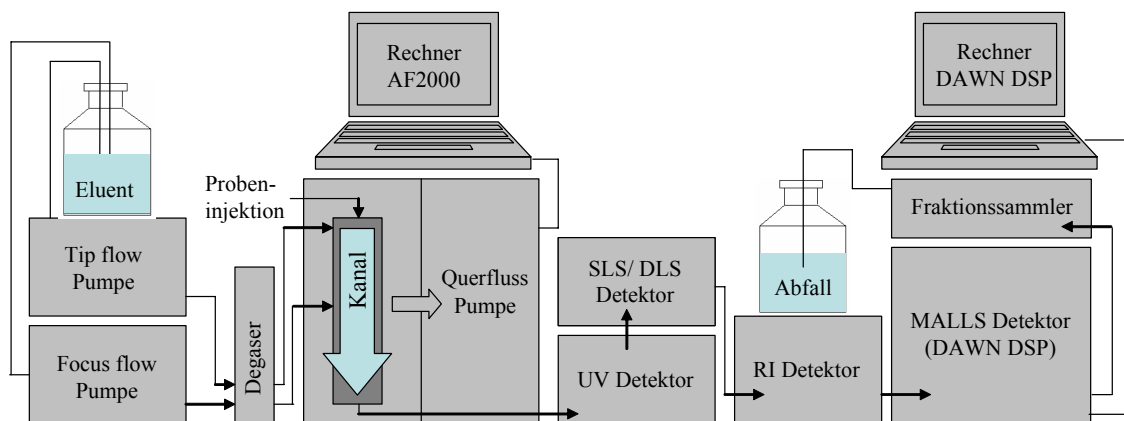


Abb. 18: Aufbau der asymmetrischen Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung: AF-2000 Focus System mit Trennkanal und Pumpen (PN 1122 Solvent Delivery Systems) von Postnova Analytics GmbH (Landsberg, Deutschland). Gekoppelte Detektoren: UV Detektor (SPD-M20A Diode Array Detektor) und Lichtstreuendetektor mit statischer und dynamischer Lichtstreuung (PN 3000) von Postnova Analytics GmbH. Brechungsindexdetektor (Optilab 903) und Mehrwinkellichtstreuendetektor (DAWN-DSP Laser Photometer) von Wyatt Technology Corp. (Santa Barbara, USA).



#### 2.4.4 Dynamische Lichtstreuung

Die dynamische Lichtstreuung (DLS), auch als Photonenkorrelationsspektroskopie bezeichnet, ist eine etablierte und häufig angewandte Methode zur Bestimmung hydrodynamischer Größen [134-137]. Angewandt wird die DLS vor allem zur Charakterisierung von gelösten Makromolekülen (Polymere, Proteine) und kolloidalen Dispersionen, wie Suspensionen oder Emulsionen. Mittels DLS können Teilchen in einem Größenbereich von ca. 3 nm bis etwa 3  $\mu\text{m}$  detektiert werden [138].

Das Messprinzip der DLS knüpft an das Dopplerprinzip an. Bewegt sich eine Wellen aussendende Quelle mit einer bestimmten Geschwindigkeit relativ zum Beobachter, erleidet die Welle beim Beobachter eine Frequenzverschiebung (analog Dopplereffekt bei einem vorbei fahrenden Krankenwagen). Trifft monochromatisches Laserlicht auf Nanopartikel in Suspension oder Makromoleküle in Lösung wird das Licht aufgrund der unterschiedlichen Brechungs-Indizes der inneren und äußeren Phase in alle Richtungen gestreut (Rayleigh-Streuung). Durch die Bewegung der dispergierten Teilchen aufgrund der Brownschen Molekularbewegung verändern sich die Abstände der Streuzentren ständig zueinander. Das Streulicht verschiedener Streuzentren interferiert miteinander und verursacht über die Zeit kleine Fluktuationen der Streulichtintensitäten am Detektor. Je größer die Partikel sind, desto langsamer bewegen sie sich im Dispersionsmedium und desto größer ist die Zeitskala der Fluktuation der Streulichtintensität. Das heißt, die gemessenen Fluktuationen der Intensität über die Zeit enthalten Information über die Geschwindigkeit, mit der sich die Teilchen in der Lösung bewegen. Mit Hilfe einer Autokorrelationsfunktion kann die enthaltene Information aus dem Messsignal extrahiert werden [138]. Für monodisperse Dispersionen ist aus dem exponentiellen Abfall der Korrelationsfunktion ( $g(\tau)$ ) der Diffusionskoeffizient ( $D$  in  $\text{m}^2/\text{s}$ ) der Partikel erhältlich [139].

$$g(\tau) = e^{-2DK^2\tau} \quad (\text{Gl. 15})$$

Der Betrag des Streuvektors  $K$  und die Verzögerungszeit  $\tau$  sind von den Messbedingungen abhängig und rechnerisch als konstante Größen zugänglich, so dass der Diffusionskoeffizient die einzige Variable in der Korrelationsfunktion ist.

Unter der Annahme kugelförmiger Teilchen kann mit Hilfe der Stokes-Einstein-Gleichung aus dem Diffusionskoeffizienten der hydrodynamische Radius der Teilchen errechnet werden (Gl. 14, S. 26). Werden nicht-sphärische Partikel mittels DLS vermessen,

muss beachtet werden, dass der berechnete hydrodynamische Durchmesser dem Durchmesser einer diffusionsäquivalenten Kugel entspricht.

Als Ergebnis liefert die DLS neben dem mittleren intensitätsgewichteten Partikeldurchmesser (*z*-Average) auch den Polydispersitätsindex (PDI). Letzterer ist nicht zu verwechseln mit dem Polydispersitätsindex (*Q*) aus der Polymerchemie (Kapitel 2.4.6). Er beschreibt mathematisch den Unterschied der gemessenen Autokorrelationsfunktion zur angepassten Korrelationsfunktion und ist ein Maß für die Breite der Verteilung. Die Berechnung der Polydispersitätsindices mit Hilfe der so genannten Kumulanten-Analyse ist in der ISO Norm 13321 beschrieben. Bei dieser Auswertung wird die logarithmierte Autokorrelationsfunktion  $g(\tau)$  mit Hilfe einer polynomischen Funktion gefittet [140]:

$$\ln(g(\tau)) = a + bt + ct^2 + dt^3 + et^4 \quad (\text{Gl. 16})$$

Der Wert *b* ist bekannt als Kumulant 2. Ordnung und ist der *z*-Average des Diffusionskoeffizienten. Der *PDI* kann aus den Konstanten *b* und *c* (Kumulantenmethode) errechnet werden:

$$PDI = \frac{2 \cdot c}{b} \quad (\text{Gl. 17})$$

Der PDI kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Dispersionen mit einem PDI zwischen 0,03 und 0,06 werden als monodispers bezeichnet. Eine enge Verteilung liegt bei Werten zwischen 0,1 und 0,2 und eine breite Verteilung bei Werten zwischen 0,2 und 0,5 vor. Zeigt die Partikelgrößenverteilung einen PDI größer als 0,5 ist die Messung nicht auswertbar [139]. In diesem Fall ist das Anpassen der Korrelationsfunktion an die Autokorrelation zu ungenau und die Daten können nicht zuverlässig ausgewertet werden [139].

#### 2.4.5 Mehrwinkellichtstreuung

Im Gegensatz zur dynamischen Lichtstreuung, bei der die zeitliche Schwankung der Intensität um einen Mittelwert gemessen wird, ist bei der statischen Lichtstreuung (SLS) die absolute Streuintensität die primäre Messgröße [141-143].

Mit Hilfe der SLS ist es möglich die *Molmassen* und *Gyrationsradien* von z.B. Polymerlösungen oder Nanopartikel-Suspensionen zu bestimmen. Physikalisch gesehen wird bei der SLS das Phänomen der elastischen Lichtstreuung an Partikeln oder Molekülen ausgenutzt. Von elastischer Lichtstreuung spricht man, wenn eine einfallende elektromagnetische Welle durch Wechselwirkung mit einem Molekül aus seiner

ursprünglichen Richtung abgelenkt wird, jedoch die Energie der Welle (Frequenz) unverändert bleibt. Wird das gestreute Licht an einer Probe an mehreren unterschiedlichen Winkeln relativ zum einfallenden Laserlicht vermessen, spricht man von Mehrwinkellichtstreuung (engl. Multiangle Laser Light Scattering, MALLS). Moderne MALLS Geräte sind in der Lage, das gestreute Laserlicht kontinuierlich zu messen, was eine Kopplung mit fraktionierenden Methoden möglich macht. Die online Kopplung eines MALLS-Detektors mit AF4 ist bereits etabliert und wurde mehrfach für die Charakterisierung verschiedener Polymere und Nanopartikel eingesetzt [120, 121, 131-133, 144].

Die *Molmasse* ( $M_w$ ) kann mit Hilfe der Zimm-Gleichung aus der Lichtstreuintensität ( $Kc/R_\theta$ ) berechnet werden [141]:

$$\frac{Kc}{R_\theta} = \frac{1}{M_w P(\theta)} + 2A_2c + \dots \quad (\text{Gl. 18})$$

Dabei ist  $K$  eine spezifische Materialkonstante,  $c$  die Konzentration und  $R_\theta$  das Rayleigh-Verhältnis.  $A_2$  stellt den zweiten Virialkoeffizienten dar und beschreibt die Wechselwirkung zwischen Lösemittel und Substanz.

$P(\theta)$  ist eine Streufunktion und beschreibt die Winkelabhängigkeit der Streulichtintensität ( $\theta$  = Detektorwinkel). Die Streufunktion, auch Formfaktor genannt, beinhaltet Informationen zur Form der Makromoleküle oder Partikel:

$$P(\theta) = 1 - \alpha_1 \sin^2(\theta/2) + \alpha_2 \sin^4(\theta/2) - \dots \quad (\text{Gl. 19}).$$

Die Winkelabhängigkeit des Streulichtes für unterschiedlich große Partikel ist in Kap. 8.3 (Anhang, S. 123) detailliert beschrieben.

Der Gyrationradius kann aus dem Anstieg des Graphen  $Kc/R_\theta$  (vgl. Gl. 18) gegen  $\sin^2(\theta/2)$  berechnet werden (Zimm-Gleichung [141]). Der Gyrationradius ( $R_G$ ) ist ein Maß für die Ausdehnung eines Partikels oder Moleküls im Raum und ergibt sich aus der Summe der mittleren Abstandsquadrate eines Atoms ( $i$ ) mit der Masse ( $m_i$ ) vom Massenschwerpunkt des Moleküls oder Partikels (Summe der Trägheitsmomente).

$$R_G^2 = \frac{\sum_i m_i \cdot r_i^2}{\sum_i m_i} \quad (\text{Gl. 20})$$

In dem Fall, dass die zu untersuchende Probe nur ideal kugelförmige, homogene Partikel enthält, kann der Gyrationradius mit Hilfe der folgenden Formel modellhaft in den hydrodynamischen Radius ( $R_H$ ) umgerechnet werden [145].

$$R_H = \sqrt{\frac{20}{3} \langle R_G \rangle^2} \quad (\text{Gl. 21})$$

#### 2.4.6 Polydispersitätsindex

Neben der Bestimmung absoluter Größen- und Molmassenverteilungen bietet die Kopplung der asymmetrischen Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung mit statischer Mehrwinkellichtstreuung, dynamischer Lichtstreuung und einem UV-Detektor die Möglichkeit, weitere Parameter wie den Polydispersitätsindex (PDI) zu bestimmen. Der PDI ist ein Maß für die Breite einer Verteilung, wie z.B. einer Molmassen- oder Partikelgrößenverteilung [146]. Allgemein kann man sagen, dass eine eng verteilte Probe einen niedrigen PDI und eine breit verteilte Probe einen höheren PDI aufweist. Dies gilt sowohl für den PDI aus der Kumulantenanalyse der dynamischen Lichtstreuung (vgl. Kap. 2.4.4) als auch für den Polydispersitätsindex ( $Q$ ) aus der Polymerchemie [146].

$$Q = \frac{M_w}{M_n} = \frac{R_{Hw}}{R_{Hn}} \geq 1 \quad (\text{Gl. 22})$$

Dabei ist  $M_w$  die volumengewichtete,  $M_n$  die anzahlgewichtete mittlere Molmasse eines Analyten,  $R_{Hw}$  der volumengewichtete und  $R_{Hn}$  der anzahlgewichtete mittlere hydrodynamische Radius (vgl. Kap. 8.13, S. 129).

Monodisperse Proben enthalten nur absolut einheitliche, identische Partikelgrößen oder Molmassen und haben einen theoretischen Q-Wert von eins. Reale Proben hingegen, wie z.B. Eisenoxid-Nanopartikel-Dispersionen, sind stets polydispers im Hinblick auf ihre Partikelgröße. Je breiter eine Verteilung ist, desto stärker weichen Volumen- und Zahlenmittel voneinander ab. In der Volumenwichtung fallen größere Partikel stärker ins Gewicht, da das Volumen proportional zu Radius<sup>3</sup> ist (vgl. Anhang Gl. A 8 und Gl. A 9, S. 129). Je größer die Abweichung zwischen anzahl- und volumengewichteter Partikelgröße oder Molmasse ist, desto größer ist der Q-Wert und desto breiter ist die Verteilung [147].

### 2.4.7 Morphologie der Partikel - Formfaktor

Ein weiterer Parameter, der mittels A4F über die gesamte Partikelgrößenverteilung generiert werden kann, ist der Formfaktor. In der Polymerchemie ist der Formfaktor zur Beschreibung der Partikelform seit langem etabliert [145, 148]. Im nanopartikulären Bereich gewinnt der Formfaktor zur Beschreibung der Partikel-Morphologie zunehmend an Bedeutung [149-151]. Der Formfaktor ( $p$ , engl. shape factor) kann über das Verhältnis von Gyrationradius ( $R_G$ , vgl. Gl. 20) und hydrodynamischen Radius ( $R_H$ , vgl. Kap. 2.4.4) ermittelt werden:

$$p = \frac{R_G}{R_H} \quad (\text{Gl. 23})$$

Der Formfaktor, auch p-Verhältnis genannt, beschreibt die Morphologie der Partikel und ist charakteristisch für bestimmte geometrische Formen (Abb. 19) [152].

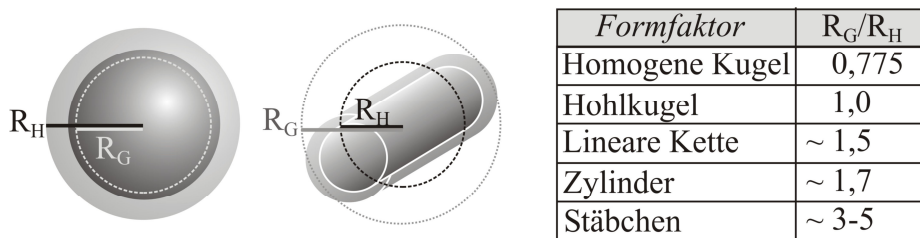


Abb. 19: Theoretische Formfaktoren für einige ausgewählte geometrische Formen [152].

### 3 Material und Methoden

Nach Herstellung der SPIO-Chargen (vgl. Kap. 3.1) wurde eine detaillierte Charakterisierung der physikochemischen Eigenschaften durchgeführt. Die Partikelgrößen und Partikelgrößenverteilungen der hergestellten Chargen wurden mittels asymmetrischen Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung (vgl. Kap. 3.2.4) charakterisiert. Die A4F wurde zur Untersuchung der Partikelgrößen und Verteilungen mit verschiedenen Detektoren gekoppelt (vgl. Kap. 2.4.3). Die Ergebnisse der gekoppelten Mehrwinkellichtstreuung (vgl. Kap. 3.2.3) und dynamischen Lichtstreuung wurden mit anderen Methoden wie dynamische Lichtstreuung „in-batch“ (vgl. Kap. 3.2.2), analytischer Ultrazentrifugation (AUZ vgl. Kap. 3.2.5), Transmissionselektronenmikroskopie (TEM vgl. Kap. 3.2.6) und Kleinwinkel-Röntgenstreuung (SAXS vgl. Kap. 3.2.7) verglichen. Zur Untersuchung der magnetischen Eigenschaften wurde mittels supraleitender Quanteninterferenzeinheit (SQUID vgl. Kap. 3.3.1) überprüft, ob sich die SPIO-Chargen superparamagnetisch verhalten und die Sättigungsmagnetisierungen wurden in Abhängigkeit von der Partikelgröße bestimmt. Die Suszeptibilitäten der hergestellten Formulierungen wurden mit Hilfe einer „Magnetic Susceptibility Balance“-Waage (vgl. Kap. 3.3.2) in Abhängigkeit von der Partikelgröße untersucht. Die substanzspezifischen  $R_1$ - und  $R_2$ -Relaxivitäten wurden spektroskopisch bei 1,41 Tesla (vgl. Kap. 3.3.3) und mit Hilfe der MRT-Bildgebung bei 1,5 Tesla (vgl. Kap. 3.3.4) untersucht. Nach der detaillierten Charakterisierung wurde die phagozytotische Aktivität (vgl. Kap. 3.4) und das *in vivo* Verhalten (vgl. Kap. 3.5) der hergestellten SPIO-Formulierungen in Abhängigkeit von der Partikelgröße untersucht.

Alle *in vitro* Charakterisierungsmethoden, wie die A4F mit den gekoppelten Detektoren, die SQUID-Messungen, die MRT-Phantomuntersuchung und die Zellkulturversuche, wurden für alle acht hergestellten Chargen durchgeführt. In Versuchen, bei denen keine pharmazeutische Qualität erforderlich ist, wurden zusätzlich 10 weitere Chargen untersucht (magnetische Suszeptibilität und  $R_1$ - und  $R_2$ -Relaxivitäten). Die vergleichenden Partikelgrößen-Messmethoden TEM, AUZ und SAXS wurden für vier ausgewählte SPIO-Chargen angewandt. Die *in vivo* Versuche wurden ebenfalls mit vier ausgesuchten Chargen durchgeführt.

### 3.1 Herstellung der SPIO-Fraktionen

#### 3.1.1 Synthese der SPIO-Rohdispersion

Verschiedene Synthesewege zur Herstellung Superparamagnetischer Eisenoxidpartikel (SPIOs) sind in vielen Patenten und in der Literatur ausführlich beschrieben [3, 153-162]. Die in dieser Arbeit verwendeten SPIO-Partikel wurden mit Hilfe einer wässrigen Synthese nach US Patent 4101435 (Meito Sangyo Kabushiki Kaisha, Japan) hergestellt [157]. Dabei handelt es sich um eine Einzugsynthese, bei der Fe(II)- und Fe(III)-Ionen (molares Verhältnis 1:2) in Gegenwart von wasserlöslichem Carboxydextran (10 - 25 vol %) durch Zugabe einer Base (1N Natriumhydroxid-Lösung) gefällt werden. Das verwendete Carboxydextran hat eine gewichtsgemittelte Molmasse von 3500 g/mol und eine anzahlgewichtete mittlere Molmasse von 2000 g/mol (Meito Sangyo, Japan, Nagoya). Die wässrige Synthese wurde in einer Rückflussapparatur bei 70–110 °C unter Stickstoffbegasung durchgeführt. Die Natriumhydroxid-Lösung wurde während des Herstellprozesses langsam mittels Tropftrichter zugetropft. Nach vollständiger Reaktion wurde das Reaktionsgemisch für weitere 30-60 min bei 110 °C unter Rückfluss gekocht. Anschließend wurde die Dispersion (pH 7,5 bis 9,5) auf Raumtemperatur abgekühlt und mit Salzsäure (1 N) auf pH 1-3 eingestellt. Im letzten Schritt wurde die Dispersion 24 Stunden gegen Aqua ad injectabilia dialysiert. Für die Dialyse wurden Membranen aus Celluloseester mit einer Ausschlussgröße von 3,5 kDa verwendet (z.B. Spectra/Por<sup>®</sup>, CE Float-A-Lyzer<sup>®</sup>, Spectrum Europe, Niederlande, Breda). Die rotbraune Suspension wurde anschließend bei 1500 x g (1000 rpm) 40 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde als Ausgangsmaterial für die magnetische Separation gesammelt.

#### 3.1.2 Herstellung der SPIO-Fraktionen mittels magnetischer Separation

Zur Herstellung von Partikelfraktionen mit unterschiedlichen Größen wurde die SPIO-Rohdispersion mit Hilfe von magnetischen Trennsäulen (MACS<sup>®</sup> Separation XS Columns, Miltenyi Biotec, Deutschland) in mehrere Fraktionen aufgetrennt. Für die magnetische Separation wurde ein CliniMACS<sup>®</sup> Cell Separation System (CliniMACS<sup>®</sup> Plus Instrument, Miltenyi Biotec, Deutschland) verwendet. Die magnetische Separation ist in der Literatur als Methode bereits etabliert [125, 163-165]. Entscheidende Prozessparameter während der magnetischen Separation sind dabei die Flussrate, das Magnetfeld und die Beladung der Säule (Abb. 20).

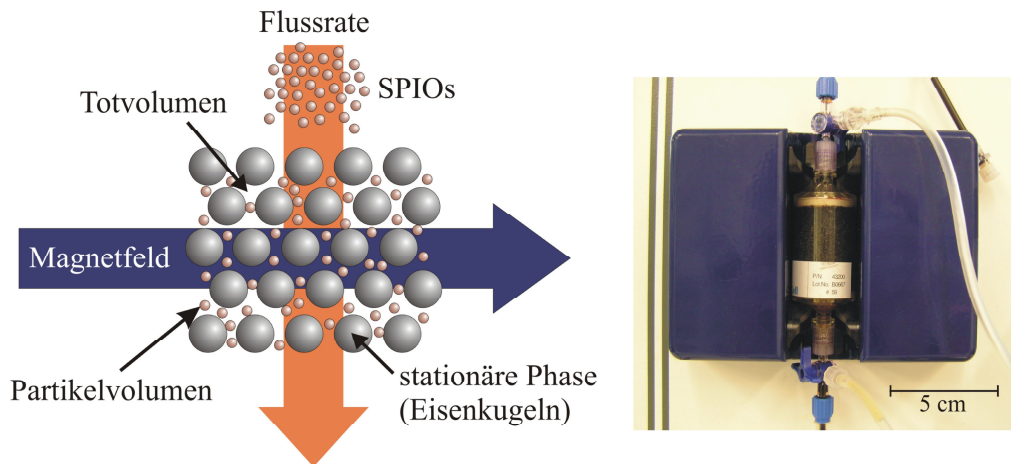


Abb. 20: Trennprinzip der magnetischen Separation (links) und seine praktische Umsetzung (rechts).

Das eingesetzte Magnetfeld (Magnetfeldstärke 1 Tesla) wurde mit Hilfe von zwei gegenüberliegenden Magneten realisiert (Abb. 20). Die Säule wurde vor der Trennung mit Aqua ad injectabilia gespült und anschließend 280 Sekunden bei einem Fluss von 1 ml/min mit SPIO-Rohdispersion beladen. Die Elution der beladenen Säule erfolgte mit Aqua ad injectabilia mit einem Fluss von 1 ml/min. Es wurden zehn Fraktionen in 50 ml Schritten gesammelt. Im Anschluss wurde das Magnetfeld auf 0,5 Tesla reduziert und es wurden fünf Fraktionen a 50 ml abgenommen. Nach dem Abschalten des Magnetfeldes wurden weitere fünf Fraktionen gesammelt. Anschließend wurde die Säule gesäubert (Aqua ad injectabilia, 2 ml/min für 20 min ohne Magnetfeld) und erneut für 280 Sekunden mit SPIO-Rohdispersionen beladen. Der Vorgang wurde ca. 100-mal wiederholt. Die gewonnenen Fraktionen wurden mit dynamischer Lichtstreuung (Kap. 3.2.2) analysiert und die Fraktionen mit ähnlichen hydrodynamischen Radien wurden entsprechend zusammengefasst.

Um die Pyrogenbelastung während des gesamten Herstellprozesses gering zu halten, wurde die magnetische Separation im Reinheitsklasse D Bereich unter einer Laminar Air Flow Anlage (LAF) durchgeführt. Das zur Herstellung eingesetzte Aqua ad injectabilia wurde 1 h vor dem Herstellprozess bei 80 °C entnommen und unter der LAF auf Raumtemperatur abgekühlt.

### 3.1.3 Ultrafiltration zur Einstellung des Eisengehaltes

Die SPIO-Fraktionen nach magnetischer Separation (vgl. Kap. 3.1.2) haben im Vergleich zum zugelassenen MRT-Kontrastmittel SHU 555 A einen niedrigen Eisengehalt. Zur Einstellung des Eisengehaltes wurde eine Ultrafiltration durchgeführt (Filtron, Inv. Nr.: 76236, cut off 10 kDa). Aufgrund des geringen Volumens wurde die Charge H (Zielgröße



85 nm) über eine kleinere Ultrafiltrationszelle aufkonzentriert (Filtron Stirred Cell System, cut off 10 kDa). Nach Ultrafiltration der SPIO-Fraktionen wurde der Eisengehalt der SPIO-Fraktionen mittels ICP-OES bestimmt.

### **3.1.4 Eisenbestimmung mit ICP-OES**

Der Eisengehalt der hergestellten SPIO-Chargen wurde mittels Optischer Emissionsspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES, Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry) bestimmt. Bei der ICP-OES werden nach Anregung von Atomen bestimmte charakteristische Banden im emittierten Linienspektrum analysiert. Im Vergleich zur komplexometrischen Eisenbestimmung mittels UV/VIS-Methode ist die ICP-OES wesentlich sensitiver (Faktor 100) und selektiver. Die ICP-OES ist eine etablierte, weit verbreitete Analysenmethode und wird unter anderem häufig in der Wasser- und Umweltanalytik eingesetzt. Darüber hinaus hat die Methode eine große Bedeutung aufgrund der guten Automatisierbarkeit und kurzen Analysenzeiten, was einen sehr hohen Probendurchsatz ermöglicht [166].

Für die Bestimmung des Eisengehaltes der SPIO-Chargen (acht Chargen, je  $n = 6$ ) wurden die Proben zuvor in 5%-iger Salpetersäure gelöst (zwei Stunden bei 60 °C, 14 Stunden bei Raumtemperatur). Jeder Probe wurde vor der Messung ein interner Standard zugesetzt (Yttrium Standard 10 ppm). Die Analyse wurde mit Hilfe einer IRIS Advantage ICP durchgeführt (Thermo Fisher Scientific Inc., USA, Waltham). Das Gerät hat eine Radiofrequenzleistung von 1150 W und erreicht Plasmatemperaturen von ca. 10000 K. Die vollständig gelösten Proben wurden mit Hilfe eines konzentrischen Meinhard-Zerstäubers in das Plasma eingebracht. Folgende Parameter wurden verwendet: Probenflussrate 1,5 ml/min, Zerstäubergasfluss 0,62 l/min, Plasmagasfluss 15 l/min und Hilfsgas 0,5 l/min. Die quantitative Auswertung erfolgte nach Kalibrierung mit bekannten Eisenstandards bei einer Wellenlänge von 259,94 nm.

## **3.2 Teilchengrößenanalytik**

### **3.2.1 Partikelgrößenstandards**

Die Polystyrol Größenstandards 20 nm, 50 nm und 100 nm wurden von Duke Scientific Corporation (Niederlande) bezogen und sind vom National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg) zertifiziert. Vor jeder Probenentnahme wurden die Standards 20 s bei Raumtemperatur in einem Ultraschallbad redispergiert (Bandelin Sonorex,

Maximalleistung 640 W). Zur Überprüfung der Richtigkeit der asymmetrischen Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung (A4F) wurde ein Partikelstandardgemisch aus den drei Standards hergestellt. Die Anteile der jeweiligen Standards wurden vorerst mit Hilfe von einzeln vermessenen Standards im Hinblick auf ihre Konzentrationen optimiert (DLS > 100 Datenpunkte, andere Detektoren Signal-Rausch-Verhältnis von 1 zu 6). Für die A4F-Trennung wurden 300 µL des 20 nm Partikel, 40 µL des 50 nm und 8 µL des 100 nm Standards mit 700 µL einer 0,2 %-igen FL-70<sup>®</sup>-Lösung (Postnova Analytics, Deutschland) verdünnt.

Zur Bestimmung der hydrodynamischen Größen wurden die Standards nicht als Gemisch, sondern einzeln mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung („in-batch“, Zetasizer Nano, Malvern Instruments, Worcestershire, UK) vermessen. Die Proben wurden analog redispergiert und mit Wasser bzw. Phosphatpuffer 1 zu 20 verdünnt (Puffer Tabletten, pH 7, Fisher Chemicals).

### **3.2.2 Dynamische Lichtstreuung und Zetapotential**

Das Prinzip der dynamischen Lichtstreuung (DLS) ist in Kapitel 2.4.4 beschrieben. Die DLS-Messungen („in-batch“) wurden mit Hilfe eines Zetasizer NanoSeries (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) durchgeführt. Die angegebenen Werte für die hydrodynamischen Durchmesser und Polydispersitäten wurden aus fünf unabhängigen Messungen mit jeweiliger Dreifachbestimmung (n = 3) ermittelt. Die Daten wurden mit Hilfe der integrierten Zetasizer Nano Software (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) unter Verwendung des CONTIN-Algorithmus ausgewertet [140].

Neben der Partikelgrößenbestimmung wurde mit dem Zetasizer NanoSeries (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) zusätzlich das *Zetapotential* der hergestellten SPIO-Chargen ermittelt. Das Zetapotential kann mit Hilfe der so genannten Laser-Doppler-Anemometrie (LDA) bestimmt werden [140, 167]. Bei der Laser-Doppler-Anemometrie wird die Wanderungsgeschwindigkeit von Partikeln im elektrischen Feld bestimmt, welche stark von der Oberflächenladung der Partikel abhängig ist. Mit Hilfe des Zetapotential können Voraussagen zur Stabilität von partikulären Systemen getroffen werden. Ist die Oberfläche der Partikel negativ oder positiv geladen, stoßen sich die Partikel in Lösung gegenseitig ab und es kommt zu einer elektrostatischen Stabilisierung.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Zetapotential der hergestellten SPIO-Chargen bei einem pH-Wert von 6,0 bestimmt. Die Proben wurden dazu mit Millipore Wasser 1:100 verdünnt und bei einer Leitfähigkeit von ca. 0,05 mS/cm gemessen. Es wurden sechs

Messungen mit jeweils 30 Einzelbestimmungen durchgeführt. Der Mittelwert der sechsfachen Bestimmung wurde als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Zur Auswertung wurde die Software: DTS Nano Software, Version 4.20 von Malvern Instruments (Worcestershire, UK) verwendet.

### **3.2.3 Mehrwinkellichtstreuung**

Die Theorie zur Mehrwinkellichtstreuung (engl. Multiangle Laser Light Scattering, MALLS) ist in Kapitel 2.4.5 bereits beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde ein MALLS-Detektor von Wyatt Technology Corp. (DAWN-DSP Laser Photometer, Santa Barbara, USA) verwendet. Das gestreute Licht wurde mit Hilfe von 16 Photodioden detektiert, welche um den eingestrahnten Laserstrahl ( $\lambda = 632,8 \text{ nm}$ ) angeordnet sind. Die Kalibrierungskonstante für den Photodetektor bei  $90^\circ$  wurde mit reinem Toluol (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) bestimmt. Das Toluol wurde, um partikuläre Verunreinigungen auszuschließen, vorher über einen Spritzenfilter (Anotop 10,  $0,02 \mu\text{m}$ , Whatmann GmbH, Deutschland) filtriert. Die Auswertung der Mehrwinkellichtstreuendaten wurde mit Hilfe der ASTRA 4.73.04 Software (Wyatt Technology Corp. Santa Barbara, CA, USA) durchgeführt. Als Modell für die Bestimmung der Gyrationradien der Eisenoxidpartikel-Fractionen wurde dabei das ASTRA Partikelmodul (Fit-Methode: polynomisches Rayleigh Verhältnis [ $R_\theta$ ]) verwendet.

### **3.2.4 Asymmetrische Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung**

Die theoretischen Grundlagen und das Trennprinzip der asymmetrischen Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung (A4F) sind ausführlich in Kapitel 2.4.1 beschrieben. Die A4F-Experimente wurden mit einer Anlage von Postnova Analytics GmbH (AF-2000 Focus System, Landsberg, Deutschland) durchgeführt. Der Aufbau der Anlage ist in Kapitel 2.4.3 (Abb. 18, S. 29) dargestellt. Ausgerüstet ist das System mit einem  $27,5 \text{ cm}$  langen Kanal. Für die in der Arbeit vermessenen Proben wurde eine Kanalhöhe von  $250 \mu\text{m}$  eingestellt ( $250 \mu\text{m}$  Spacer). Als Membran wurde eine Ultrafiltrationsmembran aus Celluloseacetat (Postnova Analytics, Deutschland) mit einer Ausschlussgröße von  $10 \text{ kDa}$  verwendet. Die A4F ist mit vier verschiedenen Detektoren gekoppelt: zwei Konzentrationsdetektoren (ein UV-Detektor [SPD-M20A Diode Array Detektor, Postnova Analytics, Landsberg, Deutschland] und ein Brechungsindex-Detektor [Optilab 903, Wyatt Technology Corp., Santa Barbara, USA]) sowie zwei Detektoren zur direkten Bestimmung der Molmassen (DAWN-DSP Laser

Photometer, Wyatt Technology Corp., Santa Barbara, USA) und Partikelgrößen (SLS und DLS-Detektor, PN 3000, Postnova Analytics, Deutschland). Als Eluent für die Trennung wurde eine 0,2 %-ige FL-70<sup>®</sup>-Lösung verwendet (Postnova Analytics, Deutschland). Dabei handelt es sich um ein Tensidgemisch, welches speziell für die Analytik von Partikeln entwickelt wurde. Der wässrige Eluent wurde vor der Verwendung durch 0,1 µm VacuCap<sup>®</sup> 90 Filtereinheiten (Pall Corporation, Deutschland) filtriert. Zwei in Reihe geschaltete Polytetrafluorethylene-Filter (0,1 µm, 13 mm, Postnova Analytics, Deutschland) wurden zwischen die Pumpen und den Kanal geschaltet, um Hintergrundsignale zusätzlich zu minimieren.

Die zu untersuchenden Proben wurden manuell über eine 19,6 µL Dosierschleife injiziert. Bei der Trennung wurden die folgenden Messparameter verwendet: 2 min Zeit für die Fokussierung der Probe mit 0,2 ml/min laminarer Pumpenflussrate, 1,15 ml/min Fokussierflussrate und 1,0 ml/min Querflussrate. Während der Elution wurde eine Flussrate von 1,35 ml/min bei einem Querfluss von 1,0 ml/min verwendet. Resultierende Detektorflussrate war während der Separation 0,35 ml/min. Für die Auswertung wurde die Discovery32<sup>™</sup> Software (Postnova Analytics, Deutschland) verwendet. Der Mittelwert des hydrodynamischen Radius wurde mit Hilfe der gemessenen realen Teilchengrößenverteilung des statischen Lichtstreuendetektors (90°) errechnet. Dabei wurde der kumulative Wert bei 50 % der Verteilung errechnet (Kumulatenmethode). Die Gesamtanalysenzeit betrug in Abhängigkeit von der Partikelgröße zwischen 20 und 60 min.

### ***3.2.5 Analytische Ultrazentrifugation***

Die analytische Ultrazentrifugation (AUZ) untersucht die Bewegung oder Konzentrationsverteilung von gelösten Makromolekülen oder dispergierten Teilchen unter dem Einfluss starker Zentrifugalkräfte [168, 169]. Beispielhaft ist eine AUZ-Messung mit typischen Konzentrationsprofilen im Anhang in Abb. A 2 (S. 125) dargestellt.

Für die Analyse wurde eine AUZ (Gerätetyp: Optima XL-A/XL-I) von der Firma Beckman Coulter, Inc. (Fullerton, USA) verwendet. Zur Bestimmung der Teilchengrößenverteilung wurde das Verfahren der Dichtevariation eingesetzt. Dazu werden die zu untersuchenden Partikel in zwei Lösemitteln unterschiedlicher Dichte analysiert und die jeweilige Sedimentationsgeschwindigkeit bestimmt. Die Proben wurden in Wasser (0,99704 g/ml) und Deuteriumoxid (99 %-iges D<sub>2</sub>O: 1,1047 g/ml oder 90 %-iges D<sub>2</sub>O: 1,09393 g/ml) vermessen. Folgende Verdünnungen wurden verwendet: Charge A 1:40,

C 1:20, E 1:40 und H 1:28. Alle Analysen wurden bei 20 °C (293 K) durchgeführt. Die bei der Analyse verwendete Drehzahl wurde in Abhängigkeit von der Partikelgröße und der Dichte des Mediums gewählt (Tab. 4).

Tab. 4: Verwendete Umdrehungszahlen für die AUZ-Untersuchungen.

Charge	AUZ Wasser	AUZ Deuteriumoxid
Charge A	15000 rpm <sup>1</sup>	20000 rpm
Charge C	10000 rpm	15000 rpm <sup>2</sup>
Charge E	5000 rpm	8000 rpm
Charge H	5000 rpm	8000 rpm <sup>2</sup>
1) Rotor 100 mm, 15000 rpm entsprechen 25200 g		
2) Messung in 90 %-igem Deuteriumoxid		

Für die Detektion der Sedimentation wurde eine Rayleigh-Interferenzoptik (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, USA) verwendet. Die radiale Auflösung des Gerätes beträgt 0,01 mm, die Wellenlängenauflösung 1 nm.

### 3.2.6 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ist eine etablierte Methode zur Abbildung von Objekten. Im Gegensatz zur Lichtmikroskopie können dabei mit Hilfe von Elektronenstrahlen auch nanoskalige Systeme mikroskopisch untersucht werden [170]. Mit dem verwendeten TEM kann eine Punktauflösung von 0,172 nm erreicht werden.

Für die TEM-Messungen wurden die Eisenoxidpartikel-Fractionen 1 zu 2000 mit einem Wasser / Ethylenglycol-Gemisch (50/50 % v/v) verdünnt. Ein Tropfen der verdünnten Lösung wurde auf das Probengitter (Kohlefilm-TEM-Grid, Formvar/Kohle-Film, 200 mesh, 3,05 mm Durchmesser, Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) gegeben und für fünf Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Der verbliebene Feuchtigkeitsfilm wurde vorsichtig mit einem Papiertuch abgetupft und die Probe wurde erneut für fünf Minuten getrocknet. Die Messungen wurden an einem Philips CM 300 UT (Elektronenstrahl 300 kV, Philips GmbH, Niederlande) durchgeführt. Zur Bestimmung der Kristallit- und Aggregatgrößen der hergestellten Eisenoxid-Nanopartikel wurden die TEM-Bilder mit Hilfe einer speziellen Software ausgewertet (JMicroVision v1.27). Dazu wurden mittels eindimensionaler Kalibrierung anhand der vorhandenen Größenskala für die Chargen A, C, E sowie H die Kristallite und Aggregate als Distanzen im Bild ausgemessen und ein anzahlgewichteter

Mittelwert bestimmt (vgl. Kap. 8.13). Die Kristallit- und Aggregatgrößen wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben.

### 3.2.7 Kleinwinkel-Röntgenstreuung

Die Kleinwinkel-Röntgenstreuung (SAXS) ist eine der Standardmethoden zur Strukturaufklärung von Kristalliten und Nanopartikeln [150, 171]. Bei der Kleinwinkel-Röntgenstreuung wird die Beugung von Röntgenstrahlung an geordneten Strukturen ausgenutzt. Die Bragg-Gleichung ist dabei die zugrunde liegende mathematische Beziehung zur Ermittlung der Struktur aus dem erhaltenen Beugungsbild (vgl. Gl. 24). Der Streuvektor  $q$  ist abhängig vom Streuwinkel  $\theta$  (Winkel zwischen Röntgenstrahl und Gitterebene) sowie von der Wellenlänge der Röntgenstrahlung ( $\lambda$ ).

$$|q| = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta \quad (\text{Gl. 24})$$

In der vorliegenden Arbeit wurde die SAXS neben anderen Methoden zur Strukturaufklärung der hergestellten SPIO-Chargen eingesetzt. Für die Größen- und Formbestimmung der SPIO-Partikel wurden Messungen an einer Kratky Röntgenkleinwinkelkamera (SAXSess, Anton Paar, Österreich) bei  $25 \pm 1$  °C durchgeführt. Die verwendete CCD-Kamera (SAXSess, Anton Paar, Österreich CCD:  $\Delta q = 0,0037 \text{ nm}^{-1}$ ,  $24 \mu\text{m}$  Pixelgröße) wurde während der Messung konstant bei  $-40$  °C gehalten. Der Abstand zwischen Probe und Detektor im SAXSess beträgt nur  $0,309 \text{ m}$ , was auch die Untersuchung von Proben mit geringer Streuintensität ermöglicht. Von der gemessenen Streuintensität wurde als Basislinie die Streuintensität einer wassergefüllten Kapillare abgezogen.

Bei den durchgeführten Messungen wurde Röntgenstrahlung mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 0,1542 \text{ nm}$  verwendet. Die Datenreduktion und -entschmierung erfolgte mit der Software SAXSquant (Anton Paar, Österreich). Die entfaltenen, reduzierten Streukurven wurden über den Vergleich mit Streumodellfunktionen mit Hilfe einer auf IGOR Pro basierenden Software („SANS Analysis v.3“, Software Paket von NIST, USA) ausgewertet [172]. Aufgrund der hohen Streukraft der Partikel wurden die Proben 1:100 (v/v) mit Wasser verdünnt.

Zur Größenbestimmung der Nanopartikel ist es üblich, modellierte Streukurven an die gemessenen Streukurven anzupassen. Eine geeignete Übersicht zum Verfahren stammt z.B. von Pedersen [173]. Die vermessenen SPIO-Chargen wurden unter der Annahme ausgewertet, dass die Größenverteilung der Proben annähernd einer Gauß-Verteilung folgen (vgl. Anhang

Kap. 8.4, S. 124). Um vergleichbare Aussagen für die Partikelgrößen zu erhalten, wurden die Polydispersitäten in den Modellrechnungen mit 0,2 als fester Wert eingesetzt. Des Weiteren wurde für die Auswertung der SPIO-Chargen eine kugelförmige Gestalt der Nanopartikel in Dispersion angenommen (Gl. A 5 bis Gl. A 7, S. 124).

### **3.3 Magnetische Eigenschaften**

#### **3.3.1 *Supraleitende Quanteninterferenzeinheit***

Das Messprinzip der supraleitenden Quanteninterferenzeinheit (engl. Superconducting Quantum Interference Device, SQUID) wird ausführlich in [174] beschrieben. Ein SQUID ist ein Sensor zur präzisen Messung von extrem geringen Magnetfeldänderungen. Die Funktionsweise eines SQUID basiert auf dem Effekt der Flussquantisierung in supraleitenden Ringen und dem Josephson-Effekt [175]. Durch makroskopische Quanteninterferenz ist der Josephson-Strom zwischen zwei parallel geschalteten Josephson-Kontakten bereits durch sehr kleine Magnetfelder beeinflussbar. In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe der SQUID-Messungen überprüft, ob die SPIO-Chargen bei Raumtemperatur ein superparamagnetisches Verhalten zeigen. Darüber hinaus wurden aus den Daten die Sättigungsmagnetisierungen errechnet. Die SQUID-Messungen wurden an der Universität Leipzig, Fakultät für Physik und Geowissenschaften (Abt.: Supraleitung und Magnetismus) mit einem SQUID-Magnetometer (SQUID MPMS-7, Quantum Design, San Diego, USA) durchgeführt. Das SQUID-Magnetometer verwendet die RSO-Technik (reciprocal sample option [176]) und erreicht eine Auflösung von  $10^{-7}$  emu (emu = electro magnetic unit).

Ziel war es, die SPIO-Chargen im wässrigen Zustand zu messen. Um dies zu ermöglichen, wurden spezielle tropfenförmige Glasküvetten mit einem Durchmesser von 5 mm und einer Länge von ca. 15 mm angefertigt. Die Küvetten wurden nach dem Einwiegen der Probe an der Oberseite mittels Brenner zugeschmolzen, ohne dass Flüssigkeit verdampfen konnte. Für die Analysen wurden 50,00 mg einer 50-millimolaren Lösung an der Analysenwaage eingewogen. Die Hysteresekurven wurden bei einer fixierten Temperatur von 300 Kelvin und einer Feldstärke von -10 bis +10 kOe aufgenommen. Alle Messungen wurden in Längsrichtung zur Küvette in einem parallelem Magnetfeld durchgeführt, da diese Orientierung den diamagnetischen Anteil des Hintergrundes (Glasküvette) gering hält und somit die kleinen superparamagnetischen Effekte der Eisenoxidpartikel besser zu messen sind (vgl. Abb. A 3, S. 126).

### 3.3.2 *Magnetische Suszeptibilität*

Die theoretischen Grundlagen der magnetischen Suszeptibilität sind in Kapitel 2.2.1 beschrieben. Zur Bestimmung der magnetischen Suszeptibilitäten der hergestellten Chargen wurde eine so genannte „Magnetic Susceptibility Balance“-Waage (MSB-Waage) verwendet. Das Funktionsprinzip der MSB-Waage beruht auf der Tatsache, dass in einem Magnetfeld paramagnetische Stoffe eine Annäherung der Feldlinien bewirken, während diamagnetische Stoffe zu einer Spreizung der Feldlinien führen (vgl. Abb. 4, S. 9). Aus der Balance zwischen Änderung der Schwerkraft und Magnetfeldänderungskraft kann die Massensuszeptibilität ( $\chi_{\text{mass}}$ ) bestimmt werden [177, 178]. Zur Bestimmung der magnetischen Suszeptibilitäten der hergestellten SPIO-Chargen wurde eine MSB-Waage von Sherwood Scientific Ltd. (Magway Magnetic Susceptibility Balances, Oxford, UK) verwendet. Die SPIO-Chargen wurden dazu mit Aqua ad injectabilia auf eine Konzentration von 50 mmol/l Eisen eingestellt. Es wurde für jede Charge eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

### 3.3.3 *Relaxivitätsmessungen*

Die Relaxationszeiten ( $T_1$  und  $T_2$ ) der Protonen in Wasser und wässrigen Lösungen werden durch die Gegenwart von Kontrastmitteln verkürzt (vgl. Kap. 2.1.2). Die Relaxationszeiten können bei verschiedenen magnetischen Feldstärken und mit verschiedenen Methoden (spektroskopisch oder mit Hilfe der MRT-Bildgebung) bestimmt werden. Die Relaxationszeiten ( $T_1$  und  $T_2$ ) der Protonen in Wasser in Gegenwart der hergestellten SPIO Formulierungen wurden bei einer Feldstärke von 1,41 Tesla (60 MHz) mit einem MiniSpec mq 60 Spektrometer (Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Deutschland) bestimmt. Aus dem linearen Zusammenhang zwischen der Konzentration eines Kontrastmittels und dessen Einfluss auf die Relaxationsrate kann die Relaxivität errechnet werden (vgl. Gl. 3; S. 8).

Für die  $T_1$ -Messungen wurde eine Inversion Recovery Sequenz (IR-Sequenz) verwendet (Spin-Echo-Sequenz mit vorgeschaltetem  $180^\circ$  Impuls:  $180^\circ$ - $\tau_1$ - $90^\circ$ - $\tau_2$ -Akquisition, mit variablem  $\tau_1$ , 8 Datenpunkte, je  $n = 4$ ). Die Verzögerung zwischen den Messungen, der so genannte RD-Wert (Relaxation Decay), wurde auf die fünffache  $T_1$ -Zeit festgelegt. Für die  $T_2$ -Messungen wurde folgende Spin-Echo Sequenz verwendet: Carr-Purcell-Meiboom-Gill Sequenz (CPMG-Sequenz):  $90^\circ$ - $t$ - $[(180^\circ$ - $2 t$ - $d$ - $180^\circ$ - $t$  Acq- $t]$  ( $d = 0$ - $20$ ,  $n > 200$  Datenpunkte, je  $n = 4$ , Verzögerung zwischen den Messungen fünf mal  $T_1$ -Zeit). Die Relaxivitäten der hergestellten Chargen wurden aus der Steigung der Relaxationsrate zur Konzentration des Kontrastmittels bestimmt (vgl. Gl. 3). Die verdünnten



Lösungen der SPIO-Formulierungen (je 200  $\mu\text{L}$ ) wurden in Glasküvetten (MQ-TUB7.5/180 mm Länge, Bruker Optics GmbH, Deutschland, Ettlingen) vermessen. Alle Messungen wurden bei 40 °C durchgeführt. Die Proben wurden in einem Wasserbad (JulaboU3, JULABO Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland) auf 40 °C vortemperiert.

### **3.3.4 Phantom-Messung der SPIO-Formulierungen**

Zur unabhängigen Bestätigung der spektroskopischen Relaxivitätsmessungen (Kap. 3.3.3) wurden die  $T_2$ -Relaxivitäten zusätzlich mit einem bildgebenden Verfahren untersucht. Dazu wurde ein Phantom an einem klinischen Scanner (Avanto Magnetom, Siemens AG, Erlangen, Deutschland) bei 1,5 Tesla vermessen. Die hergestellten SPIO-Chargen wurden bei einer Konzentration von 0,1 mmol Fe/l luftblasenfrei in 10 ml Falcons abgefüllt. Zur Minimierung des Hintergrundes wurden die Falcon Röhrchen in einen wassergefüllten Behälter gestellt. Das Phantom wurde im Spulenzentrum einer humanen Kopfspule (Head, USA Instruments Inc., Aurora, USA) platziert. Für die Messung wurde eine  $T_2$ -gewichtete Spin-Echo-Sequenz mit transversaler Schichtausrichtung verwendet. Es wurde mit einer Schichtdicke von 7,0 mm und einem Flipwinkel von 150° gemessen. Die Repetitionszeit (TR) betrug 4340 ms und die Echozeit (TE) 184 ms. Die Gesamtakquisitionszeit der verwendeten Sequenzen betrug 7 min und 2 s.

## **3.4 Zellkultur-Untersuchungen**

### **3.4.1 Kultivierung der P388-Zellen**

Für die *in vitro* Zellversuche wurde eine makrophagenähnliche Zelllinie P388D1 (IL-1) verwendet. Die P388-Zellen wurden von der American type culture collection (ATCC<sup>®</sup>, Wesel, Deutschland) bezogen. Die Zellen wurden in RPMI 1640 Medium von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) unter Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland), 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % Pyruvat und HEPES (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) kultiviert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem mit 5 % Kohlendioxid begastem Brutschrank (Nuaire US Auto Flow, INTEGRA Bioscience GmbH, Deutschland) bei 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit. Das Kulturmedium wurde alle zwei bis drei Tage erneuert. Alle vier bis fünf Tage wurde die Zellsuspension 1:8 bis 1:10 verdünnt. Zur Ablösung der adhärennten Zellen wurde einmal mit PBS(-) (Phosphat Buffer System, Gibco DPBS 1x, (-)  $\text{CaCl}_2$ , (-)  $\text{MgCl}_2$ , Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) gewaschen und mit 1 ml Trypsin (0,05 % Trypsin / 0,02 % EDTA Lösung, Invitrogen,

Karlsruhe, Deutschland) für 3 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in 10 ml Medium aufgenommen und für fünf Minuten bei 1000 rpm (Centrifuge 5810R, Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 8 bis 10 ml Medium aufgenommen. Es wurde 1 ml der Zellsuspension ( $\sim 5 \cdot 10^5$  Zellen/ml) in Kulturflaschen (mittlere Größe, Fläche 75 cm<sup>2</sup>) ausgesät. Die Zellzahl wurde lichtmikroskopisch (Axiovert10, Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland) in einer Neubauer-Zählkammer oder mittels CASY<sup>®</sup> 1 (Cell Counter and Analyser System, Typ: TTC, Schärfe System GmbH, Deutschland, Reutlingen) bestimmt.

Alle durchgeführten Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Cleanbanch (GELAIRE<sup>®</sup> BSB4A, Flow Laboratories, USA) durchgeführt. Die eingesetzten Materialien und Geräte wurden vor Benutzung autoklaviert (Autoklav, Fedegari AUTOCLAVI SPA, Typ: FOB/3, IBS INTEGRA Bioscience GmbH, Fernwald, Deutschland).

### **3.4.2 Lichtmikroskopische Aufnahme und Färbung der P388-Zellen**

Zum lichtmikroskopischen Nachweis von Eisen in den Zellen wurden P388-Zellen verwendet (vgl. Kap. 3.4.1). Ausgesät wurden die P388-Zellen auf Objektträgern mit einer Inkubationskammer (Lab Tek<sup>®</sup> II Chamber Slides<sup>™</sup> System, Nalge Nunc International Corp., Naperville, USA). Die Zelldichte bei der Aussaat betrug  $5,0 \cdot 10^5$  Zellen/Kammer. Nach 48 Stunden bei 37 °C im Brutschrank (Nuair US Auto Flow, INTEGRA Bioscience GmbH, Deutschland) wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden mit je 2 ml SPIO-Formulierung (300 µmol Fe/l) für eine Stunde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach Inkubation wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen wurden dreimal mit kaltem PBS(+) (Gibco DPBS 1x, (+) CaCl<sub>2</sub>, (+) MgCl<sub>2</sub>, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) gewaschen. Die gewaschenen Zellen wurden 15 min bei 4 °C mit frisch hergestellter Paraformaldehyd-Lösung (4 %-ige, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) fixiert und erneut mit PBS(+) gewaschen. Das in die Zellen aufgenommene Eisen wurde mit Hilfe einer Berliner Blau Färbung nachgewiesen. Dazu wurde eine Salzsäure Lösung (1,2 mmol/l) und eine 4 %-ige Kalium-Ferrocyanid Lösung zu gleichen Teilen gemischt und die Zellen wurden auf dem Objektträger für 10 min bei Raumtemperatur angefärbt (ACCUSTAIN<sup>®</sup>, Eisenfarbstoff, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland). Nach der Färbung wurden die Zellen zweimal mit Millipore Wasser gewaschen. Für die Gegenfärbung wurden die Zellen für 30 s mit Kernechtrot-Aluminiumsulfatlösung (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland) inkubiert und anschließend dreimal mit Millipore Wasser gewaschen. Nach dem Entfernen der

Inkubationskammer mittels Trennvorrichtung (enthalten in Lab Tek<sup>®</sup> II Chamber Slides<sup>™</sup> System, Nalge Nunc International Corp., USA, Naperville) wurden die Objektträger mit einem wässrigen, permanenten Deckmedium (Dako Cytomation UltraMount, DakoDeutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) eingedeckt. Es wurden 24 x 60 mm Deckgläschen (Menzel-Gläser, Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland) verwendet.

Für die lichtmikroskopischen Aufnahmen wurde ein AxioImager Z1 Mikroskop mit der Software von AxioVision Version 4.5 von Carl Zeiss MicroImaging GmbH (Göttingen, Deutschland) verwendet. Als Lichtquelle wurde eine Quecksilberdampfampe benutzt (VSG HBO 100, LEJ, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland). Es wurde ein Immersionsobjektiv (Ph3 Plan-APOCHROMAT 63 x 71.4 Oil) mit 63-facher Vergrößerung verwendet. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einer 13 Megapixelkamera (AxioCamHRc, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland) aufgenommen.

### ***3.4.3 Quantitative Eisenbestimmung in P388-Zellen nach Phagozytose***

Der Eisengehalt in P388-Zellen nach Phagozytose der SPIO-Chargen wurde nicht mittels ICP-OES bestimmt. Denn organische Materialien können die Messung stören und es müsste vorab ein Ausschluss der Probe erfolgen. Alternativ wurde der Eisengehalt über eine komplexometrische Phenanthrolinfärbung bestimmt (vgl. Anhang 8.11, S. 128). Für die Untersuchung wurden 6 well-Platten (Zellkultur Testplatten 6, TPP Europe, Trasadingen, Schweiz) verwendet. Die P388-Zellen wurden mit einer Dichte von  $3,0 \cdot 10^5$  Zellen/well ausgesät (Neubauer-Zählkammer) und 48 Stunden bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Für die Inkubation der Zellen wurden die SPIO-Formulierungen in PBS(-) frisch auf eine Konzentration von 300 µmol Fe/l eingestellt und je 1 ml pro well vorsichtig auf die Zellen gegeben. Nach einstündiger Inkubation im Brutschrank (37 °C) wurde die überstehende Lösung abgesaugt und die Zellen mit 1 ml PBS (-) versetzt. Mit einem Zellschaber (Disposable Cell Scraper, 40 cm, Greiner Bio-One GmbH, Solingen, Deutschland) wurden die Zellen vorsichtig von der Platte gekratzt und in 10 ml-Falcons überführt. Anschließend wurde dreimal mit je 6 ml kaltem PBS (+) gewaschen. Dazu wurde die Zellsuspension für je 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert und das Zellpellet anschließend wieder in 6 ml PBS (+) resuspendiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Zellpellet in 1 ml PBS (+) aufgenommen, in 1,7 ml Mikrozentrifugen-Gefäße überführt (SafeSeal Microcentrifuge Tubes, Sorenson BioScience Inc., Utah, USA) und die Zellzahl bestimmt (CASY<sup>®</sup>, Schärfe

System GmbH, Reutlingen, Deutschland). Für die Phenanthrolinfärbung wurde die Zellsuspension 10 min bei 1000 rpm (Centrifuge 5417R, Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet mit 10 µL konzentrierter Salzsäure (37 %-ig), 170 µL PBS (+) und 20 µL Triton 100 (10 %) versetzt. Zum Herauslösen des Eisens aus den Zellen wurde das Gemisch 14 Stunden bei 60 °C im Schüttler (Thermomixer comfort, Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) aufgeschlossen. Anschließend wurden die Proben 10 min bei höchster Drehzahl (16400 rpm) zentrifugiert und der Überstand in neue Mikrozentrifugen-Gefäße überführt (200 µL). Für die Kalibrierung wurden je 200 µL einer 10, 20, 40, 90, 180, und 360 µmol Fe/l Eisenstandardlösung in weitere Mikrozentrifugen-Gefäße pipettiert. Die Proben- und Standardlösungen wurden mit je 100 µL Hydroxylaminlösung (10 %, m/V) und 700 µL Phenanthrolinhydrochlorid-Reagenz (vgl. Kap. 8.11) versetzt. Nach 3 Stunden bei Raumtemperatur wurden die Lösungen mittels Photometer (UVICON 933, Double Beam UV/VIS Photometer, KONTRON Instruments GmbH, Düsseldorf) bei 510 nm vermessen. Anhand der Eisenstandardkalibrierung wurde der Eisengehalt in den Proben bestimmt.

#### **3.4.4 MRT-Phantom-Messung mit SPIO-Partikeln beladener P388-Zellen**

Die quantitative Eisenaufnahme in P388-Zellen durch Phagozytose von SPIO-Partikeln wurde zusätzlich mit einer bildgebenden Methode untersucht. Dazu wurden die P388-Zellen analog Kapitel 3.4.3 mit 300 µM SPIO-Formulierung für 60 min bei 37 °C inkubiert und dreimal mit PBS (+) gewaschen. Nach dem letzten Waschschritt wurde das Zellpellet für 15 min in 1 ml 4 %-iger PBS gepufferter Paraformaldehyd-Lösung (PFA reinst, Merck, Darmstadt, Deutschland) bei 4 °C fixiert. Die fixierten Zellen wurden für die Untersuchung im MRT in 1 %-igem Agarosegel eingebettet (Agarose MEE0, Rotigalose<sup>®</sup> für die Elektrophorese, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland). Für die Herstellung des Gels wurden 200 ml 4 %-iger Paraformaldehyd-Lösung vorsichtig gerührt und die Agarose wurde nach und nach auf die Oberfläche gestreut. Nach der Zugabe wurde die trübe Suspension für eine Stunde im Abzug auf 120 °C erhitzt. Das nun klare Gel wurde auf ca. 60 °C abgekühlt, in eine spezielle Gelplatte mit Aussparungen gegossen (spezielle Anfertigung für Phantom-Messungen im MRT von der Feinwerkstatt der Bayer Schering Pharma AG) und fünf Stunden im Kühlschrank bei 4 °C ausgehärtet. Die Zellen wurden auf eine Zelldichte von  $5 \cdot 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Die Zellsuspension wurde für 15 min bei 1000 rpm zentrifugiert (Centrifuge 5417R, Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) und das Zellpellet

wurde in 1 %-igem Agarosegel (60 °C) resuspendiert. Anschließend wurden jeweils 200 µL der Zell-Gel-Suspension in die Aussparungen des Gels pipettiert.

Das Gel-Phantom wurde mittels Magnetresonanztomographie bei 3,0 Tesla (Magnetom Allegra syngo MR 2004A, Siemens AG, Erlangen, Deutschland) vermessen. Für die Messung wurde eine T<sub>2</sub>-gewichtete Spinechosequenz verwendet. Das Gel-Phantom wurde im Spulenzentrum einer humanen Handgelenksspule platziert (CP Wrist OH 44202, USA Instruments Inc., Aurora, USA) und es wurde in transversaler und koronarer Schichtausrichtung gemessen (transversal ausgewertet). Die Schichtdicke in koronarer Ausrichtung betrug 6 mm und in transversaler Ausrichtung 4,5 mm. Für beide Ausrichtungen wurde eine Repetitionszeit (TR) von 4340 ms und eine Echozeit (TE) von 214 ms verwendet. Die Gesamtakquisitionszeit der beiden Sequenzen betrug 15 min und 9 s. Zur Quantifizierung der Signaländerung im MRT wurde die relative Signaländerung ausgewertet:

$$rel.Signaländerung(\%) = \frac{SI_{post} - SI_{prä}}{SI_{prä}} \cdot 100 \quad (\text{Gl. 26})$$

Dabei gibt  $SI_{prä}$  die Signalintensität vor und  $SI_{post}$  die Signalintensität nach Kontrastmittelgabe an.

### **3.5 In vivo Charakterisierung**

#### **3.5.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen**

Die Untersuchungen zur Pharmakokinetik und -dynamik (Halbwertszeiten in Leber und Blut) der verschiedenen SPIO-Chargen wurden an Ratten untersucht. Als Versuchstiere wurden Han-Wista-Ratten (CrI:WI) (weiblich; 200-250g) verwendet. Alle Versuchstiere wurden von Charles River bezogen (Sulzfeld, Deutschland). Die Tiere wurden bei einer Temperatur von 22 °C und einem Tag/Nacht Rhythmus von 12 Stunden unter standardisierten Laborbedingungen gehalten. Die Han-Wista-Ratten erhielten ein Standardfutter (Standard ssniff R/M-H, ssniff Spezialdiät GmbH, Soest, Deutschland), sowie Trinkwasser ad libitum. Die Tiere wurden hinsichtlich ihrer Haltung und Tötung gemäß der §§2, 5 und 6 des Deutschen Tierschutzgesetzes gehalten und behandelt.

#### **3.5.2 Inhalationsnarkose mit Isofluran**

In Vorbereitung für die MRT-Untersuchungen wurden die Tiere in einer vorgefluteten Inhalationskammer mit einem Gasgemisch aus Isofluran (4,0 Vol %, (Isofluran-Baxter, Baxter

Deutschland GmbH, Unterschleißheim), Lachgas (0,8 l/min) und Sauerstoff (0,5 l/min) narkotisiert. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurden die Tiere während der MRT-Untersuchung über eine Narkoseeinheit mit Inhalationsmaske (Draeger Titus mit Draeger Isofluran Vapor 2000, Draeger, Lübeck) mit einem Gasgemisch aus Isofluran (1,5 Vol %), Lachgas (0,8 l/min) und Sauerstoff (1,2 l/min) versorgt. Um eine Unterkühlung der Versuchstiere während der MRT-Untersuchung zu verhindern wurden die Tiere auf einer, mittels Wasserbad, beheizten Liege positioniert (38 °C, Julabo5A, JULABO Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland).

### **3.5.3 Injektionsnarkose Xylazin/Ketamin**

Xylazin (Rompun® 2 %-ige Injektionslösung, 20 mg/ml, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) und Ketamin (Ketavet® Injektionslösung, 100 mg/ml, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) wurden in einem Mischungsverhältnis von 1:2 intraperitoneal mit einer Dosierung von 1 ml/kg Körpergewicht appliziert (gewichtsadaptiert).

### **3.5.4 Bestimmung der Bluthalbwertszeiten bei der Ratte**

Die Bluthalbwertszeiten von vier der hergestellten SPIO-Chargen (n = 2 pro Gruppe, insgesamt 8 Tiere) und von Resovist (n = 2) wurde mittels Magnetresonanztomographie bestimmt. Dazu wurde ein 3 Tesla Magnetresonanztomograph (MAGNETOM Allegra syngo, Siemens AG, Erlangen, Deutschland) verwendet.

In Vorbereitung der MRT-Untersuchung wurden die Tiere mittels Inhalationsnarkose narkotisiert (vgl. Kap. 3.5.2). Die zu untersuchenden Kontrastmittelchargen wurde über eine Flügelkanüle (Butterfly-Kanüle 25G, B. Braun AG, Melsungen) mit jeweils gleicher Geschwindigkeit i.v. in die Schwanzvene (V. coccygica) appliziert. Die Dosierung betrug 50-100 µmol Fe/kg Körpergewicht (Charge A, 20 nm 50 µmol Fe/kg KG, Charge C, E und H 100 µmol Fe/kg KG). Für die Messung wurde eine Handgelenksspule (CP Wrist OH 44202, USA Instruments Inc., Aurora, USA) verwendet. Für die Untersuchung wurden die Tiere mit Heftpflaster (Silkafix®, 2,5 cm x 5 m, Lohmann Rauscher International GmbH & Co, Deutschland, Neuwied) auf einer speziell angefertigten, halbrunden Liege aus Plexiglas fixiert. Es wurde eine T<sub>2</sub>\*-gewichtete Gradientenechosequenz mit transversaler Schichtausrichtung, acht Mittelungen und 2 mm Schichtdicke verwendet. Die Repetitionszeit (TR) betrug 90 ms und es wurde mit einer Echozeit (TE) von 30 ms gemessen. Es wurde ein Flipwinkel von 20° verwendet und eine Basisauflösung von 640 erreicht. Die Sequenz nimmt

alle 2 min 49 s ein Bild auf und generiert insgesamt 50 Scans. Die Gesamtaquisitionszeit der Sequenz betrug 2 Stunden und 31 min. Aus der Signaländerung im Nierenkortex vor ( $SI_{prä}$ ) und nach Kontrastmittelgabe ( $SI_{post}$ ) wurde entsprechend einem Einkompartimentmodell (Reaktionskinetik erster Ordnung) die Bluthalbwertszeit errechnet. Die Signaländerung wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Signaländerung} = \ln(SI_{prä} / SI_{post}) \quad (\text{Gl. 27})$$

### 3.5.5 Bestimmung der Leberhalbwertszeiten bei der Ratte

Die Leberhalbwertszeiten wurden von vier der SPIO-Chargen ( $n = 3$  pro Gruppe, insgesamt 12 Tiere) und von SHU 555 A ( $n = 3$ ) mittels MRT-Methode bestimmt. Dazu wurde ebenfalls der 3 Tesla Magnetresonanztomograph (MAGNETOM Allegra syngo, Siemens AG, Erlangen, Deutschland) verwendet. Zur Bestimmung der Leberhalbwertszeit wurden die Tiere mittels Inhalationsnarkose narkotisiert (vgl. Kap. 3.5.2). Die hergestellten SPIO-Chargen wurden mit einer Dosierung von  $35 \mu\text{mol Fe/kg}$  Körpergewicht intravenös (*V. coccygica*) appliziert. Die Signalintensität in Leber wurde mit Hilfe einer Carr-Purcell-Meiboom-Gill Sequenz (CPMG-Sequenz) vor und nach Kontrastmittelgabe über einen Zeitraum von ca. 4 Wochen (transversale Schichten durch die Leber) immer wieder erneut gemessen. Anhand der Signalintensitäten und der daraus resultierenden  $T_2$ -Zeiten wurde die Halbwertszeit in der Rattenleber bestimmt. Für die Messung wurde eine Handgelenksspule (CP Wrist OH 44202, USA Instruments Inc., Aurora, USA) verwendet. Die Tiere wurden mit Heftpflaster (Silkafix®, 2,5 cm x 5 m, Lohmann Rauscher International GmbH & Co, Deutschland, Neuwied) auf einer speziell angefertigten, halbrunden Liege aus Plexiglas fixiert. Für die MRT-Messung wurde eine  $T_2$ -gewichtete Multi Spinechosequenz verwendet. Es wurde in transversaler Schichtausrichtung und mit einer 5 mm Schichtdicke gemessen. Die Repetitionszeit (TR) betrug 5000 ms und es wurde mit 32 unterschiedlichen Echozeiten (TE von 12,9 bis 412,8 ms) gemessen. Es wurde ein Flipwinkel von  $180^\circ$  verwendet und eine Basisauflösung von 256 erreicht. Die Gesamtakquisitionszeit der verwendeten Sequenz betrug 10 min und 47 s. Über die Variation der Echozeiten konnten aus den Bildern einer Sequenz die mittleren  $T_2$ -Zeiten in einer gewählten Region in der Leber (ROI, engl. Region of Interest) errechnet werden.

Die Signaländerung nach Kontrastmittelgabe wurde wie folgt errechnet:

$$\text{Signaländerung} = 1/T_2 - 1/T_{2_0} \quad (\text{Gl. 28})$$

Dabei beschreibt  $1/T_2$  den reziproken Wert der  $T_2$ -Zeit nach Kontrastmittelgabe und  $T_{2_0}$  gibt die  $T_2$ -Zeit vor Kontrastmittelgabe an („Basislinie“).

### 3.6 Signifikanztest

Zur Abschätzung von signifikanten Unterschieden von Messwerten wurde der Student's t-Test für ungepaarte Stichproben gewählt [179]. Bei einer statistischen Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurde der Unterschied zweier Mittelwerte als signifikant bewertet.

### 3.7 Ausreissertest nach Grubbs

Zur Identifizierung von Ausreißern in einer Stichprobe wurde der Ausreissertest nach Grubbs verwendet [180].

$$d = x_i - \bar{x} \quad (\text{Gl. 29})$$

$$PG = |d_{\max} / s|$$

Dabei ist  $d$  die Differenz zwischen einem Messwert ( $x_i$ ) und dem Mittelwert ( $\bar{x}$ ),  $d_{\max}$  die maximale erreichte Differenz und  $s$  die Standardabweichung der Stichprobe. Lag die ermittelte Prüfgröße ( $PG$ ) bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % über dem kritischen Tabellenwert, so wurde der entsprechende Messwert als Ausreißer identifiziert und eliminiert.

### 3.8 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden mit dem Reinheitsgrad „zur Analyse“ erworben. Für die Herstellung der SPIO-Formulierungen wurde Milchsäure (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze), D-Mannitol (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze), Natriumhydroxid und Salzsäure (Fa. Merck KGaA, Darmstadt) verwendet. Alle weiteren in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien sind mit Angabe des Herstellers unter den entsprechenden Methoden aufgeführt. Bei allen beschriebenen Methoden wurde für die Herstellung von Verdünnungen und Lösungen reines, ionenfreies Millipore Wasser verwendet (Milli Q Plus, Millipore, Massachusetts, USA).



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Herstellung der SPIO-Formulierungen

#### 4.1.1 Formulierungsentwicklung der SPIO-Fraktionen

Die Synthese der SPIO-Rohdispersion und die magnetische Separation zur Herstellung der SPIO-Fraktionen sind ausführlich in Kapitel 3.1 beschrieben. Mit Hilfe der magnetischen Separation wurden acht verschiedene SPIO-Fraktionen mit verschiedenen Partikelgrößen hergestellt. Die SPIO-Partikel werden im folgenden Versuchsverlauf *in vivo* an Ratten getestet. Um das Nebenwirkungsrisiko so gering wie möglich zu halten und Unverträglichkeiten vermeiden zu können, ist eine Formulierungsentwicklung der SPIO-Fraktionen erforderlich.

Zur Einstellung der Osmolarität und des pH-Wertes wurde eine Hilfsstoffzusammensetzung analog der SHU 555 A Marktware gewählt: Milchsäure (1,802 mg/ml), Mannitol (40 mg/ml) und Natriumhydroxid (1,25 mg/ml). Nach Zugabe der Hilfsstoffe wurden die SPIO-Fraktionen für eine Stunde bei 80 °C unter Rühren erhitzt und anschließend in Glasgefäße für Injektionslösungen abgefüllt und verbördelt. Die Ergebnisse zur Osmolarität und die pH-Werte der hergestellten Chargen nach Formulierungsentwicklung sind in Tab. 5 zusammengefasst.

Tab. 5: Ergebnisse zur Osmolarität und pH-Wert nach Formulierungsentwicklung.

<b>Charge</b>	<b>Osmolarität (mmol/kg)</b>	<b>pH-Wert</b>
Charge A (20 nm)	298	6,22
Charge B (30 nm)	274	6,17
Charge C (40 nm)	270	6,33
Charge D (50 nm)	234	4,96
Charge E (60 nm)	294	6,23
Charge F (65 nm)	290	6,31
Charge G (70 nm)	265	5,19
Charge H (85 nm)	297	6,33

Auffällig sind die pH-Werte der Chargen D und G. Beide Chargen weisen verglichen mit den übrigen Chargen einen signifikant niedrigeren pH-Wert auf ( $p < 0,05$ , Ausreissertest nach Grubbs). Mögliche Ursachen können geringe Schwankungen der Milchsäure- oder Natriumhydroxidkonzentration während der Herstellung sein. Bei den Formulierungen handelt es sich um ungepufferte Systeme, so dass geringfügige Abweichungen der Milchsäure

oder Natronlauge den pH-Wert stark beeinflussen. Denkbar ist auch, dass die Carboxydextran-Beschichtung während des Autoklavierens teilweise in Milchsäure, Ameisensäure, Glycolsäure oder Essigsäure zerfällt. Bereits das Carboxydextran-Rohmaterial kann laut Herstellerangaben bis zu 0,1 % freie Ameisensäure und Oxalsäure enthalten (Meito Sangyo Kabushiki Kaisha, Japan). Durch eine Variation des Verhältnisses Carboxydextran zu Eisengehalt kann der pH-Wert ebenfalls beeinflusst werden. Alle hergestellten Chargen entsprechen jedoch im Hinblick auf pH-Wert und Osmolarität den Anforderungen des Europäischen Arzneibuches für intravenöse Injektion und können *in vivo* eingesetzt werden.

Um die Anforderungen des Europäischen Arzneibuches hinsichtlich der Sterilität zu erfüllen, wurden die formulierten SPIO-Fraktionen 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklaviert. Zur Überprüfung der SPIO-Nanopartikelstabilität während des Erhitzens wurde die Partikelgröße vor und nach dem Autoklavieren mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung überprüft (Abb. 21). Mit Ausnahme der Charge A, welche während des Autoklavierens geringfügig größer wurde ( $p = 0,01$ ), konnte gezeigt werden, dass sich die hydrodynamischen Durchmesser während der Dampfsterilisation nicht signifikant ändern ( $p > 0,05$ ).

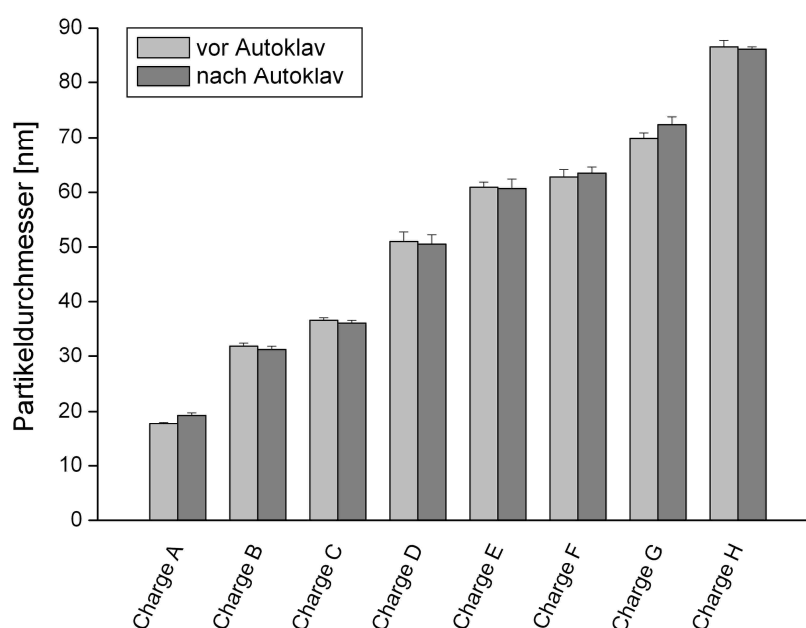


Abb. 21: Untersuchung zur Stabilität der Partikelgrößen. Dargestellt sind die hydrodynamischen Durchmesser (z-Average, DLS „in-batch“) vor (hellgrau) und nach (grau) Autoklavieren (20 min, 121 °C, 2 bar). Die Charge A wird während des Autoklavierens geringfügig größer (von 17,6 nm auf 19,3 nm,  $p = 0,01$ ). Die hydrodynamischen Durchmesser der übrigen Chargen bleiben während der Dampfsterilisation stabil ( $p > 0,05$ ).

Die Eisenkonzentration der hergestellten Formulierungen wurde in einer sechsfachen Bestimmung mittels Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES, Kap.3.1.4) bestimmt. Der Eisengehalt und die Ausbeuten der hergestellten SPIO-Formulierungen sind in Tab. 6 zusammengefasst.

Die ermittelten Eisenkonzentrationen der hergestellten SPIO-Chargen sind niedriger als in SHU 555 A (27,9 mg/ml). Auf einen weiteren Aufkonzentrierungsschritt wurde jedoch zugunsten der Sterilität verzichtet. Für alle folgenden Untersuchungen wurden die niedrigeren Konzentrationen entsprechend berücksichtigt.

Tab. 6: Überblick über die Eisenkonzentrationen und Chargengrößen der SPIO-Fractionen.

<b>Charge</b>	<b>Eisenkonzentration (mg Fe/ml)<sup>1)</sup></b>	<b>Chargengröße</b>
Charge A (20nm)	23,9 ± 0,4	840 ml
Charge B (30nm)	23,2 ± 0,2	720 ml
Charge C (40nm)	23,3 ± 0,6	750 ml
Charge D (50nm)	21,9 ± 0,4	410 ml
Charge E (60nm)	25,3 ± 0,6	640 ml
Charge F (65nm)	23,2 ± 0,6	1100 ml
Charge G (70nm)	19,7 ± 0,5	100 ml
Charge H (85nm)	26,4 ± 0,4	10 ml
1) Eisengehalt ± Standardabweichung (n = 6), ICP-Methode (vgl. Kap. 3.1.4)		

#### **4.1.2 Stabilität der hergestellten SPIO-Formulierungen**

Zur Überprüfung der Langzeitstabilität der hergestellten SPIO-Formulierungen wurden die Proben 2 Jahre und 6 Monate bei Raumtemperatur gelagert. Mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung wurde die Partikelgröße erneut bestimmt und mit den Ausgangswerten verglichen (Abb. 22).

Aus Abb. 22 wird ersichtlich, dass sich die Partikelgrößen der Formulierungen über einen Lagerungszeitraum von 2,5 Jahren nicht signifikant verändern ( $p > 0,05$ ). Die Partikelgröße ist ein wichtiges Indiz zur Bestimmung der Stabilität und zeigt, dass auch während einer langen Lagerungszeit keine Zersetzung, Ostwaldreifung oder Agglomeration der Partikel eintritt. Die Stabilität der Partikel ist eine wichtige Voraussetzung für die folgende Partikelgrößenanalyse und für die *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen.

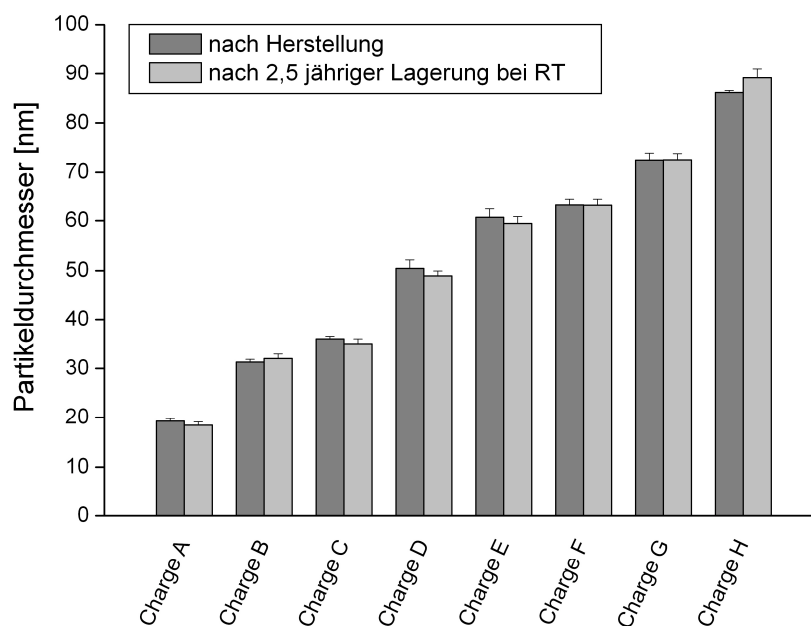


Abb. 22: Untersuchung zur Stabilität der Partikelgrößen. Dargestellt sind die hydrodynamischen Durchmesser (z-Average, DLS „in-batch“) der hergestellten SPIO-Formulierungen nach der Herstellung (vgl. Abb. 21) und nach 2,5 jähriger Lagerung bei Raumtemperatur. Die Partikelgrößen zeigen nach Lagerung keine signifikante Veränderung ( $p > 0,05$ ).

## 4.2 Teilchengrößenanalytik der SPIO-Formulierungen

### 4.2.1 Dynamische Lichtstreuung und Zetapotential

Die Ergebnisse der DLS („in-batch“, vgl. Kap. 3.2.2) zeigen, dass die Partikelgrößen wie zu erwarten, von Charge A nach H zunehmen (Tab. 7). Die Zielgrößen der SPIO-Chargen (nm Angaben in den Klammern) wurden für alle Chargen annähernd erreicht. Mit Ausnahme der Charge B erfüllen alle hergestellten Chargen die Anforderung an den Polydispersitätsindex (Zielgröße:  $PDI < 0,2$ , vgl. Kap. 2.4.4). Partikelgrößenverteilungen mit einem  $PDI < 0,2$  zeigen eine gute Übereinstimmung mit der Autokorrelationsfunktion und weisen mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit eine monomodale Partikelgrößenverteilung auf [139]. Trotz Nichterreicherung der Zielgröße ( $PDI < 0,2$ ) wurde die Charge B in die folgenden Untersuchungen mit einbezogen und die Ergebnisse wurden entsprechend diskutiert (vgl. Kap. 5.2.3. und 5.3.2).

Die SPIO-Partikel der hergestellten Chargen besitzen eine Kern-Hülle Struktur. Der Kern besteht aus Eisenoxid und die Hülle aus Carboxydextran (vgl. Kap. 2.3.2). Das Zetapotential der hergestellten SPIO-Chargen ist negativ, was durch die freien COOH-Gruppen des Carboxydextrans erklärt werden kann (Tab. 7). Durch die negative Ladung sind

die Nanopartikel neben der sterischen Stabilisierung auch elektrostatisch stabilisiert, da sich die geladenen Teilchen gegenseitig abstoßen.

Bei den dargestellten hydrodynamischen Durchmessern handelt es sich um Daten aus einer intensitätsgewichteten Verteilung (vgl. Anhang Kap. 8.13, S. 129).

Tab. 7: Charakterisierung der SPIO-Chargen mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung („in-batch“).

<i>Charge</i>	$d_H^1$	$PDI^2$	<i>Zetapotential</i>
Charge A (20 nm)	19,3 ± 0,5 nm	0,191 ± 0,020	-20,5 ± 3,0 mV
Charge B (30 nm)	31,3 ± 0,6 nm	0,248 ± 0,004	-32,2 ± 1,6 mV
Charge C (40 nm)	36,1 ± 0,5 nm	0,135 ± 0,009	-37,9 ± 2,8 mV
Charge D (50 nm)	50,5 ± 1,7 nm	0,149 ± 0,022	-29,9 ± 2,5 mV
Charge E (60 nm)	60,7 ± 1,7 nm	0,139 ± 0,017	-29,6 ± 1,6 mV
Charge F (65 nm)	63,5 ± 1,1 nm	0,136 ± 0,006	-33,6 ± 0,8 mV
Charge G (70 nm)	72,4 ± 1,4 nm	0,125 ± 0,025	-27,0 ± 0,5 mV
Charge H (85 nm)	86,2 ± 0,4 nm	0,137 ± 0,004	-31,6 ± 0,5 mV
SHU 555 A	63,1 ± 0,8 nm	0,208 ± 0,011	-35,1 ± 0,9 mV

1) Intensitätsgewichteter hydrodynamischer Durchmesser ± Standardabweichung (z-Average), DLS-Methode: Kap. 3.2.2, Dreifachbestimmung mit je n = 5, vgl. Abb. 22 (Daten nach Autoklavieren)  
 2) Polydispersitätsindex ± Standardabweichung nach Kumulantenmethode (Kap. 2.4.4)  
 3) Zetapotential ± Standardabweichung mit je n = 6 a 30 Messungen, pH = 6,0 (vgl. Kap. 3.2.2)

#### 4.2.2 Validierung der asymmetrischen Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung

Für eine detaillierte und aussagekräftige Charakterisierung der Partikelgrößen und Partikelgrößenverteilungen wurden die hergestellten Chargen mittels asymmetrischer Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung aufgetrennt und analysiert.

Zunächst war es notwendig, eine effektive A4F-Methode zur Auftrennung von Nanopartikeln im relevanten Größenbereich (10 – 100 nm) zu entwickeln. Zur Erreichung dieses Ziels und zur Überprüfung der Eignung und Richtigkeit der A4F-Methode wurden zertifizierte Polystyrolstandards eingesetzt (vgl. Kap. 3.2.1). Zur Überprüfung der Trennleistung wurden drei Partikelgrößen als Gemisch vermessen (20 nm, 50 nm und 100 nm). Um die besondere Trennfähigkeit der A4F im Vergleich zu gängigen Methoden der Partikelgrößenbestimmung darstellen zu können, wurde das Partikelgemisch sowohl mit der dynamischen Lichtstreuung („in-batch“, vgl. 3.2.2) als auch mit der A4F/DLS vermessen (Abb. 23 A und B). Zusätzlich wurden die drei Standards zur Ermittlung der hydrodynamischen Größen mit der dynamischen Lichtstreuung („in-batch“) einzeln vermessen (Tab. 8, letzte Spalte, S. 60).

Während die A4F durch den hohen Querfluss die Partikel trennen kann, ist die DLS ohne vorherige Trennung nicht in der Lage, die gemischten Partikelstandards voneinander zu unterscheiden. Die DLS ermittelt einen mittleren z-Average von 75,2 nm (intensitätsgewichtet) und einen anzahlgewichteten Durchmesser von 51,7 nm (Abb. 23 A).

#### Richtigkeit - Untersuchung von Polystyrolstandards

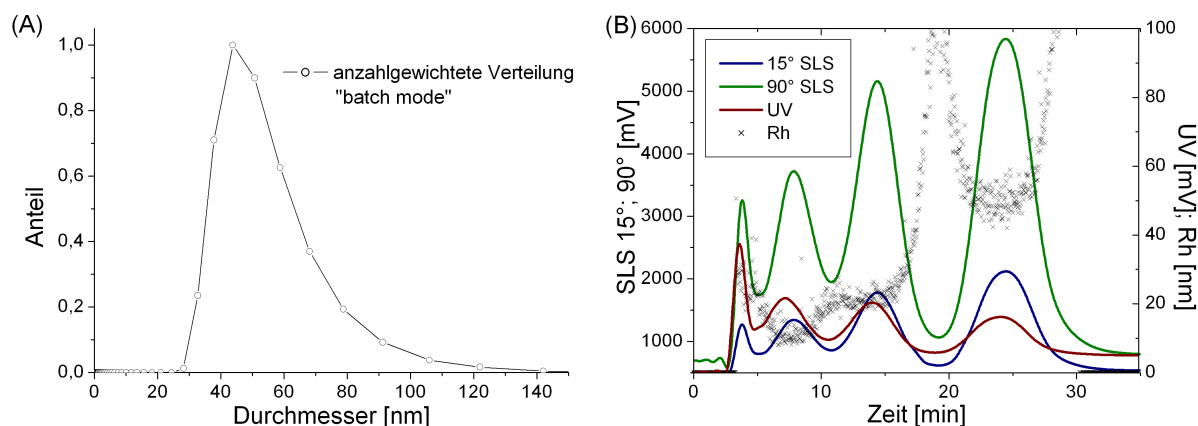


Abb. 23: (A) Partikelgrößenanalyse mittels dynamischer Lichtstreuung („in-batch“, vgl. Kap. 3.2.2) von einem Gemisch aus zertifizierten Polystyrolgrößenstandards (PSS: 20 nm, 50 nm und 100 nm) (B) Rohdaten der A4F-Analyse für das gleiche PSS-Gemisch. Die Abbildung zeigt die Signalintensitäten von vier Detektoren: UV<sub>280nm</sub> (braun), SLS bei 15° (grün), SLS bei 90° (schwarz) und DLS (schwarze Kreuze) als Funktion der Zeit. Im Gegensatz zur einfachen dynamischen Lichtstreuung ist die A4F/DLS-Methode in der Lage, die einzelnen Partikelgrößen effektiv aufzutrennen.

Das Rohdatendiagramm der A4F zeigt vier verschiedene Peaks: 1. den Void-Peak (Totvolumen), 2. den 20 nm, 3. den 50 nm und 4. den 100 nm Partikelstandard (Abb. 23 B). Das Partikelgrößengemisch wird im Inneren des Kanals aufgrund unterschiedlicher Diffusionsgeschwindigkeiten aufgetrennt und kann von den vier nach geschalteten Detektoren (UV/VIS, 2 Kanal-SLS, DLS und MALLS) detektiert werden. Der beobachtete Void-Peak (Peak 1 in Abb. 23 B) ist vergleichbar mit dem Totpeak in der HPLC (engl. High Pressure Liquid Chromatography) und in der Literatur bereits beschrieben [149, 181].

Zur Überprüfung der Richtigkeit wurde die Übereinstimmung der A4F-Ergebnisse mit den zertifizierten Partikelgrößen untersucht. Eine Gegenüberstellung der ermittelten Durchmesser nach DLS, A4F/DLS und den zertifizierten Partikelgrößen ist in Tab. 8 dargestellt. Die Ergebnisse stimmen sehr gut mit den zertifizierten Partikelgrößen und mit den hydrodynamischen Größen (Einzelmessung DLS) überein. Die geringen Abweichungen

zwischen den Durchmessern, bestimmt mittels Transmissionselektronenmikroskopie und dynamischer Lichtstreuung, werden in Kapitel 5.2.1 diskutiert.

Tab. 8: Durchmesser der Polystyrolstandards - Vergleich von TEM, A4F/DLS und DLS („in-batch“).

<i>Partikelstandard</i>	<i>d (TEM)<sup>1</sup></i>	<i>d<sub>H</sub> (A4F/DLS)<sup>2</sup></i>	<i>d<sub>H</sub> (DLS)<sup>3</sup></i>
20 nm	22,0 ± 1,5 nm*	22,9 ± 1,2	23,0 ± 0,1
50 nm	46,0 ± 2,0 nm	46,6 ± 0,8	50,0 ± 0,1
100 nm	97,0 ± 3,0 nm	100,5 ± 9,2	102 ± 0,5

<sup>1</sup>) zertifizierter Durchmesser ± Standardabweichung vom National Institute of Standards and Technology (NIST), \* Wert nicht über TEM, sondern DLS zertifiziert  
<sup>2</sup>) hydrodynamischer Durchmesser ± Standardabweichung, Ergebnisse des DLS Detektors gekoppelt an die A4F  
<sup>3</sup>) z-Average ± Standardabweichung, Standards einzeln vermessen, DLS „in-batch“ (vgl. Kap. 3.2.2)

Neben den hydrodynamischen Größen wurden zusätzlich über einen gekoppelten Mehrwinkellichtstredetektor (MALLS) die Gyrationradien bestimmt. Die Ergebnisse der Lichtstreuintensitäten der drei Polystyrolstandards (A4F/MALLS) sind in Abb. 24 dargestellt.

Dem A4F-Trennprinzip folgend werden erst die kleineren Partikelgrößen eluiert. Interessant ist die Betrachtung der Streulichtintensitäten. Während kleine Partikel laut Theorie in alle Raumrichtungen gleich stark streuen (isotrop), streuen größere Partikel das Licht verstärkt nach vorne (vgl. Abb. A 1, S. 123). Die 20 nm PSS (2. Peak, Abb. 24 B) zeigen bei allen Winkeln annähernd gleiche Lichtstreuintensitäten. Für den 100 nm Polystyrolstandard hingegen wird bereits deutlich, dass sich die Lichtstreuintensitäten zwischen den Winkeln unterscheiden. So steigt die Lichtstreuintensität bei kleinen Winkeln (Abb. 24 B, grün 25,9°) verglichen mit größeren (hellblau 163,3°) an.

Nach Dreifachbestimmung wurden aus den MALLS-Daten die Gyrationradien bestimmt. Erwartungsgemäß nehmen die Gyrationradien mit zunehmender Elutionszeit zu. Für den 20 nm Standard wurde mit  $8,7 \pm 0,1$  nm der kleinste Gyrationradius ermittelt. Für den 50 nm Standard wurde ein Gyrationradius von  $17,7 \pm 0,2$  nm und für den 100 nm Standard von  $34,4 \pm 0,2$  nm bestimmt (vgl. Tab. 11, S. 97). Die Ergebnisse werden in Kap. 5.2.1 diskutiert.

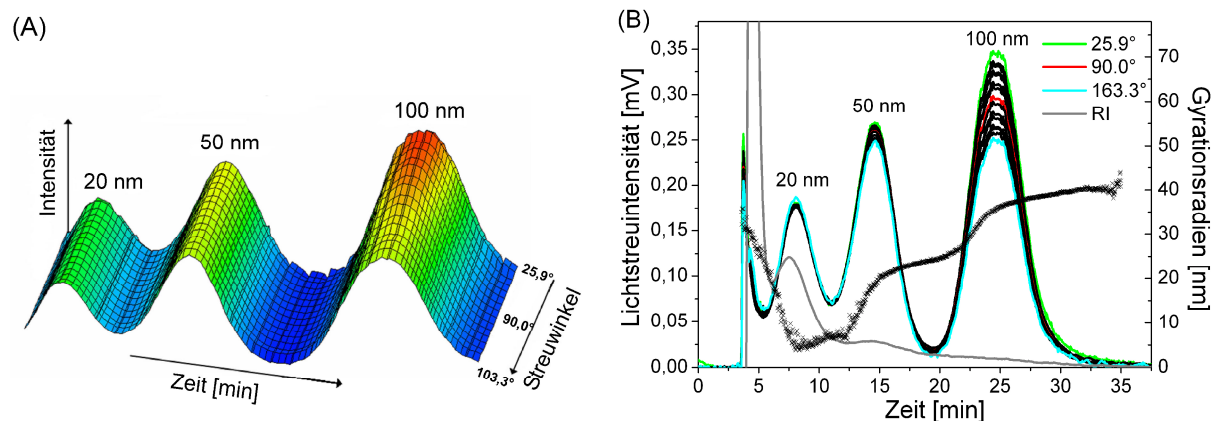


Abb. 24: Elutionsprofile der A4F/MALLS-Messung für eine Mischung aus Polystyrolstandards (20 nm, 50 nm und 100 nm) bei 16 verschiedenen Winkeln (25.9° bis 163.3°). (A) Dreidimensionale und (B) zweidimensionale Darstellung der Signalintensitäten für die drei Partikelgrößen als Funktion der Zeit. In (A) ist das dreidimensionale Elutionsprofil ab 5 min dargestellt, wodurch der Void-Peak bei ca. 4 min nicht zu sehen ist (vgl. Abb. 23). In (B) ist zusätzlich das Signal des Brechungsindexdetektors (grau) und der Gyrationradien (schwarz) als Funktion der Zeit dargestellt. Die Elutionsprofile zeigen, dass entsprechend dem A4F-Trennprinzip erst die kleineren Partikelgrößen eluiert werden. Aufgrund der verstärkten Vorwärtsstreuung größerer Partikel (vgl. Abb. A 1) steigt die Lichtstreuintensität bei kleinen Winkeln verglichen mit größeren an (grün 25,9° verglichen mit hellblau 163,3°).

### Reproduzierbarkeit

Nachdem die Effektivität und Richtigkeit der A4F-Methode gezeigt werden konnte, war es für die folgende Charakterisierung wichtig, die Reproduzierbarkeit der Methode zu belegen. Dazu wurde eine der SPIO-Chargen (Charge E) zwölfmal mit Hilfe der A4F vermessen. Die normierten Elutionsprofile des UV-Detektors sind in Abb. 25 dargestellt.

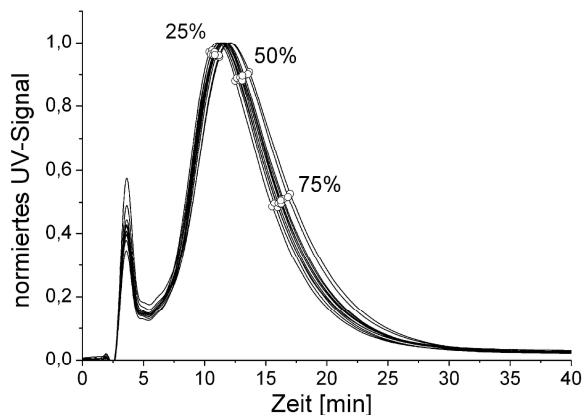


Abb. 25: Dargestellt ist die Reproduzierbarkeit der A4F-Trennmethode für eine zwölfmalige Bestimmung der Charge E. Die mittels UV-Detektor gemessenen Elutionsprofile weichen nur geringfügig voneinander ab.



Zur Beurteilung der Reproduzierbarkeit wurden die Elutionszeiten der Quartile 25 %, 50 % und 75 % für drei Detektoren (UV 280 nm, SLS 15° und SLS 90°) berechnet (vgl. Anhang, Tab. A 2, S. 125). Die relative Standardabweichung für alle Quartile der unterschiedlichen Detektoren lag unter 3 % und zeigt, dass die Methode sehr gut reproduzierbar ist.

#### 4.2.3 A4F-Analyse von SHU 555 A

Im folgenden Versuchsverlauf wurde SHU 555 A (vgl. Tab. 3, S. 21) mit Hilfe der validierten A4F-Trennmethode analysiert (Abb. 26). Die A4F-Analyse von SHU 555 A zeigt, dass SPIO-Partikel mit Partikeldurchmessern zwischen 20 nm bis 150 nm enthalten sind. Der mittlere hydrodynamische Durchmesser aus der A4F-Bestimmung beträgt  $65 \text{ nm} \pm 0,8 \text{ nm}$  ( $n = 3$ ).

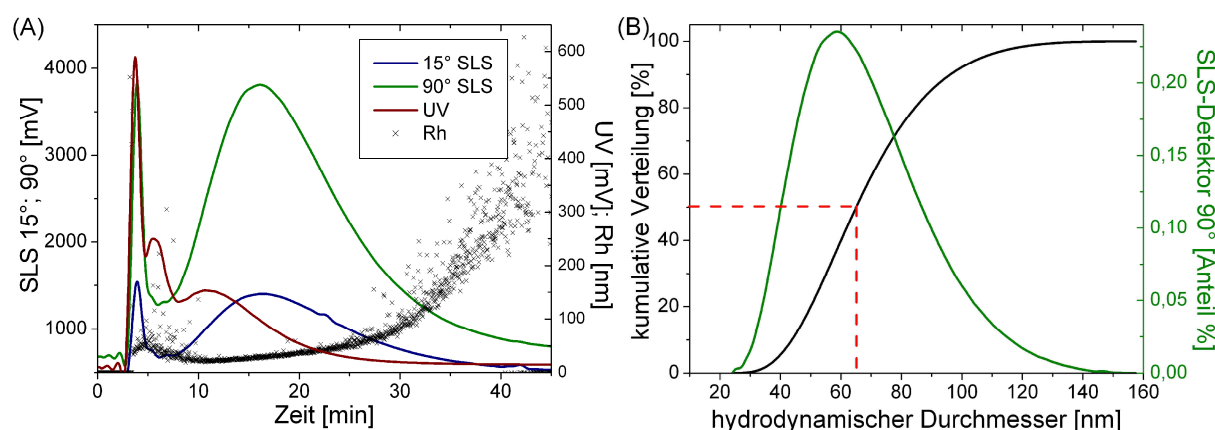


Abb. 26: Ergebnisse der A4F-Analyse von SHU 555 A mit der validierten A4F-Methode. **(A)** Anhand des anzahlgewichteten UV-Signals wird deutlich, dass ein hoher Anteil an kleinen Partikeln enthalten ist. **(B)** Die Verteilung der Partikeldurchmesser berechnet anhand des 90° statischen Lichtstreuendetektors erstreckt sich von rund 20 nm bis 150 nm. Der mittlere hydrodynamische Durchmesser wurde anhand der kumulativen Verteilung bei 50 % bestimmt (rote gestrichelte Linie) und beträgt 65 nm.

#### 4.2.4 A4F-Analyse der hergestellten SPIO-Formulierungen

Die hergestellten SPIO-Formulierungen liegen in einem Partikelgrößenbereich mit mittleren hydrodynamischen Durchmessern von 20 nm bis 85 nm (vgl. Tab. 7, S. 58) und können mit der validierten A4F-Trennmethode (siehe Kap. 4.2.2) effektiv aufgetrennt werden.

Die Rohdaten der vier gekoppelten Detektoren: UV<sub>280nm</sub> (braun), SLS bei 15° (grün), SLS bei 90° (schwarz) und DLS (schwarze Kreuze) sind beispielhaft von vier der hergestellten Chargen in Abb. 27 dargestellt.

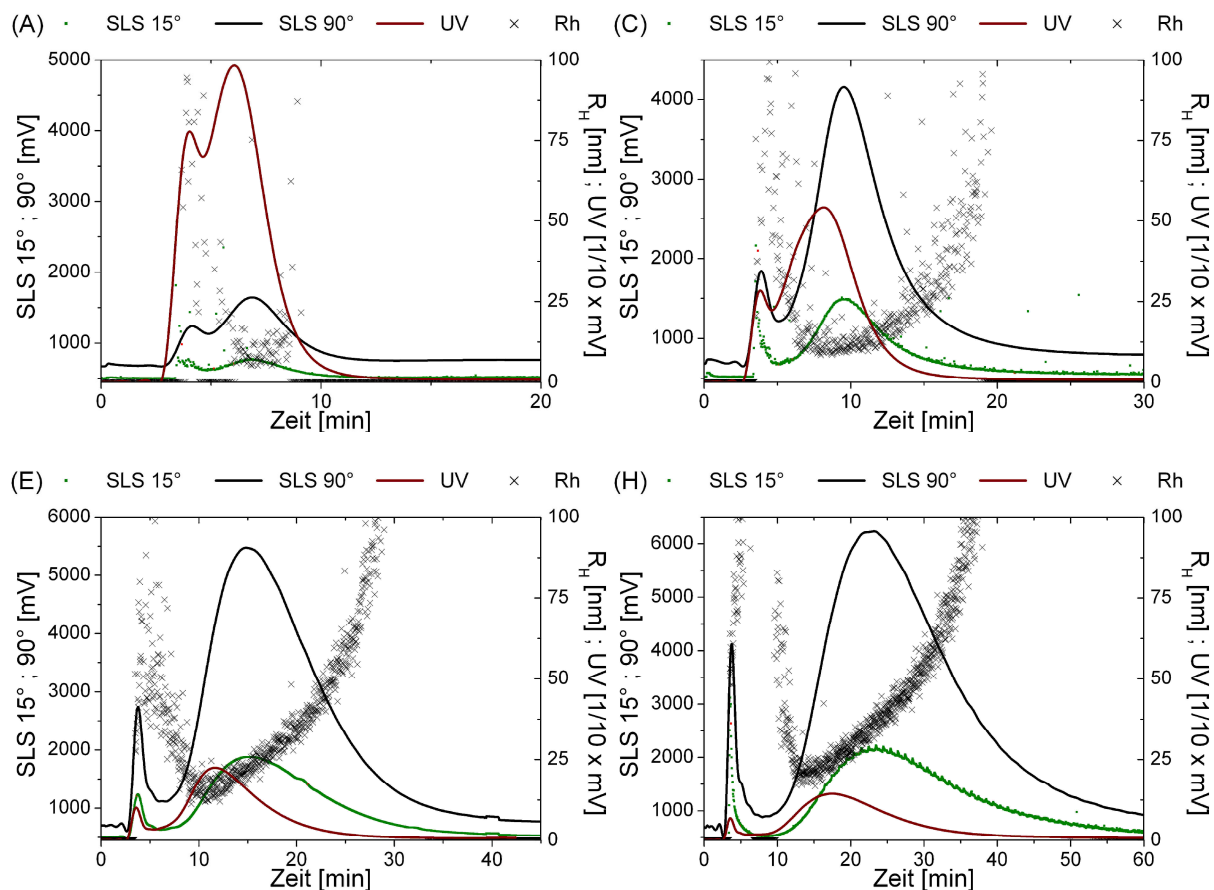


Abb. 27.: Dargestellt sind die Rohdaten der asymmetrischen Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung (A4F) von Charge A (A), Charge C (C), Charge E (E) und Charge H (H). Vier Detektoren wurden direkt an die A4F gekoppelt: UV-Detektor (braun), DLS-Detektor (schwarze Kreuze), 90° (schwarz) und 15° SLS-Detektor (grün). Die A4F-Elutionszeiten nehmen erwartungsgemäß mit zunehmender Partikelgröße zu. Der Lichtstreuungstheorie folgend, steigen die absoluten Lichtstreuintensitäten des SLS-Detektors (grün und schwarz) mit zunehmender Partikelgröße an.

Während der A4F-Trennung waren keine Agglomerationen der SPIO-Partikel oder Wechselwirkungen mit der Celluloseacetatmembran zu beobachten. Die A4F-Trennungen der SPIO-Chargen zeigen, dass die Elutionszeiten und damit die Partikelgrößen von Charge A nach H ansteigen. Dieses Ergebnis bestätigt die DLS-Daten („in-batch“), die ebenfalls einen Anstieg der hydrodynamischen Partikelgrößen von Charge A nach H zeigen (vgl. Tab. 7, S. 58).

Zur besseren Vergleichbarkeit der hergestellten SPIO-Chargen wurden die Rohdaten des 90° statischen Lichtstredetektors normiert (Abb. 28 A). Die Chargen A und C bis H zeigen dabei eine monomodale Partikelgrößenverteilung. Die Charge B zeigt im Gegensatz zu den übrigen Chargen eine bimodale Partikelgrößenverteilung. Auffällig ist dabei ab ca. 12 min eine ausgeprägte Schulter (in Abb. 28 B mit rotem Pfeil markiert). Die Schulter ist anhand des

statischen Lichtstreusignals ( $90^\circ$  und  $15^\circ$  SLS-Detektors) deutlich erkennbar, während der UV-Detektor, wie bei allen anderen Chargen, eine monomodale Verteilung zeigt. Begründet werden kann dies über die erhöhte Empfindlichkeit des SLS-Detektors gegenüber größeren Partikeln (vgl. Anhang Gl. A 8 und Gl. A 9, S. 129). So kann im Falle der Charge B mit Hilfe der A4F-Trennung und dem nach geschaltetem SLS-Detektor eindeutig gezeigt werden, dass eine bimodale Verteilung vorliegt. Nach dem A4F-Elutionsprofil zu urteilen, enthält die Charge einen großen Anteil kleiner Partikel (ähnlich Charge A) und einen kleinen Anteil größerer Partikel (Aggregate).

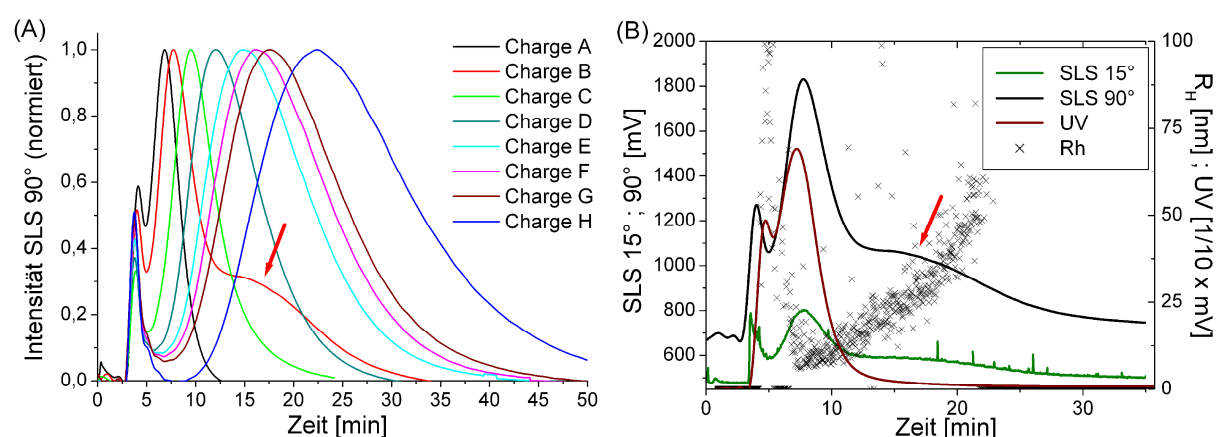


Abb. 28: Charakterisierung der hergestellten SPIO-Chargen mittels A4F/UV/DLS/SLS Kopplung. (A) Übersicht über das Elutionsverhalten von allen acht Chargen mittels normierten SLS Detektorsignal bei  $90^\circ$ . (B) Rohdaten für die Separation der Charge B (30 nm). Dargestellt sind die Signalintensitäten von vier der gekoppelten Detektoren:  $UV_{280nm}$  (braun), SLS bei  $15^\circ$  (grün), SLS bei  $90^\circ$  (schwarz) und DLS (schwarze Kreuze) als Funktion der Zeit. Die A4F-Untersuchung zeigt, dass die Charge B bimodal verteilt ist, während die anderen Chargen eine monomodale Partikelgrößenverteilung zeigen.

Neben den dargestellten Rohdaten des DLS-, UV-,  $90^\circ$ - und  $15^\circ$  SLS-Detektors wurde zusätzlich ein Mehrwinkellichtstreudetektor an die A4F gekoppelt (vgl. Aufbau der A4F, Abb. 18, S. 29). Der MALLS-Detektor kann sowohl die Signalintensitäten des gestreuten Lichtes bei unterschiedlichen Winkeln messen als auch die Gyrationenradien zu jedem Zeitpunkt der Trennung bestimmen (vgl. Kap. 2.4.5). Die Rohdaten des MALLS-Detektors für die Chargen A, C, E und H sind in Abb. 29 dargestellt.

Analog der hydrodynamischen Radien (vgl. Abb. 27) nehmen die Gyrationenradien mit zunehmender Elutionszeit zu. Alle dargestellten Chargen zeigen nach A4F/MALLS Kopplung eine monomodale Partikelgrößenverteilung. Wie bereits bei den Polystyrolstandards festgestellt wurde (vgl. Abb. 24 B, S. 61), ist bei größeren Partikelgrößen ( $> 40$  nm) eine

Winkelabhängigkeit der Lichtstreuintensität zu sehen. Auch die SPIO-Partikel zeigen eindeutig eine Winkelabhängigkeit der Streulichtintensitäten. So liegen die Kurven für kleine Partikelgrößen übereinander (Abb. 29 A und C), wohingegen sich die Lichtstreuintensitäten für größere Partikel bei unterschiedlichen Winkeln unterscheiden (Abb. 29 E und H). Die unterschiedlichen Lichtstreuintensitäten werden durch eine verstärkte Vorwärtstreue größerer Partikel hervorgerufen (vgl. Abb. A 1, S. 123).

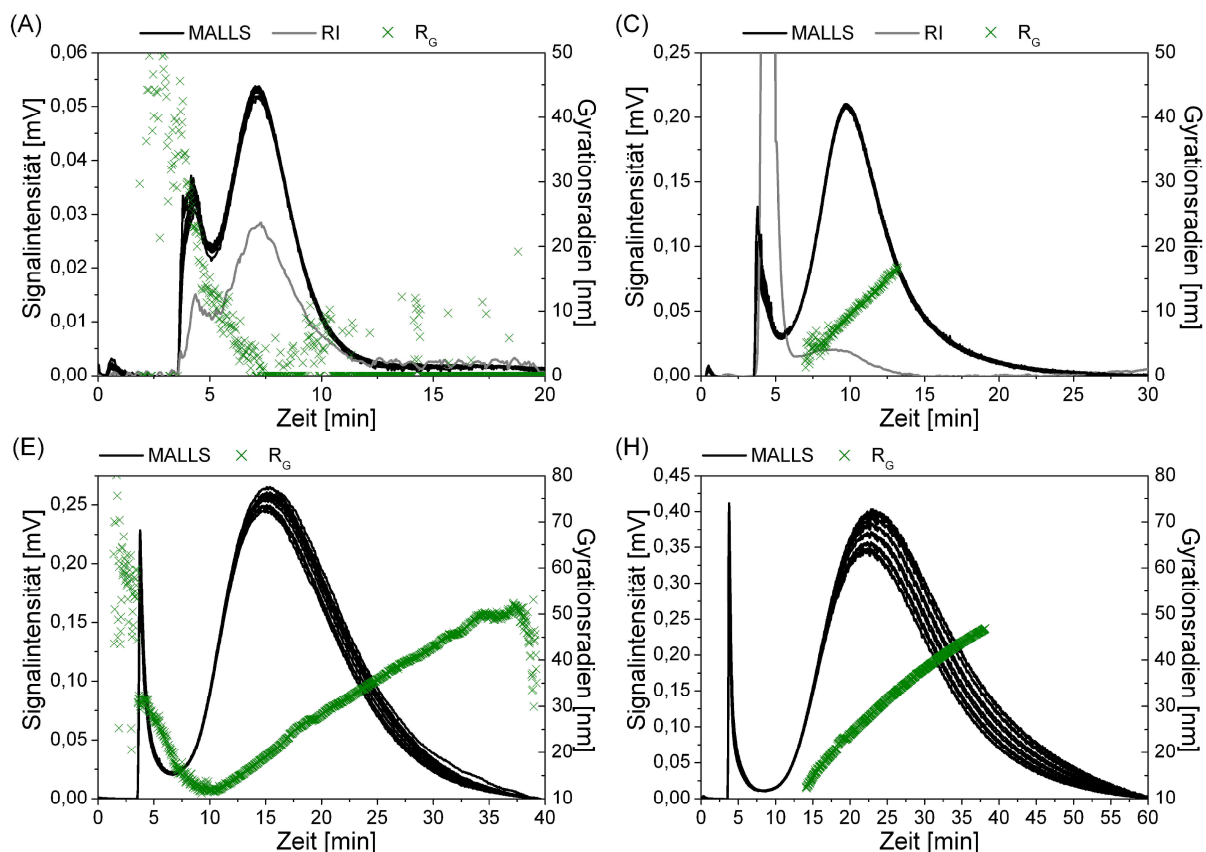


Abb. 29: Charakterisierung der Chargen A (A), C (C), E (E) und H (H) mittels A4F/MALLS Kopplung. Alle dargestellten Chargen zeigen eine monomodale Partikelgrößenverteilung. Wie nach A4F-Elutionstheorie zu erwarten, verlassen kleinere Partikel den A4F-Kanal schneller als größere. Dementsprechend nehmen die Gyrationsradien (grün) mit der Elutionszeit zu.

Der bimodale Charakter der Charge B (vgl. Abb. 28) wird durch die Daten des MALLS-Detektors bestätigt (Abb. 30). Wiederum ist ab ca. 12 min Elutionszeit eine Schulter zu sehen. Erkennbar ist zudem die erhöhte Empfindlichkeit kleiner Streuwinkel gegenüber größeren Partikeln.

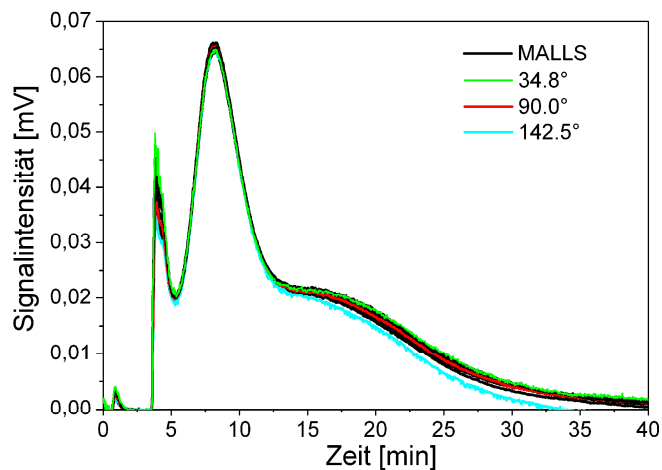


Abb. 30: Charakterisierung der Charge B (30 nm) mit Hilfe einer A4F/MALLS Kopplung. Dargestellt sind die Streuintensitäten für 16 verschiedene Winkel. Die Daten des MALLS Detektors bestätigen den bimodalen Charakter der Charge B (vgl. Abb. 28, S. 64).

Eine Zusammenfassung über die hydrodynamische Radien und Gyrationradien nach A4F-Trennmethode gibt Tab. 9.

Tab. 9: Charakterisierung der hergestellten SPIO-Formulierungen mittels A4F/DLS/MALLS Kopplung.

<b>Charge</b>	<b>Hydrod. Radius</b> $R_{Hw}^{1)}$	<b>Partikelgrößenbereich</b> (von - bis) $R_H$	<b>Gyrationradius</b> $R_{Gw}^{2)}$
Charge A (20nm)	$10,3 \pm 0,8$ nm	5 – 20 nm	$7,1 \pm 0,2$ nm
Charge B (30nm)	$9,8 \pm 0,5$ nm $34,8 \pm 1,6$ nm	7 – 45 nm	$10,6 \pm 3,4$ nm $24,5 \pm 2,3$ nm
Charge C (40nm)	$13,2 \pm 0,3$ nm	8 – 30 nm	$13,9 \pm 0,8$ nm
Charge D (50nm)	$20,6 \pm 0,5$ nm	10 – 50 nm	$19,3 \pm 1,0$ nm
Charge E (60nm)	$27,9 \pm 0,4$ nm	10 – 65 nm	$22,4 \pm 0,4$ nm
Charge F (65nm)	$32,3 \pm 0,5$ nm	13 – 65 nm	$25,6 \pm 1,3$ nm
Charge G (70nm)	$34,8 \pm 1,4$ nm	13 – 70 nm	$29,5 \pm 1,0$ nm
Charge H (85nm)	$41,2 \pm 0,8$ nm	17 – 75 nm	$33,9 \pm 1,6$ nm

<sup>1)</sup> Mittelwert hydrodynamischer Radius  $\pm$  Standardabweichung (n = 3, Methode vgl. Kap. 3.2.4)  
<sup>2)</sup> Mittelwert Gyrationradius  $\pm$  Standardabweichung (n = 3, Methode vgl. Kap. 3.2.3)

#### 4.2.5 Polydispersitätsindex

Neben der Partikelgrößenbestimmung mittels A4F sollte auch die Breite der Partikelgrößenverteilungen der hergestellten Chargen beurteilt werden (vgl. Kap. 2.4.6). Abgeleitet von Gl. 22 (S. 33) wurde der Polydispersitätsindex (Q) wie folgt berechnet:

$$Q = \frac{R_{Hw}}{R_{Hn}} \sim \frac{t_{50\%SLS} - t_0}{t_{50\%UV} - t_0} \sim \frac{t_{SLS\max} - t_0}{t_{UV\max} - t_0} \quad (\text{Gl. 30})$$

Dabei ist  $t_0$  die Totzeit (3 min),  $R_{Hw}$  der volumengewichtete und  $R_{Hn}$  der anzahlgewichtete, hydrodynamische Radius (vgl. Anhang Kap. 8.13). Die Retentionszeit  $t_{50\%SLS}$  beschreibt die Zeit, nach der 50 % der untersuchten Probe den Kanal verlassen hat und den SLS-Detektor erreicht. Die Retentionszeit des SLS-Detektors im Peakmaximum wird durch  $t_{SLS\max}$  beschrieben. Die Retentionszeit  $t_{50\%UV}$  beschreibt die Zeit, nach der 50 % der untersuchten Probe den Kanal verlassen hat und den UV-Detektor erreicht. Die Retentionszeit des UV-Detektors im Peakmaximum wird durch  $t_{UV\max}$  beschrieben. Im Falle von monodispersen Partikelgrößenverteilungen sind die Retentionszeiten theoretisch im Peakmaximum für den UV-Detektor und den SLS-Detektor gleich, weshalb der Q-Wert dann gleich eins ist. Reale Proben hingegen weisen stets eine Polydispersität auf. Größere Partikel streuen das Licht wesentlich stärker, so dass sich im Vergleich zum Peakmaximum des UV-Detektors das Peakmaximum des SLS-Detektors zu höheren Elutionszeiten hin verschiebt. Das UV-Detektorsignal ist annähernd anzahlgewichtet, so dass sich die Retentionszeit im Peakmaximum auch bei Vorhandensein größerer Partikel nur geringfügig verschiebt. Der Quotient zwischen  $t_{SLS\max}$  und  $t_{UV\max}$  kann demnach zur Bestimmung der Polydispersität der Probe herangezogen werden. Die Polydispersitäten, welche anhand des Retentionszeitmodells errechnet wurden, stellen genau genommen nur Näherungen dar, sind jedoch geeignet, die Breite der Verteilung von verschiedenen Chargen miteinander vergleichen zu können.

Die Ergebnisse der Polydispersitätsindices, für die zur Kalibrierung verwendeten Polystyrolstandards (PSS), für SHU 555 A und für die hergestellten SPIO-Chargen sind in Abb. 31 dargestellt.

Die Polystyrolstandards (PSS) enthalten sehr definierte Partikelgrößen und sind sehr eng verteilt. Entsprechend niedrig sind die bestimmten Polydispersitätsindices. Verglichen mit den Standards sind die SPIO-Formulierungen breiter verteilt. Mit Polydispersitätsindices zwischen ca. 1,2 und 1,4 sind die hergestellten Chargen jedoch enger verteilt als das Marktprodukt SHU 555 A mit einem Polydispersitätsindex von 1,722. Eine auffällig breite

Partikelgrößenverteilung wurde für die Charge B bestimmt. Dieses Ergebnis bestätigt das Ergebnis aus der A4F-Untersuchung, bei der ein bimodaler Charakter der Charge B gezeigt werden konnte (vgl. Abb. 28, S. 64).

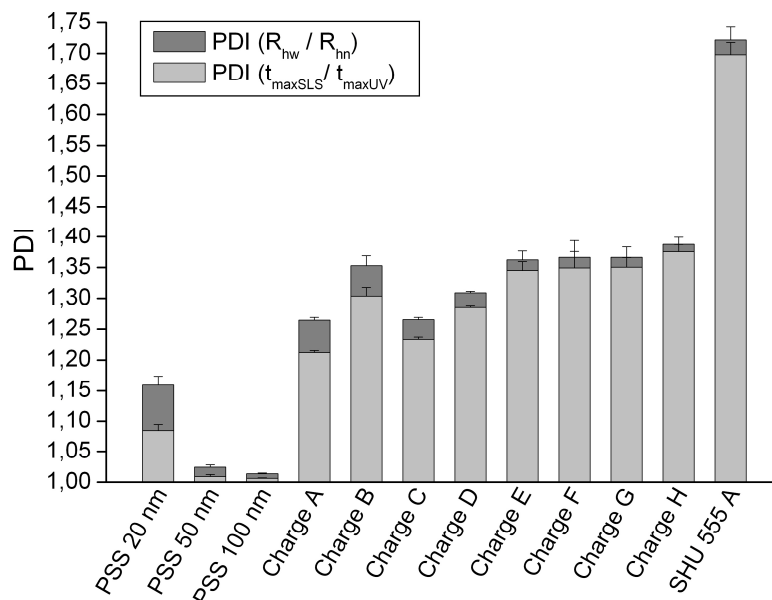


Abb. 31: Polydispersitätsindices der Polystyrolstandards, von SHU 555 A und von den hergestellten SPIO-Chargen. Gegenüber den Polystyrolstandards zeigen die hergestellten SPIO-Chargen größere Polydispersitätsindices. Verglichen jedoch mit SHU 555 A sind die hergestellten SPIO-Chargen enger verteilt.

#### 4.2.6 Formfaktor

Aus dem Quotienten der Gyrationradien ( $R_G$ ) und den hydrodynamischen Radien ( $R_H$ ) lässt sich der Formfaktor errechnen (vgl. Kap. 2.4.7). Dieser ist charakteristisch für bestimmte geometrische Formen. So haben runde, kompakte Nanopartikel einen theoretischen Formfaktor von 0,775.

Während der A4F-Trennung erfasst der gekoppelte dynamische Lichtstreuendetektor kontinuierlich die hydrodynamischen Radien und der MALLS Detektor die Gyrationradien. Über das Verhältnis  $R_G/R_H$  kann der Formfaktor über den gesamten Messbereich errechnet werden (Abb. 32).

Die aus den Einzelwerten ermittelten Formfaktoren streuen in einem Bereich von ca. 1,0 bis 0,6 (hohle Kugeln). Da die Streuung der hydrodynamischen Radien des DLS-Detektors relativ hoch ist, ist es nicht sinnvoll die Einzelwerte für eine Auswertung heranzuziehen. Wird jedoch ein linearer Fit zwischen den hydrodynamischen Radien und der Zeit (grüne Linie) zur Berechnung verwendet, wird die Streuung kleiner (schwarze Kreise). Der verwendete lineare Fit ist in Abb. 32 dargestellt (schwarze Ausgleichsgerade). Über diese

Fehlerkorrektur wird ersichtlich, dass die ermittelten Formfaktoren sehr eng um den für Kugeln charakteristischen Wert von 0,775 streuen. Die Formfaktoren der übrigen Chargen streuen ähnlich um einen Wert von 0,775 und lassen vermuten, dass die Partikel annähernd kugelförmig sind.

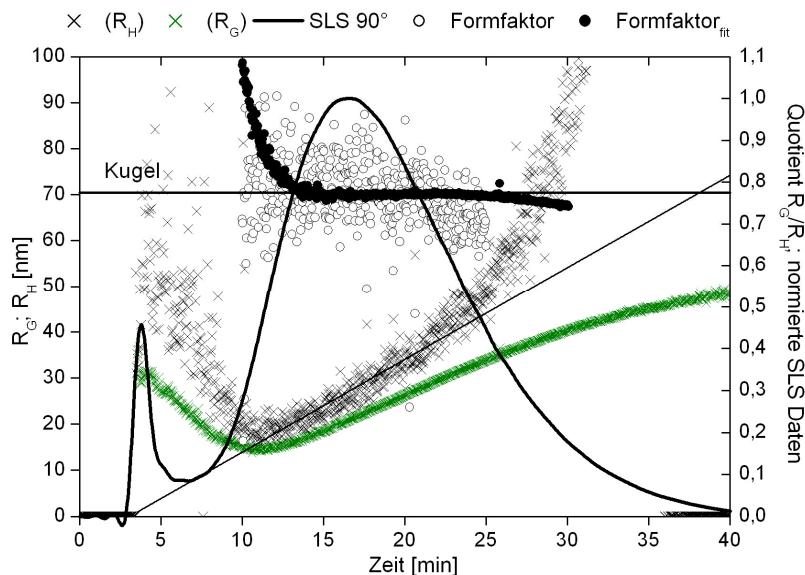


Abb. 32: Darstellung des Formfaktors ( $R_G/R_H$ ) für Charge F (65 nm). Die hydrodynamischen Radien (schwarze Kreuze) und Gyrationradien des MALLS Detektors (grüne Kreuze) sind als Funktion der Zeit aufgetragen. Die Formfaktoren stimmen mit dem theoretischen Wert einer kompakten Kugel (0.775) überein.

#### 4.2.7 Analytische Ultrazentrifugation

Die Teilchengrößen- und Teilchendichteverteilung von vier der SPIO-Chargen wurden mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation untersucht (vgl. Kap. 3.2.5). Die Rohdaten der Sedimentationsprofile in Wasser und in Deuteriumoxid (90 %) sind beispielhaft für die Charge H in Abb. 33 dargestellt.

Die Sedimentationsprofile zeigen eine typische S-Form, wengleich die Sedimentationsfronten nicht scharf ausprägt sind, da die Probe keine definierte Partikelgröße, sondern eine Partikelgrößenverteilung bzw. Polydispersität aufweist (vgl. Anhang Kap. 8.6). Die SPIO-Partikel sedimentieren trotz schwächerem Trennfeld ( $H_2O$ : 5000 vs.  $D_2O$ : 8000 rpm) in Wasser schneller als in 90 %-igem Deuteriumoxid, was auf die niedrigere Dichte des Wassers zurückzuführen ist. Die Differenz der Sedimentationsgeschwindigkeiten in unterschiedlich dichten Medien wird beim Verfahren der Dichtevarianz zur Bestimmung der Teilchengrößen- und Teilchendichteverteilungen ausgenutzt. Die Ergebnisse der Dichtevarianzmethode für die Chargen A (20 nm), C (40 nm), E (60 nm) und H (85 nm) sind in Abb. 34 dargestellt.



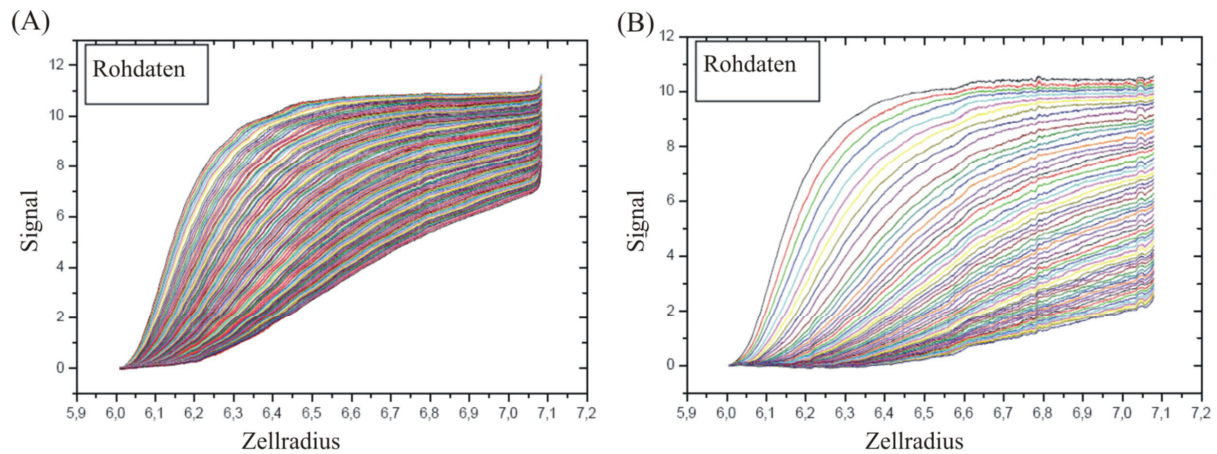


Abb. 33: Dargestellt sind beispielhaft die Rohdaten der analytischen Ultrazentrifugation für die Charge H (85 nm). In (A) sind die Sedimentationsprofile der SPIO-Partikel in Wasser und in (B) in 90 %-igem Deuteriumdioxid dargestellt. Die SPIO-Partikel wurden in beiden Medien 30 min zentrifugiert, jedoch wurde in 90 %-igem Deuteriumdioxid ein stärkeres Trennfeld angelegt (B: 8000 rpm vgl. A in Wasser: 5000 rpm). Trotz des stärkeren Feldes sedimentieren die SPIO-Partikel im dichteren Deuteriumdioxid langsamer.

Alle vier vermessenen Chargen zeigen eine relativ einheitliche und schmale Partikelgrößenverteilung in der AUZ. Die Charge A (20 nm) enthält Partikeldurchmesser zwischen 6 nm und 20 nm und zeigt ein Maximum bei 13 nm. Die Dichteverteilung ist uneinheitlich und steigt von 1,7 g/ml bis auf 2,0 g/ml an. Im Maximum der Verteilung beträgt die Dichte ca. 2 g/ml. Auch die anderen Chargen zeigen eine Dichte von ca. 2 g/ml im Peakmaximum. In der Größenverteilung der Charge C (Abb. 34 C) sind Partikeldurchmesser von 15 nm bis 50 nm enthalten mit einem lokalen Maximum bei 28 nm und einer kleinen Schulter bei 45 nm. Die Partikeldichteverteilung ist relativ breit verteilt (1,5 bis 2,0 g/ml). Die Charge E (60 nm, Abb. 34 E) enthält Partikeldurchmesser von 30 nm bis 80 nm, das Peakmaximum liegt bei 39 nm. Die aus der Dichtevarianz errechnete Partikeldichteverteilung (rot, kleine Punkte geglättete Funktion) der Charge E (60 nm) zeigt einen deutlichen bimodalen Charakter. Das Elugramm der A4F-Untersuchung der Charge E zeigt hingegen keinen bimodalen Charakter (vgl. Abb. 27 E, S. 63). Mögliche Ursachen werden in Kapitel 5.2.4 diskutiert. Die Partikelgrößenverteilung der Charge H (85 nm, Abb. 34 H) zeigt Partikeldurchmesser von 30 nm bis 150 nm, wobei die Größe relativ eng um ein Maximum von 53 nm verteilt ist. Die Teilchengrößen der AUZ werden in Kapitel 5.2.4 mit anderen Methoden verglichen und diskutiert.

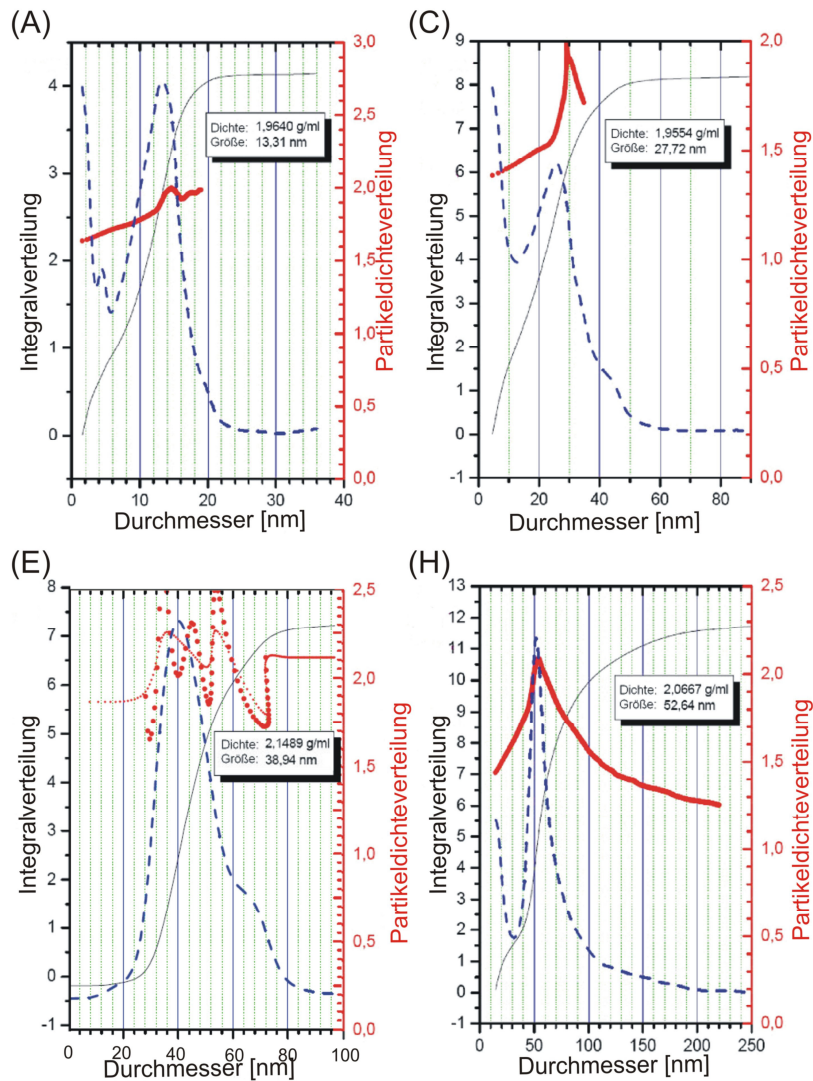


Abb. 34: Dargestellt sind die Teilchengrößen- und Teilchendichteverteilungen nach Dichtevarianzmethode der AUZ für die Chargen A (A), C (C), E (E) und H (H). Die Partikelradien im Peakmaximum nehmen erwartungsgemäß von Charge A nach H hin zu. Die Partikeldichte im Peakmaximum ist für alle untersuchten Chargen ca. 2 g/ml.

#### 4.2.8 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Morphologie und Partikelgröße für vier der hergestellten SPIO-Chargen wurde mit der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM, vgl. Kap. 3.2.6) untersucht.

In Abb. 35 sind verschiedene Zustände der Partikel sichtbar. Zum einen sind kleine Partikel in der Größenordnung von wenigen Nanometern (4–6 nm, Abb. 35, rechts) zu erkennen. Zum anderen sind Zusammenlagerungen von mehreren kleinen Partikeln zu beobachten (~ 10 nm bis 35 nm, Abb. 35, Mitte). Die Untereinheiten bzw. kleinen Primärpartikel werden im Folgenden als *Kristallite* bezeichnet. Die Zusammenlagerungen der Kristallite werden im Folgenden *Aggregate* genannt.

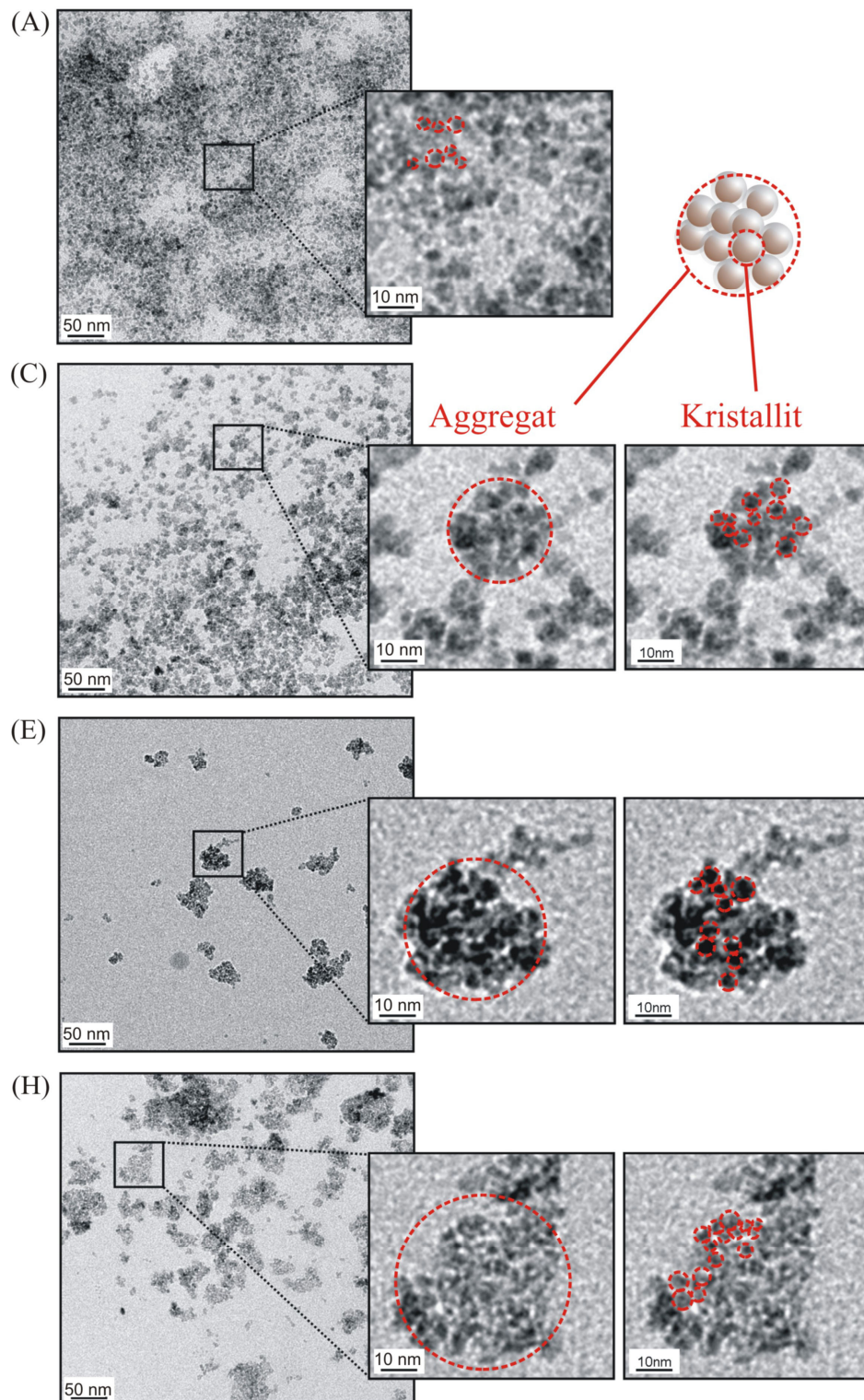


Abb. 35: TEM Aufnahmen der Chargen A (A), C (C), E (E) und H (H). Aus den Übersichtsbildern ist jeweils ein markierter Bereich vergrößert dargestellt. Die SPIO-Chargen bestehen aus Agglomeraten, welche wiederum aus kleinen Kristalliten aufgebaut sind. Beispielhaft sind einige Kristallite und Agglomerate rot eingekreist.

Während der Probenpräparation können auf dem TEM-Grid durch den Trocknungsprozess Zusammenlagerungen von einzelnen Kristalliten oder auch Aggregaten entstehen. Diese Trocknungsartefakte entstehen vor allem bei einer Probenpräparation mit Wasser, da die Partikel durch die hohe Oberflächenspannung des Wassers beim Trocknen sehr stark zusammengezogen werden. Um die Gefahr von Trocknungsartefakten zu minimieren, wurden die Proben mit einem Ethanol/Wasser-Gemisch präpariert (vgl. Kap. 3.2.6). Dennoch ist eine Aussage über die Größe der Partikel bei den meisten TEM-Aufnahmen sehr schwierig, da kaum zu unterscheiden ist, ob die Aggregate bereits in der Dispersion vorlagen oder auf Trocknungsartefakte zurückzuführen sind. So ist es nicht möglich, eine statistisch verlässliche Größenauswertung durchzuführen. Da jedoch mit Hilfe der A4F gezeigt werden konnte, dass die größeren Partikel (Partikelgröße wächst von Charge A bis H) auch in Dispersion vorliegen, wurden für vier Chargen mit Hilfe einer speziellen Software (vgl. Kap. 3.2.6) orientierende Werte sowohl für die Kristallitgrößen als auch für die Aggregatgrößen errechnet (Tab. 10). Beispielhaft sind die ausgewerteten Kristallite und Aggregate der TEM-Bilder für die Charge C im Anhang (Abb. A 7, S. 128) dargestellt.

Tab. 10: Ungefähre Kristallit- und Agglomeratgrößen nach Transmissionselektronenmikroskopie für vier der hergestellten Chargen.

<i>Charge</i>	<i>TEM Gesamtdurchmesser</i> $d_{gesamt}^{1)}$	<i>TEM Kristallitgröße</i> $d_{Kristallit}$
Charge A (20 nm)	$4,5 \pm 0,9$ nm	Identisch mit $R_{TEM}$
Charge C (40 nm)	$9,4 \pm 3,8$ nm	$3,8 \pm 1,4$ nm
Charge E (60 nm)	$35,2 \pm 10,2$ nm	$4,6 \pm 1,4$ nm
Charge H (85 nm)	$36,0 \pm 5,4$ nm	$5,4 \pm 1,0$ nm
1) Radius $\pm$ Standardabweichung, Methodenbeschreibung: Kapitel vgl. 3.2.6		

Die TEM-Aufnahmen der Charge B zeigen auffällig große Agglomerate (Abb. 36 B, weiße Pfeile). Allein aus dem Bild kann allerdings nicht abgeleitet werden, ob es sich um Agglomerate handelt, die tatsächlich auch in der Lösung vorhanden sind oder ob es sich um Trocknungsartefakte handelt, die während der Probenvorbereitung der TEM-Untersuchung entstanden sind. Werden die TEM-Ergebnisse jedoch zusammen mit den A4F-Ergebnissen betrachtet, so ist es jedoch nahe liegend, dass die sichtbaren Aggregate im TEM tatsächlich auch in Lösung vorhanden sind und es sich nicht um Artefakte handelt. Die TEM-Untersuchung bestätigt damit die Ergebnisse der A4F.

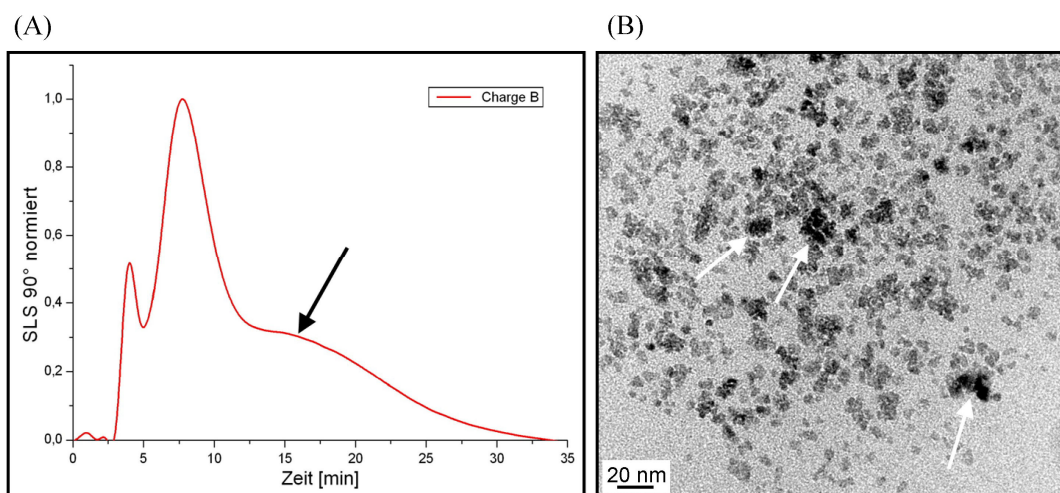


Abb. 36: **(A)** Elugramm der Charge B (30 nm) nach Trennung mit der asymmetrischen Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung. In der TEM-Aufnahme der Charge B **(B)** sind einige sichtbare Agglomerate mit weißen Pfeilen markiert. Da die Aggregate auch in der A4F sichtbar sind, handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht um Trocknungsartefakte die während der TEM-Probenvorbereitung entstanden sind.

#### 4.2.9 Kleinwinkel-Röntgenstreuung

Die Chargen A, C, E und H wurden mittels Kleinwinkel-Röntgenstreuung (SAXS) gemessen. Die vier SPIO-Chargen wurden *in situ* in Kapillaren vermessen. Aufgrund der hohen Streukraft der Partikel wurden die Fraktionen 1:100 (v/v) mit Wasser verdünnt (vgl. Kap. 3.2.7). Anzeichen für Veränderungen des Streuverhaltens, beispielsweise durch Ablagerungen an der Kapillarwand, während der Messungen waren nicht zu verzeichnen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Streukurven für die Nanopartikel in Lösung repräsentativ sind und potentielle Präparationsartefakte unwahrscheinlich sind.

Repräsentative Streukurven für die vier vermessenen Chargen sind in Abb. 37 dargestellt. Wie die Streukurven zeigen, nehmen die Streuintensitäten in der Reihe Charge A (20 nm) bis Charge H (85 nm) zu kleinen Streuvektoren hin zu ( $q < 0.1 \text{ nm}^{-1}$ ). Dies entspricht erwartungsgemäß einer Zunahme der Partikelgröße. Im Gegensatz dazu weisen alle Streukurven einen recht ähnlichen Verlauf im Bereich großer Streuvektoren von  $0,4 < q < 2 \text{ nm}^{-1}$  auf. Dies weist darauf hin, dass auf kleiner Längenskala (kleiner ca. 5 nm) ähnliche Strukturen in allen Proben vorliegen. Eine gewisse Ausnahme stellt die Charge A (20 nm) dar. Hier ist, verglichen mit den übrigen Chargen, die Streukurve ( $q > 0,4 \text{ nm}^{-1}$ ) in Richtung größerer Streuvektoren verschoben. Das heißt, die kleinsten Strukturelemente sind bei der Charge A anscheinend etwas kleiner als bei den übrigen Chargen.

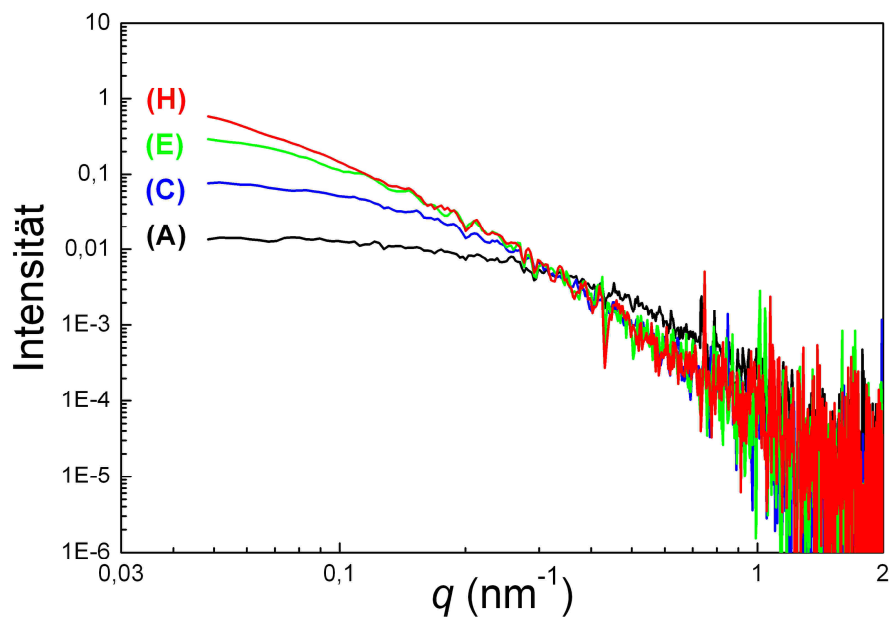


Abb. 37: Streuintensitäten als Funktion des Streuvektors für die Chargen A (**A**), C (**C**), E (**E**) und H (**H**). Bei kleinen Streuvektoren ( $q < 0,1 \text{ nm}^{-1}$ ) nehmen die Streuintensitäten erwartungsgemäß mit der Partikelgröße von Charge A bis H hin zu. Bei großen Streuvektoren ( $0,4 < q < 2 \text{ nm}^{-1}$ ) hingegen weisen alle Streukurven einen recht ähnlichen Verlauf auf. Das weist darauf hin, dass die Proben auf kleiner Längenskala (kleiner 5 nm) ähnliche Strukturen vorweisen. Eine gewisse Ausnahme stellt die Charge A dar, hier ist die Streukurve leicht in Richtung größerer Streuvektoren verschoben.

Einfache Partikelstrukturen wie die von homogenen Kugeln lassen sich anhand des Streuverhaltens ausschließen. In diesem Fall müsste die gesamte Streukurve mit zunehmender Größe zu kleineren Streuvektoren hin verschoben sein. Es ergeben sich somit verschiedene komplexere Strukturen, die die Streukurven erklären können.

*Hypothese 1:* Es liegen zahlreiche kleine Partikel neben größeren Partikeln in der Lösung vor (vgl. Abb. 67 A, S. 105). *Hypothese 2:* Die größeren Partikel bestehen aus Aggregaten kleinerer Primärpartikel (vgl. Abb. 67 B). Eine zweifelsfreie Unterscheidung zwischen beiden Fällen ist nur in Kombinationen mit anderen Analysemethoden wie z.B. TEM, A4F und AUZ möglich und wird ausführlich in Kapitel 5.2.6 diskutiert.

Eine Größenbestimmung der Partikel ist bei Vernachlässigung eventuell vorhandener Partikel mit sehr kleiner Größe ( $q > 0,2$  bzw. Radius  $< 5 \text{ nm}$ ) möglich. Für alle vier Proben wurden entsprechende Anpassungsrechnungen durchgeführt (vgl. Kap. 3.2.7 und 8.4). Die Streukurven und die verwendeten Modellkurven (Anpassungsrechnungen) sind in Abb. 38 dargestellt.

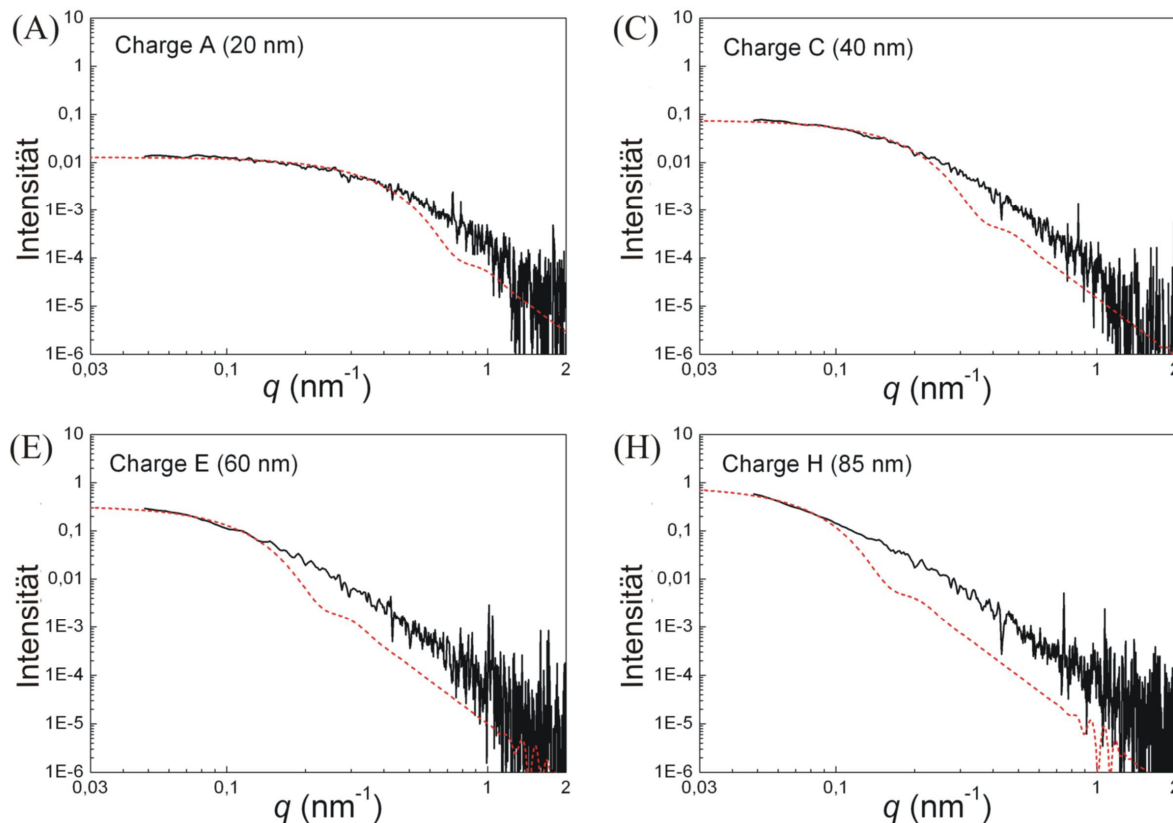


Abb. 38: Dargestellt sind die Ergebnisse der Kleinwinkelstreuexperimente für vier ausgewählte Partikelchargen: Charge A **(A)**, Charge C **(C)**, Charge E **(E)** und Charge H **(H)**. Die Berechnung der Radien erfolgte unter Vernachlässigung eventuell vorhandener Partikel mit sehr kleiner Größe (Radius  $< 5$  nm) und unter der Annahme, dass die Partikelgrößen eine Gauß-Verteilung aufweisen sowie dass es sich um kugelförmige Eisenoxidpartikel handelt (vgl. Kap. 3.2.7 und 8.4). Die Polydispersitäten wurden in den Modellrechnungen mit 0,2 als festem Wert festgelegt. Die Kurvenanpassung erfolgte für die kleinen Streuvektoren, in (A) für  $0,05 < q < 0,9 \text{ nm}^{-1}$ , in (C) für  $0,05 < q < 0,3 \text{ nm}^{-1}$ , in (E) für  $0,05 < q < 0,2 \text{ nm}^{-1}$  und in (H) für  $0,05 < q < 0,1 \text{ nm}^{-1}$ . Es ergeben sich mittlere Radien von  $5,3 \pm 0,5$  nm (Charge A),  $11,0 \pm 0,5$  nm (Charge C),  $17,5 \pm 0,5$  nm (Charge E) und  $24,5 \pm 0,5$  nm (Charge H).

Es ergeben sich mittlere Radien von  $5,3 \pm 0,5$  nm (Charge A),  $11,0 \pm 0,5$  nm (Charge C),  $17,5 \pm 0,5$  nm (Charge E) und  $24,5 \pm 0,5$  nm (Charge H). Um vergleichbare Aussagen für die Partikelgrößen zu erhalten, wurde in den Modellrechnungen für die Polydispersitäten 0,2 als fester Wert für alle vier Chargen eingesetzt. Wie bereits erwähnt, wurden dabei eventuell vorhandene kleine Partikel vernachlässigt. Offensichtlich ist, dass die gemessenen Streukurven im Bereich der größeren Streuvektoren zunehmend von den Modellrechnungen abweichen. Die Intensitäten der Modellkurven liegen unterhalb der Messkurven. Dies ist erklärbar, wenn z. B. davon ausgegangen wird, dass sich die Nanopartikel aus zahlreichen kleineren Primärpartikeln zusammensetzen. Auswertungen, die

diesen besonderen Aspekt berücksichtigen, sind in der Literatur bereits beschrieben, sind allerdings sehr aufwendig und konnten hier nicht angewandt werden[182].

Um jedoch die aus den Modellrechnungen erhaltenen Größen einem unabhängigen Test zu unterziehen, eignen sich modellfreie Auswerteverfahren. Im vorliegenden Fall ist neben Modellrechnungen eine modellfreie Volumenbestimmung der Nanopartikel möglich. Der massengewichtete Mittelwert der Volumina der Nanopartikel ergibt sich durch den Ausdruck [183]:

$$V = 2\pi^2 \frac{I(q=0)}{Q} \quad (\text{Gl. 31})$$

Dabei wird  $I(q=0)$  aus der Extrapolation der gemessenen Streuintensität nach  $q=0$  erhalten und  $Q$  ist die Invariante der Streukurve (auch Streukraft genannt). Die Invariante ist gleich dem Integral:

$$Q = \int_0^{\infty} q^2 I(q) dq \quad (\text{Gl. 32})$$

und kann unmittelbar aus der Streukurve bestimmt werden, sofern der Messbereich einen hinreichend weiten  $q$ -Bereich umfasst. Die durchgeführten Messungen umfassen einen hinreichend weiten  $q$ -Bereich, so dass die Invariante der Streukurve unmittelbar aus der Streukurve bestimmt werden kann (Abb. 39).

Mittels dieser modellfreien Volumenbestimmung von Nanopartikeln ergeben sich mittlere Volumina von  $612 \text{ nm}^3$  (Charge A, 20 nm),  $5008 \text{ nm}^3$  (Charge C, 40 nm),  $14026 \text{ nm}^3$  (Charge E, 60 nm) und  $32530 \text{ nm}^3$  (Charge H, 85 nm). Unter der Annahme von sphärischen Partikeln lassen sich daraus über die einfache Beziehung  $V = 4/3\pi R^3$  die Partikelradien berechnen. Damit ergeben sich Radien von  $5,2 \pm 0,3 \text{ nm}$  (Charge A),  $10,6 \pm 0,5 \text{ nm}$  (Charge C),  $15,0 \pm 0,5 \text{ nm}$  (Charge E) und  $19,8 \pm 0,5 \text{ nm}$  (Charge H). Die Ergebnisse stimmen gut mit den aus den Kurvenanpassungen bestimmten Radien überein. Der Aufbau der SPIO-Partikel und die Ergebnisse der SAXS-Messungen werden ausführlich in Kapitel 5.2.6 diskutiert.



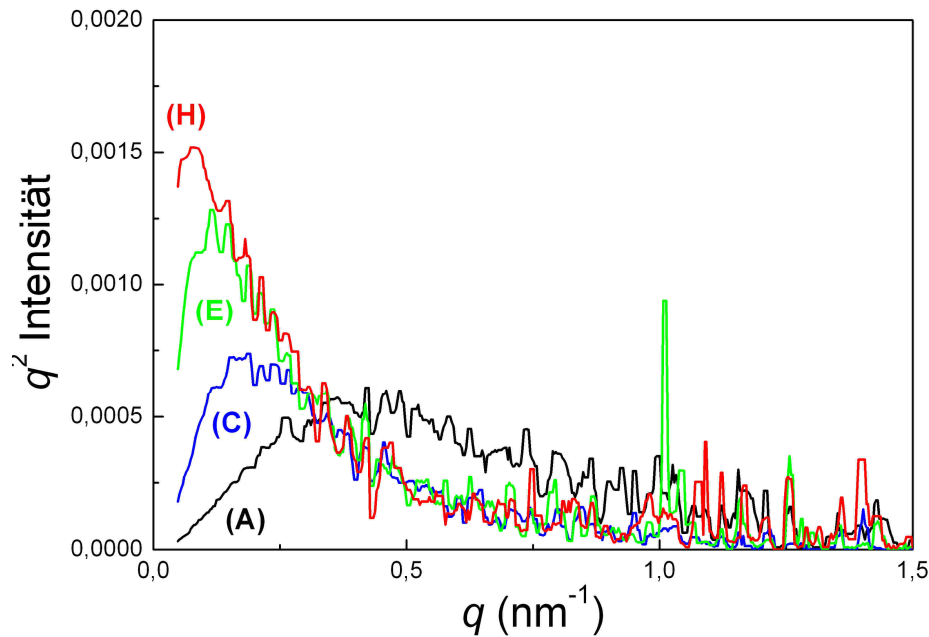


Abb. 39: Kratky-Darstellung der Streuintensitäten als Funktion des Streuvektors für die Chargen A bis H. Die Flächen unter den Kurven entsprechen den Invarianten („Streukraft“) der Nanopartikel (vgl. Gl. 32). Diese wurden numerisch bestimmt.

### 4.3 Magnetische und bildgebende Eigenschaften der SPIO-Formulierungen

#### 4.3.1 Messungen mit der supraleitenden Quanteninterferenzeinheit

Die magnetischen Eigenschaften der hergestellten Partikelchargen wurden mit Hilfe einer supraleitenden Quanteninterferenzeinheit (Superconducting Quantum Interference Device SQUID, Kap. 3.3.1) bestimmt. Die angefertigten Glasküvetten zeigen ein geringfügiges diamagnetisches Verhalten. Daher wurde eine Leermessung für die Korrektur der Messdaten durchgeführt (Hintergrund, Anhang Abb. A 3, S. 126). Ausgehend von den Signalstärken der Magnetisierung (emu) wurde anhand der genauen Einwaage die spezifische Magnetisierung in emu/g Eisen berechnet. Repräsentative M/H-Kurven für alle acht hergestellten Chargen sind in Abb. 40 dargestellt.

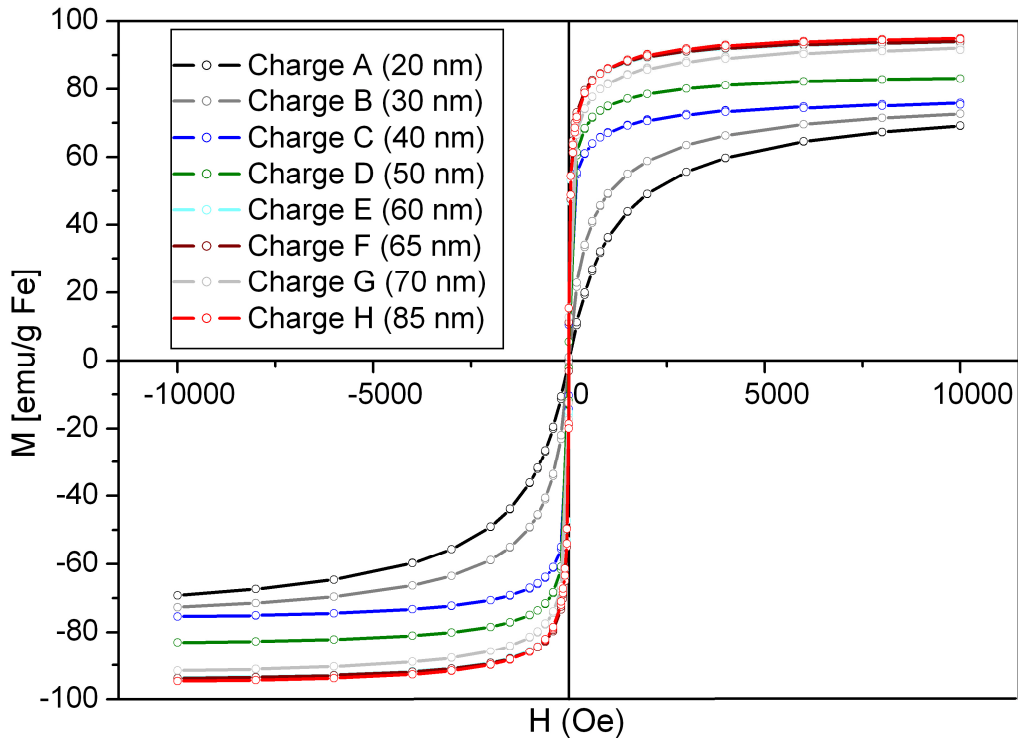


Abb. 40: Hysteresekurven (M/H-Kurven) der hergestellten SPIO-Chargen. Dargestellt ist die Veränderung der Magnetisierung der SPIO-Partikel (emu/g Eisen) mit steigender Feldstärke (vgl. Kap. 2.2.2). Keine der hergestellten Chargen weist in Lösung eine Restmagnetisierung (Remanenz, vgl. Abb. 6, S. 11) auf, was auf einen superparamagnetischen Charakter der SPIO-Partikel bei Raumtemperatur schließen lässt. Die Magnetisierbarkeit der Partikel steigt erwartungsgemäß mit zunehmender Partikelgröße an.

Bereits bei niedrigen Feldstärken erreichen die SPIO-Partikel nahezu ihre Sättigungsmagnetisierung (vgl. Kap. 4.3.2), was durch einen steilen Anstieg im Nullpunkt deutlich wird. Ab einem Partikeldurchmesser von 60 nm erreichen die SPIO-Partikel bereits bei 0,5 Tesla (5000 Oe) fast ihre Sättigungsmagnetisierung. Die M/H-Kurve der Charge A (20 nm) ist verglichen mit der der Charge H (85 nm) deutlich flacher, da die Magnetisierbarkeit der Partikel mit der Partikelgröße ansteigt. Nach Abschalten des Magnetfeldes bzw. bei einer Feldstärke von Null fallen alle Kurven steil ab und verlaufen durch den Nullpunkt. Bei Raumtemperatur (300 K) weisen die SPIO-Partikel demzufolge keine Restmagnetisierung (Remanenz) auf, wie es für ferri- oder ferromagnetische Partikel typisch wäre (vgl. Abb. 6, S. 11). Alle hergestellten SPIO-Chargen zeigen demnach, wie für die MRT-Bildgebung angestrebt, in wässriger Suspension bei Raumtemperatur superparamagnetisches Verhalten (vgl. Abb. 8, S. 13). Die SPIO-Chargen sind damit als potente Kontrastmittel in der MRT einsetzbar.

### 4.3.2 Sättigungsmagnetisierungen

Aus dem Verlauf der gemessenen M/H-Kurven (Abb. 40) wird ersichtlich, dass die SPIO-Chargen bereits bei niedrigen Feldstärken fast vollständig magnetisiert sind und schnell ein Magnetisierungsplateau erreicht wird. Für die folgenden durchgeführten *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen bei 1,5 und 3,0 Tesla kann davon ausgegangen werden, dass die Partikel der SPIO-Chargen vollständig magnetisiert sind.

Zur Berechnung der Sättigungsmagnetisierungen wurden die SQUID-Messwerte mit Hilfe der Langevin-Funktion gefittet (vgl. Gl. 9 und Gl. 10, S. 12). Auffällig ist die Abweichung der Langevin-Ausgleichsgeraden bei höheren Magnetfeldstärken (1T ~ 10000 Oersted, Abb. 41). Dieser Effekt ist jedoch bekannt und wurde bereits von Bulte *et. al.* beschrieben [45]. Demnach ist zusätzlich eine zweite Komponente mit einem kleinen magnetischen Moment ( $M_2$ ) enthalten. Die Gesamtmagnetisierung  $M$  setzt sich wie folgt zusammen:

$$M = Ms_1 \cdot L(\alpha) + Ms_2 \cdot L(\alpha) \quad (\text{Gl. 33}).$$

Dabei beschreibt  $Ms_1$  die Sättigungsmagnetisierung, welche durch Maghemit- oder Magnetitkerne hervorgerufen wird.  $Ms_2$  beschreibt die Sättigungsmagnetisierung, welche durch eine zweite Komponente mit kleinerem magnetischen Moment hervorgerufen wird [45]. Der Unterschied zwischen den einfachen und bifunktionellen Langevin-Funktionen ist in Abb. 41 dargestellt.

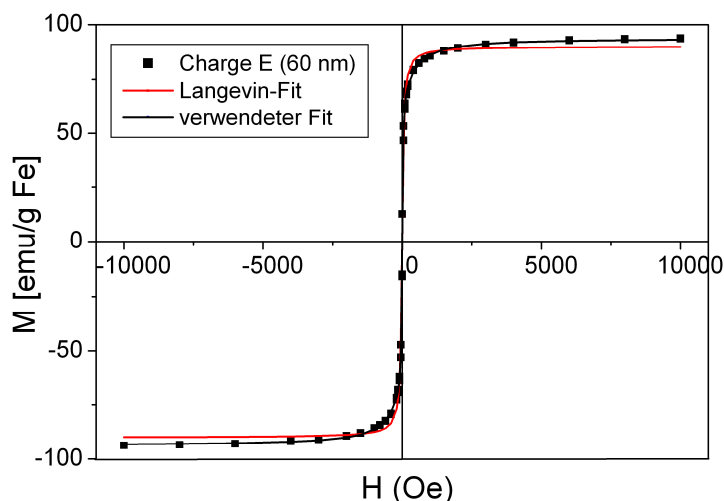


Abb. 41: Magnetisierung der Charge E als Funktion der Magnetfeldstärke. Dargestellt ist neben den Messpunkten (schwarz) der einfache Langevin-Fit im Vergleich zum verwendeten Fit nach Gl. 33, der sich zusammensetzt aus der Magnetisierung der Maghemit- oder Magnetitkerne und einer Komponente mit kleinerem magnetischen Moment.

Die bifunktionelle Langevin-Ausgleichsgerade passt sehr gut zu den gemessenen Datenpunkten. Die daraus errechneten Sättigungsmagnetisierungen der hergestellten Chargen

sind in Abb. 42 dargestellt. Demnach steigt die Gesamt-Sättigungsmagnetisierung bis zu einem hydrodynamischen Durchmesser von  $\sim 60$  nm (Charge E) exponentiell an und erreicht dann einen konstanten Wert von  $\sim 94$  emu/g Eisen (emu = electro magnetic unit). Eine tabellarische Übersicht der errechneten Sättigungsmagnetisierungen ist im Anhang dargestellt (vgl. Kap. 8.8). Werden die Sättigungsmagnetisierungen der einzelnen Komponenten ( $Ms_1$  und  $Ms_2$ ) betrachtet, so ist mit zunehmender hydrodynamischer Partikelgröße ein Anstieg der Sättigungsmagnetisierungen  $Ms_1$  zu beobachten, während  $Ms_2$  abfällt. Das heißt, bei kleineren Partikelchargen ist der Einfluss der zweiten Komponente mit einem kleineren magnetischen Moment noch relativ groß, während er bei Chargen mit zunehmender Partikelgröße abnimmt (vgl. Abb. 42,  $Ms_2$  schwarz).

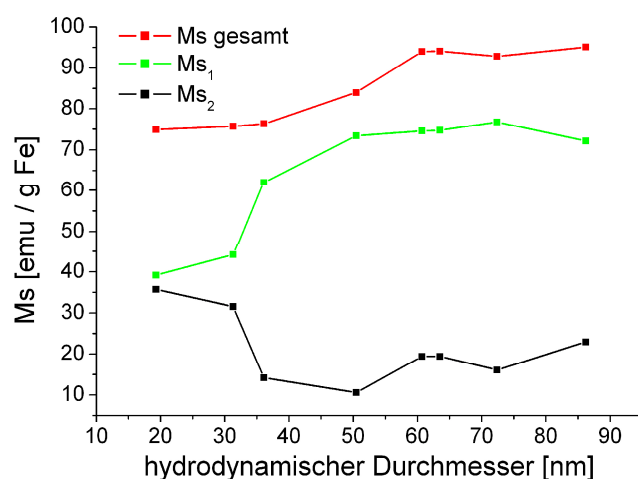


Abb. 42: Die Gesamt-Sättigungsmagnetisierung ( $Ms$ ) steigt bis zu einem Partikeldurchmesser von 60 nm an und erreicht dann annähernd ein Plateau. Die Sättigungsmagnetisierung, welche durch den Maghemit- bzw. Magnetitkern hervorgerufen wird ( $Ms_1$ ), steigt bis ca. 50 nm an und erreicht dann ein Plateau. Die zweite Komponente ( $Ms_2$ ) mit einem kleineren magnetischen Moment ist vor allem für kleine Partikelgrößen von Bedeutung.

### 4.3.3 Magnetische Suszeptibilitäten

Die magnetische Suszeptibilität wurde mit Hilfe einer MSB-Waage (Magnetic Susceptibility Balance) bestimmt (vgl. Kap. 3.3.2). Definiert ist die magnetische Suszeptibilität pro Gramm ( $\chi_{mass}$ ) als Änderung der Magnetisierung der Materie mit dem angelegten Magnetfeld (vgl. Gl. 4 und Gl. 5, S. 8).

Die Suszeptibilitäten ( $\chi_{mass}$ ) für die hergestellten SPIO-Chargen sind in Abb. 43 dargestellt. Die Suszeptibilität steigt mit der Partikelgröße an, bis sie bei größeren Partikeln eine Sättigung erreicht. Um die ermittelten Suszeptibilitäten unabhängig bestätigen zu können, wurden neben den acht hergestellten SPIO-Formulierungen (schwarz) weitere zehn SPIO-Fraktionen mit unterschiedlichen Größen hergestellt (grau, Abb. 43).

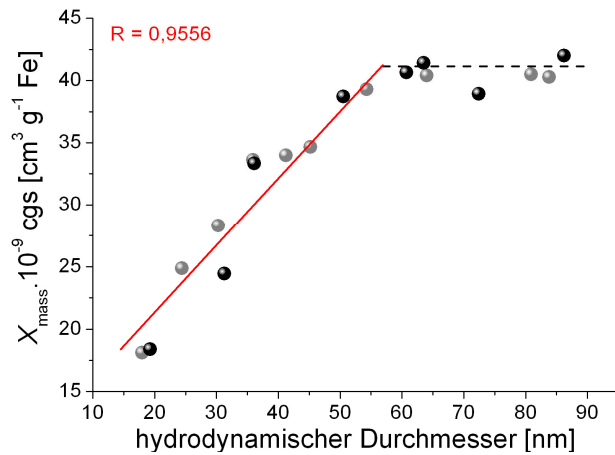


Abb. 43: Dargestellt sind die magnetischen Suszeptibilitäten (pro Gramm Eisen) für die acht hergestellten SPIO-Formulierungen (schwarz) und zehn weitere SPIO-Fractionen unterschiedlicher Partikelgrößen (grau). Die Suszeptibilitäten nehmen vorerst kontinuierlich zu, bis sie dann bei ca. 60 nm ein Plateau erreichen.

Auch anhand der SQUID-Messungen können die Suszeptibilitäten errechnet werden. In den M/H-Kurven der untersuchten Chargen (vgl. Abb. 40) entspricht die initiale Suszeptibilität (Anfangssuszeptibilität,  $\chi_i$ ) der Steigung der Magnetisierung im Nullpunkt (vgl. Anhang Kap. 8.9, S. 127) [21].

Eine Gegenüberstellung der Ergebnisse der MSB-Waage und der SQUID-Messungen für die acht hergestellten Chargen ist in Abb. 44 dargestellt. Zu beachten ist, dass die MSB-Waage die magnetische Massenssuszeptibilitäten bestimmt, während das errechnete  $\chi_V$  aus den SQUID-Daten die Volumenssuszeptibilität angibt. Beide Suszeptibilitäten entsprechen der Anfangssuszeptibilität ( $H \rightarrow 0$ , vgl. Kap. 8.9) und zeigen, dass die Suszeptibilitäten bis zu einer hydrodynamischen Partikelgröße von 60 nm ansteigen und dann eine Sättigung erreichen.

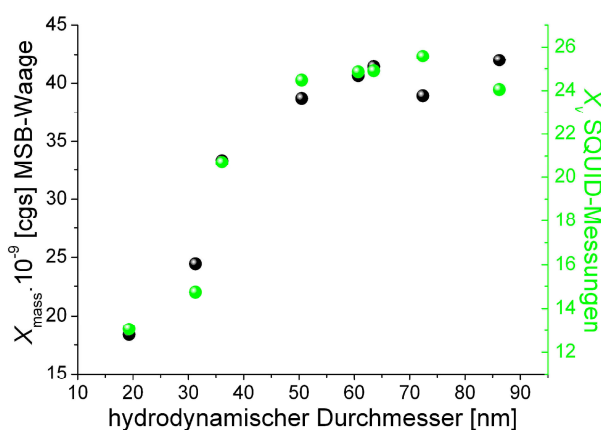


Abb. 44: Gegenüberstellung der Suszeptibilitäten errechnet anhand der SQUID-Messungen (grün) und Ergebnisse der MSB-Waage (schwarz, vgl. Abb. 43). Beide Methoden zeigen eine Zunahme der Suszeptibilitäten bis zu einer hydrodynamischen Partikelgröße von rund 60 nm und erreichen dann eine Sättigung.

#### 4.3.4 $R_1$ - und $R_2$ -Relaxivitäten

Die zur Berechnung der Relaxivitäten erforderlichen  $T_1$ - und  $T_2$ -Zeiten wurden bei 1,41 Tesla mit Hilfe eines MiniSpec mq 60 bestimmt (vgl. Kap. 3.3.3). Beispielhaft sind die Ergebnisse für die  $T_2$ -Zeiten in Abb. 45 dargestellt.

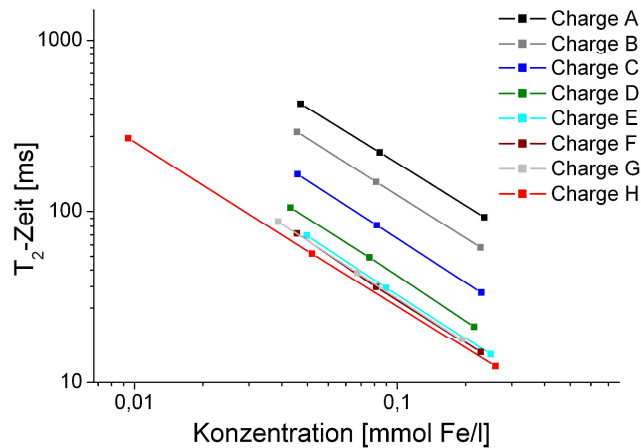


Abb. 45: Dargestellt sind die  $T_2$ -Zeiten der hergestellten SPIO-Chargen bei unterschiedlichen Eisenkonzentrationen. Die  $T_2$ -Zeiten wurden bei 1,41 Tesla mit einer CPMG-Sequenz bei 40 °C bestimmt. Bis zu einem Partikeldurchmesser von 60 nm (Charge E) fallen die  $T_2$ -Zeiten kontinuierlich ab und bleiben dann bei größeren Partikelchargen (Charge E bis H, 60 nm bis 85 nm) annähernd konstant.

Für einen Konzentrationsbereich von  $\sim 10$  bis 300  $\mu\text{mol}$  Eisen pro Liter wurde ein linearer Zusammenhang zwischen Konzentration des SPIO-Kontrastmittels und der Relaxationszeit experimentell bestimmt (Steigung minus eins). Demnach ist eine Umrechnung in die konzentrationsunabhängige Relaxivität möglich (Gl. 3, S. 8). Die Relaxivitäten der unterschiedlichen Partikelgrößen in Wasser und Plasma (Ratte) bei 40 °C sind in Abb. 46 dargestellt.

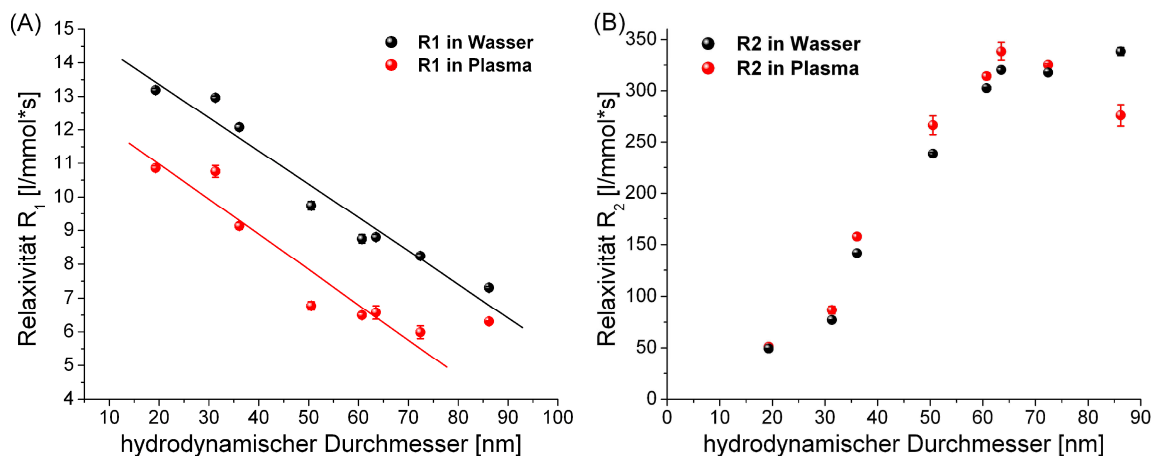


Abb. 46: Dargestellt sind die longitudinalen (A) und transversalen (B) Relaxivitäten in Abhängigkeit von der Partikelgröße der SPIO-Chargen in Plasma und Wasser. Wie zu erwarten, nehmen die  $R_1$ -Relaxivitäten in Plasma und in Wasser mit zunehmender Partikelgröße ab, während die  $R_2$ -Relaxivitäten zunehmen (vgl. Abb. 13, S. 19).

Die  $R_1$ -Relaxivitäten der SPIO-Chargen nehmen mit zunehmender Partikelgröße leicht ab (in Wasser von 13,2 auf 7,3  $\text{L}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Wesentlich stärker ist der Einfluss der Partikelgröße auf die  $T_2$ -Relaxationszeit bzw.  $R_2$ -Relaxivität. Der genaue Zusammenhang zwischen der  $R_2$ -Relaxivität und der hydrodynamischen Größe ist jedoch, ausgehend von den acht hergestellten Chargen (vgl. Abb. 46 B), nicht genau zu ermitteln. Denkbar wäre z.B., ausgehend von den acht Punkten, ein linearer wie auch ein sigmoidaler Zusammenhang. Deshalb wurden (analog Kap. 4.3.3) weitere zehn Partikelgrößen vermessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 47 dargestellt. Demnach steigt die Relaxivität  $R_2$  bis zu einem Partikeldurchmesser von ca. 60 nm linear an und erreicht dann ein Plateau.

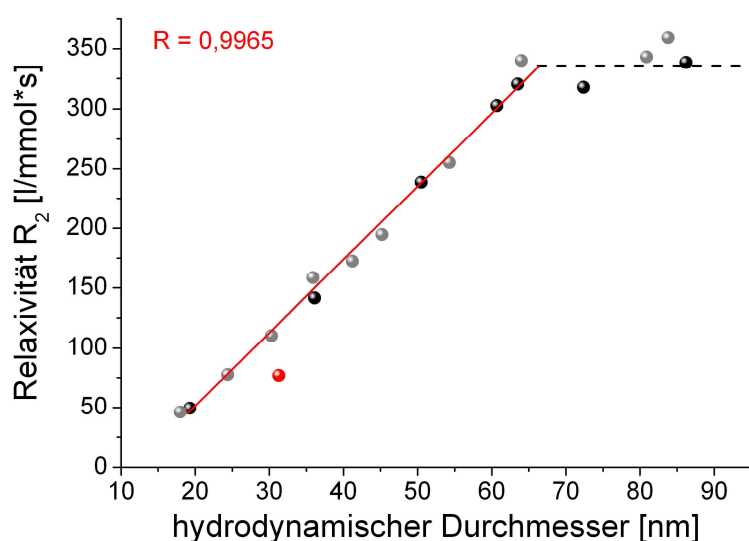


Abb. 47: Darstellung der  $R_2$ -Relaxivitäten in Abhängigkeit von der Partikelgröße. Bis zu einem Partikeldurchmesser von ca. 60 nm steigen die  $R_2$ -Relaxivitäten linear an. Ab ca. 60 nm erreichen die  $R_2$ -Relaxivitäten ein Plateau. Die Charge B (rot) wurde aufgrund ihres bimodalen Charakters (vgl. Abb. 28, S. 64) nicht mit in die lineare Regression eingerechnet.

#### 4.3.5 MRT-Phantom-Messung

Zur Korrelation der spektroskopischen Relaxivitätsmessungen mit bildgebenden Verfahren wurden die hergestellten SPIO-Chargen als Phantom an einem klinischen Scanner bei 1,5 Tesla vermessen (vgl. Kap. 3.3.4). Das Ergebnis der  $T_2$ -gewichteten Spinechosequenz ist in Abb. 48 dargestellt. Die SPIO-Chargen wurden bei einer Konzentration von 0,1 mmol Eisen pro Liter vermessen.

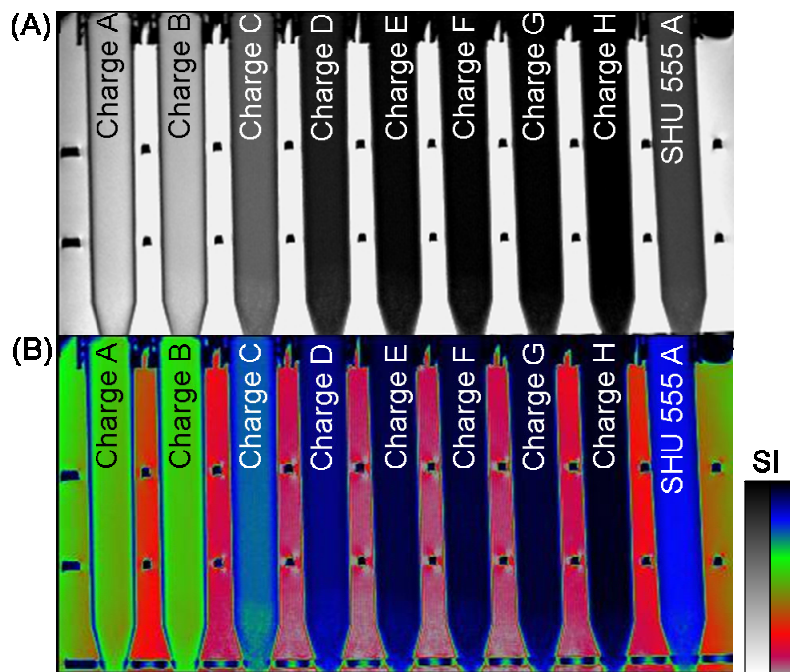


Abb. 48: Phantom-Messung der hergestellten SPIO-Chargen im Magnetresonanztomographen bei 1,5 Tesla. Es wurde mit einer  $T_2$ -gewichteten Spinechosequenz mit transversaler Schichtausrichtung gemessen (TE 184 ms, TR 4340 ms, Schichtdicke 7,0 mm, Aquisitionszeit 7 min 2 s). (A) Original MRT-Aufnahme und (B) Fehlfarbandarstellung entsprechend der angegebenen Skala.

Deutlich erkennbar ist, dass die  $T_2$ -Zeitverkürzungen mit der Größe der Partikel zunehmen. Die Signalintensitäten nehmen bis zu einer Partikelgröße von ca. 60 nm (Charge E) ab und bleiben dann annähernd konstant. Die Chargen D bis H verkürzen die  $T_2$ -Relaxationszeiten der Protonen stärker als das Marktprodukt SHU 555 A. Der Kurvenverlauf der relativen Signaländerungen gegenüber der Partikelgröße zeigt deutlich, dass die Daten der MRT-Phantomuntersuchung gut mit den ermittelten  $R_2$ -Relaxivitäten korrelieren (vgl. Abb. 47).

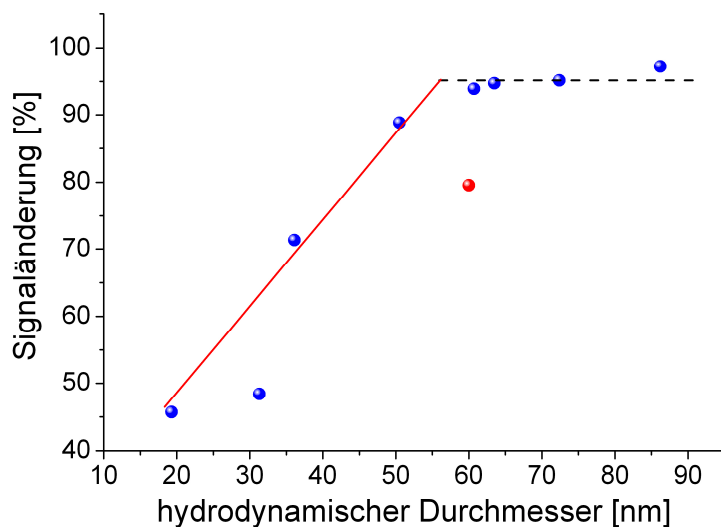


Abb. 49: Dargestellt sind die aus der Phantom-Messung (Abb. 48) errechneten relativen Signaländerungen im MRT mit zunehmender SPIO-Partikelgröße. SHU 555 A ist rot markiert.



#### 4.4 *In vitro* Zellversuche mit den hergestellten SPIO-Formulierungen

##### 4.4.1 Aufnahme der SPIO-Chargen in P388-Zellen

Es ist bekannt, dass die Pharmakokinetik von SPIO-Partikeln stark von der Partikelgröße abhängt (vgl. Kap. 2.3.4). Die SPIO-Partikel werden *in vivo* von den Zellen des mononukleären Phagozytensystems (MPS) aufgenommen. Die Maus-Zelllinie P388 verhält sich ähnlich wie die Makrophagen des MPS und ist als *in vitro* Modell sehr gut geeignet, um den Einfluss der Partikelgröße genauer untersuchen zu können.

In diesem Kapitel wird die Aufnahme der SPIO-Chargen in P388-Zellen (vgl. Kap. 3.4.1) in Abhängigkeit von ihrer Partikelgröße untersucht. Die Zellen wurden dazu jeweils eine Stunde mit den SPIO-Chargen inkubiert und anschließend, nach Berliner Blau Färbung (10 min) und Kernechtrot-Gegenfärbung (30 s), lichtmikroskopisch untersucht (vgl. Kap. 3.4.2). Die lichtmikroskopischen Aufnahmen für die Chargen A bis H sind in Abb. 50 dargestellt.

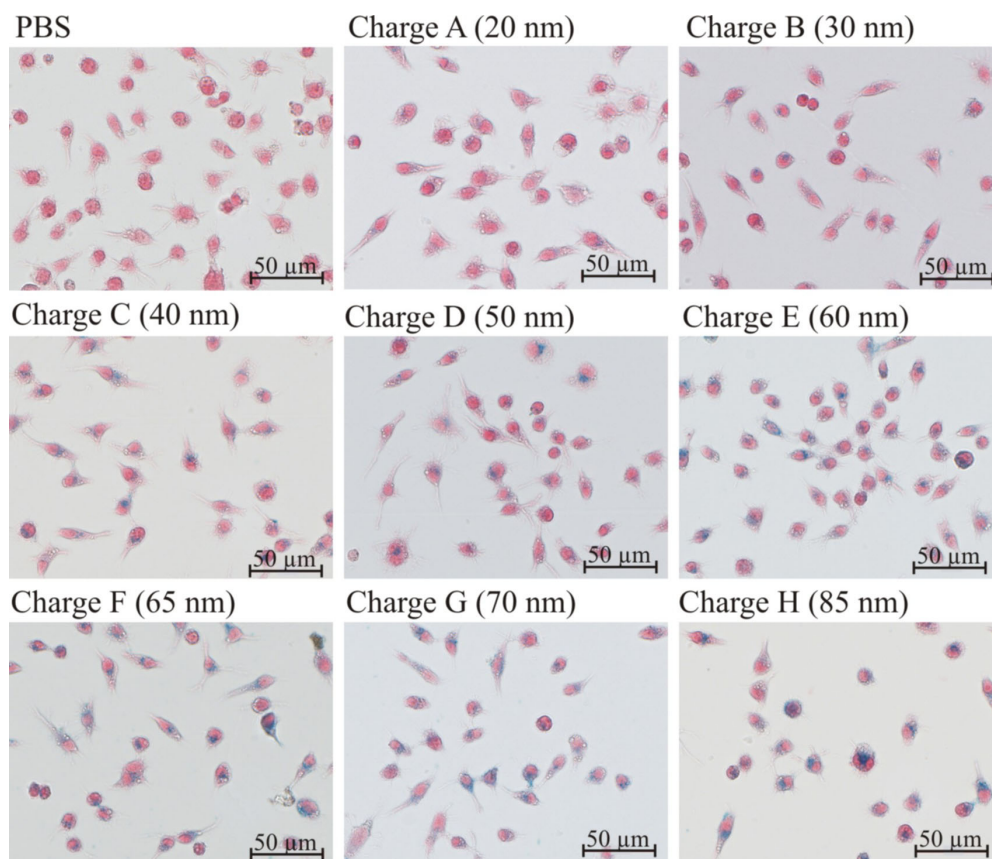


Abb. 50: Mikroskopische Aufnahmen von P388-Zellen nach einstündiger Inkubation mit verdünnten SPIO-Chargen (300 µM) unterschiedlicher Partikelgrößen. Das Eisen in den Zellen wurde mittels Berliner Blau Färbung (10 min) angefärbt, als Gegenfärbung für die Zellkerne wurde Kernechtrot (30 s) verwendet. Mit zunehmender Partikelgröße ist eine verstärkte Blaufärbung zu erkennen.

Der Versuch wurde für alle Chargen zusätzlich bei 4 °C (Kühlschrank) durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Zellen die SPIO-Partikel aktiv aufnehmen. Während eine unspezifische Adsorption weitgehend temperaturunabhängig ist, ist die aktive Aufnahme stark temperaturabhängig, da der Stoffwechsel der Zellen bei niedrigen Temperaturen fast vollständig inaktiv ist. Es konnte gezeigt werden, dass die stoffwechsellinaktiven Zellen keine SPIO-Partikel aufnehmen (Abb. 51). Auf eine Gegenfärbung mit Kernechtrot wurde bei dieser Untersuchung verzichtet. Eindeutig erkennbar ist, dass nach Berliner Blau Färbung die bei 4 °C inkubierten Zellen keine Blaufärbung zeigen (Abb. 51, obere Zeile). Das ist ein klarer Hinweis darauf, dass keine unspezifische Adsorption der SPIO-Partikel an der Zelloberfläche stattfindet, sondern die P388-Zellen die SPIO-Partikel bei 37 °C aktiv phagozytieren.

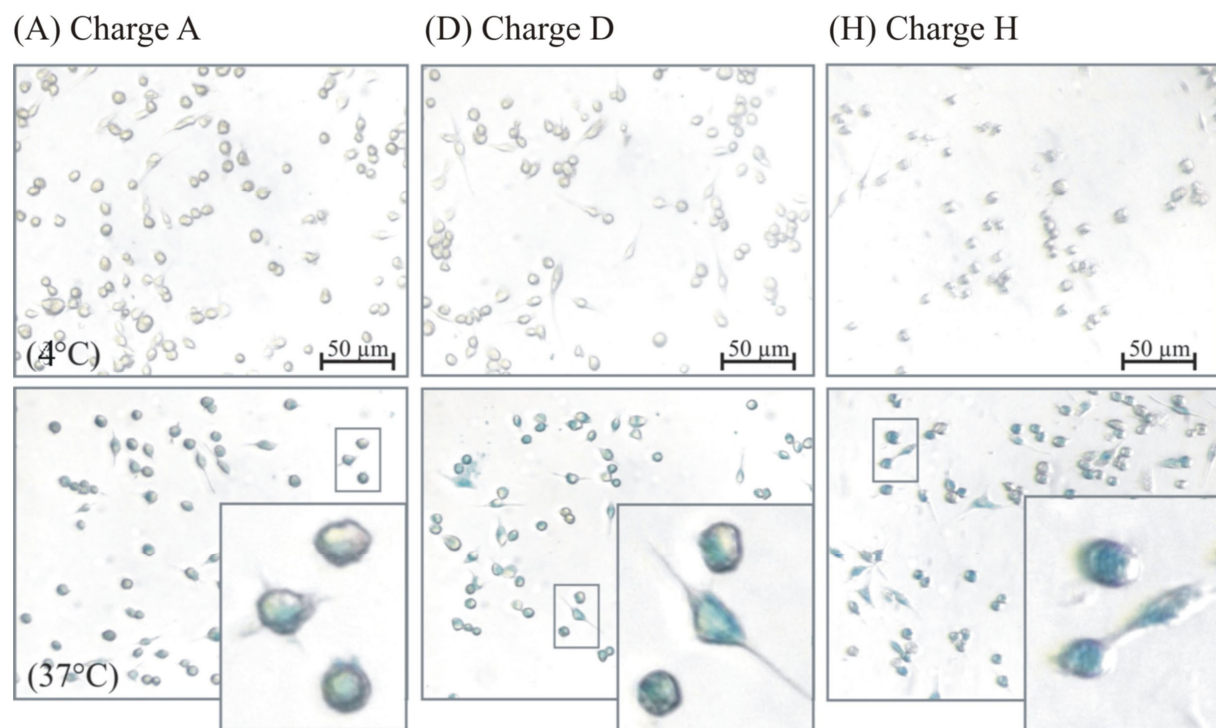


Abb. 51: Lichtmikroskopische Untersuchung von P388-Zellen nach einstündiger Inkubation mit den verdünnten SPIO-Chargen (300 µM Fe) bei 4 °C (obere Zeile) und 37 °C (untere Zeile). In **(A)** ist Charge A (20 nm), in **(D)** Charge D (50 nm) und in **(H)** Charge H (85 nm) dargestellt. Bei 37 °C ist nach Berliner Blaufärbung bei allen SPIO-Chargen eine deutliche Blaufärbung zu erkennen. Bei 4 °C ist hingegen keine Blaufärbung zu sehen, da die P-388 Zellen bei so niedriger Temperatur weitgehend stoffwechsellinaktiv sind und die SPIO-Partikel nicht phagozytiert werden.

Eine quantitative Abhängigkeit der Zellaufnahme von der Partikelgröße ist anhand der Bilder nicht eindeutig erkennbar. Um diesen Aspekt genauer untersuchen zu können, wurde

der Eisengehalt in den Zellen über eine Phenanthrolinfärbung photometrisch bestimmt (vgl. Kap. 3.4.3). Die Ergebnisse der quantitativen Eisenaufnahme sind in Abb. 52 dargestellt.

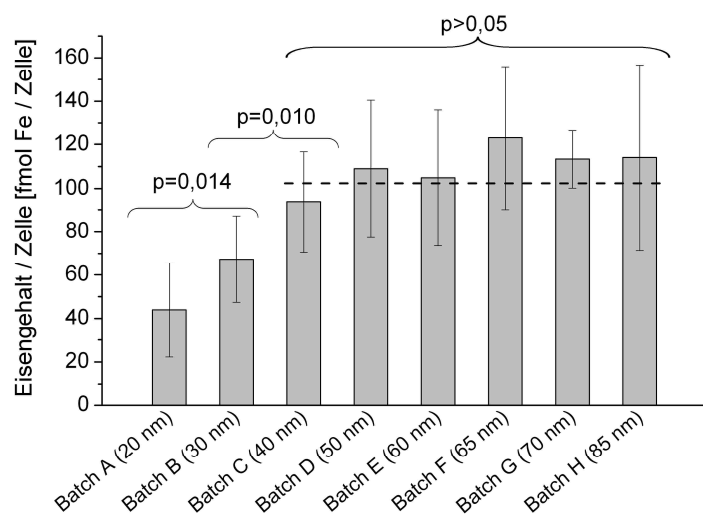


Abb. 52: Quantitative Bestimmung der Eisenaufnahme in P388-Zellen in Abhängigkeit von der Partikelgröße. Bis zu einem Partikeldurchmesser von 40 nm steigt der Eisengehalt in den Zellen an und erreicht dann ein Plateau.

Die Mittelwerte der Chargen A, B und C unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ ). Der Anstieg zwischen Charge C und D ist hingegen mit  $p = 0,221$  nicht signifikant. Die quantitative Eisenmenge pro Zelle steigt demnach bis zu einem Partikeldurchmesser von 40 nm kontinuierlich an und erreicht dann, bei einem Wert von ca. 100 fmol Eisen / Zelle, ein Maximum. Zu bedenken ist, dass die quantitative Eisenmenge pro Zelle keine Auskunft darüber gibt, wie viele SPIO-Partikel tatsächlich von den P-388 Zellen phagozytiert wurden. Denn mit zunehmender Partikelgröße steigt das Volumen ( $r^3 \sim V$ ) und die damit aufgenommene Eisenmenge pro Partikel stark an. Eine theoretisch errechnete Partikelanzahl pro Zelle und ein möglicher Mechanismus der SPIO-Aufnahme werden ausführlich in Kapitel 5.4 diskutiert.

#### 4.4.2 MRT-Zellphantom-Messung

Neben der quantitativen Eisenbestimmung in den Zellen wurde zusätzlich eine Phantom-Messung durchgeführt (vgl. Kap. 3.4.4). Zur Vermeidung einer Sedimentation während der MRT-Untersuchung wurden die P388-Zellen in 1 %-igem Agarosegel vermessen. Die Ergebnisse der  $T_2$ -gewichteten Spinechosequenz sind in Abb. 53 dargestellt.

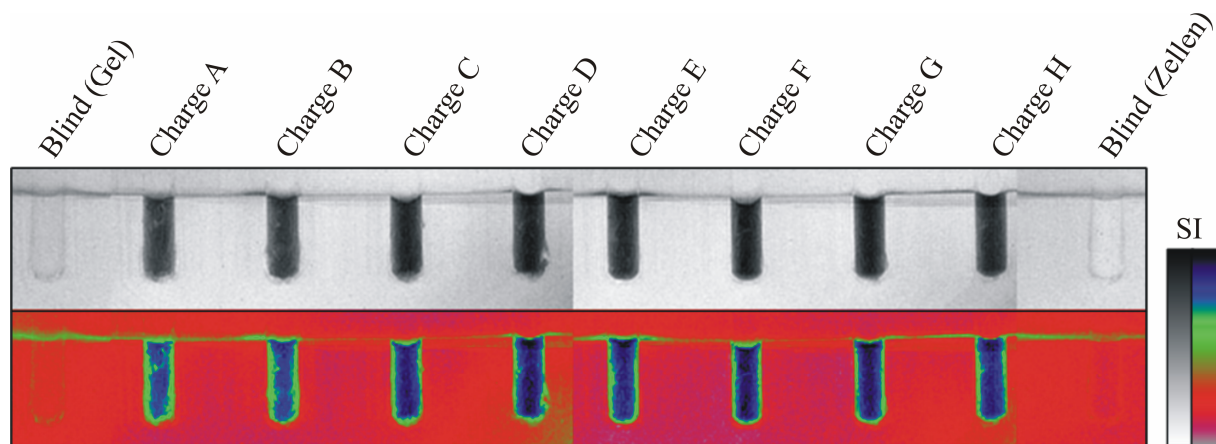


Abb. 53:  $T_2$ -gewichtete MRT-Phantom-Messung mit SPIO-Partikeln beladenen P388-Zellen (vgl. Kap. 3.4.4). In der oberen Reihe sind die originalen MRT-Aufnahmen und in der unteren Reihe die Fehlfarbdarstellungen entsprechend der angegebenen Farbskala dargestellt. Die Zellen, die zuvor mit den SPIO-Chargen inkubiert wurden, zeigen im Vergleich mit dem Gel ein stark verändertes Signal im MRT. Die Signaländerung ist auf die phagozytotische Aufnahme der SPIO-Partikel in die P388-Zellen zurückzuführen.

Als Blindprobe wurde die P388-Zelllinie bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$ , anstelle der SPIO-Chargen, mit PBS (+) inkubiert (vgl. Kap. 3.4.4). Erwartungsgemäß gibt die Blind-Zellprobe (Abb. 53, rechts), verglichen mit dem umgebenden Gel, im MRT kein verändertes Signal. Die mit den SPIO-Chargen inkubierten Zellen hingegen zeigen eine starke  $T_2$ -Zeitverkürzung. Die  $T_2$ -Zeitverkürzung ist auf die phagozytotische Aufnahme von SPIO-Partikeln in die P388-Zellen zurückzuführen. Zur Quantifizierung der SPIO-Partikel Aufnahme in die Zellen wurde die relative Signaländerung (nach Gl. 26, S. 50) ausgewertet (Abb. 54):

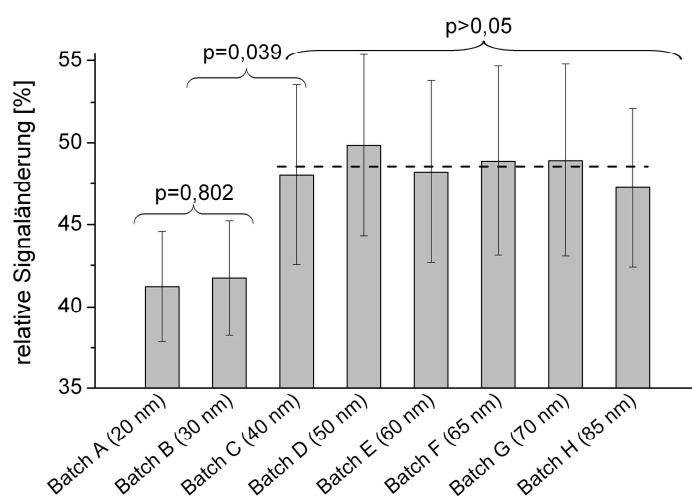


Abb. 54: Auswertung der relativen Signaländerung nach Inkubation von P388-Zellen mit SPIO-Chargen unterschiedlicher Partikelgrößen. Die Mittelwerte der Chargen B und C unterschieden sich signifikant ( $p < 0,05$ ). Die Unterschiede der relativen Signaländerungen der Chargen C bis H sind nicht signifikant.

Die relative Signaländerung liegt für die untersuchten Chargen zwischen 41 % und 50 %. Die Unterschiede der relativen Signaländerungen der Chargen C bis H sind nicht

signifikant. Auch die Mittelwerte der Chargen A und B zeigen keine signifikanten Unterschiede. Lediglich die Signaländerung zwischen Charge B und C ist signifikant ( $p = 0,039$ ). Die MRT-Zellphantom-Messung ist empfindlich gegenüber unterschiedlichen Relaxivitäten und nur bedingt quantifizierbar. Der Trend ist trotz alledem vergleichbar mit der komplexometrischen Quantifizierung (vgl. Abb. 52, S. 88). Auffällig ist besonders die Charge B, deren relative Signaländerung sich nicht signifikant von der Charge A unterscheidet ( $p > 0,05$ ). Laut A4F-Untersuchung besitzt die Charge B eine bimodale Partikelgrößenverteilung mit einem großen Anteil an kleinen Partikeln und einem geringen Anteil größerer Aggregate (vgl. Abb. 28; S. 64). Aufgrund des hohen Anteils an kleinen Partikeln in der Charge B ist die Relaxivität niedriger als nach hydrodynamischem Durchmesser zu erwarten (vgl. Abb. 47, S. 84). Die geringere Relaxivität ist mit hoher Wahrscheinlichkeit der Grund, warum die Signaländerung nach Aufnahme in P388-Zellen im MRT etwas erniedrigt ist.

#### 4.5 *In vivo* Charakterisierung der SPIO-Formulierungen

##### 4.5.1 *Bluthalbwertszeit*

Die Methode zur Bestimmung der Bluthalbwertszeiten ist in Kapitel 3.5.4 beschrieben. Es wurden vier der hergestellten SPIO-Formulierungen untersucht. Die Formulierungen wurden intravenös über die Schwanzvene der Ratte appliziert. Für die MRT-Bildgebung wurde eine  $T_2^*$ -gewichtete Gradientenechosequenz mit transversaler Schichtausrichtung verwendet. Ausgewertet wurde die Signalintensität im stark durchbluteten Nierenkortex. Exemplarisch sind die MRT-Bilder der Charge A (20 nm) in Abb. 55 dargestellt.

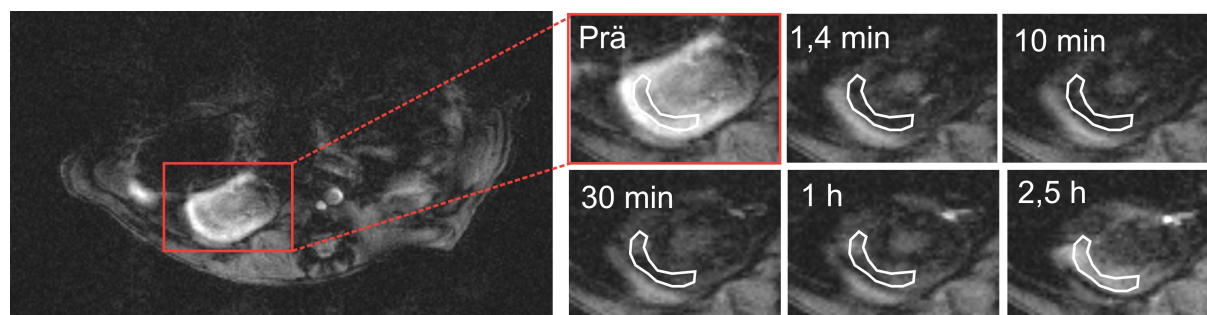


Abb. 55: MRT-Aufnahmen vor und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Applikation der Charge A (20 nm) bei der Ratte. Für die MRT-Bildgebung wurde eine  $T_2^*$ -gewichtete Gradientenechosequenz mit transversaler Schichtausrichtung verwendet (vgl. Kap. 3.5.4). Die Signalintensität im Nierenkortex wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Kontrastmittel-Applikation gemessen. Die ausgewertete Region (Region of interest, ROI) ist weiß dargestellt.

Die Tiere zeigten nach Applikation der SPIO-Formulierungen keine Auffälligkeiten. Wie in Abb. 55 erkennbar, sinkt nach i.v. Applikation der SPIO-Chargen die Signalintensität im Nierenkortex. Mit abnehmender SPIO-Partikelkonzentration im Blut steigt die Signalintensität im MRT mit der Zeit wieder an. Aufgrund der langen Bluthalbwertszeit im Falle der Charge A ist auch 2,5 Stunden nach KM-Gabe die Signalintensität noch erniedrigt gegenüber dem Ausgangswert vor KM-Gabe. Aus dem Quotienten der Signalintensitäten im Nierenkortex vor und nach Kontrastmittelgabe (vgl. Gl. 27, S. 52) wurden entsprechend eines Einkompartimentmodells (Reaktionskinetik erster Ordnung) die Bluthalbwertszeiten errechnet. Die Änderungen der Signalintensitäten nach Gabe der Chargen A, C, E und H sind beispielhaft für je eine Ratte in Abb. 56 A dargestellt.

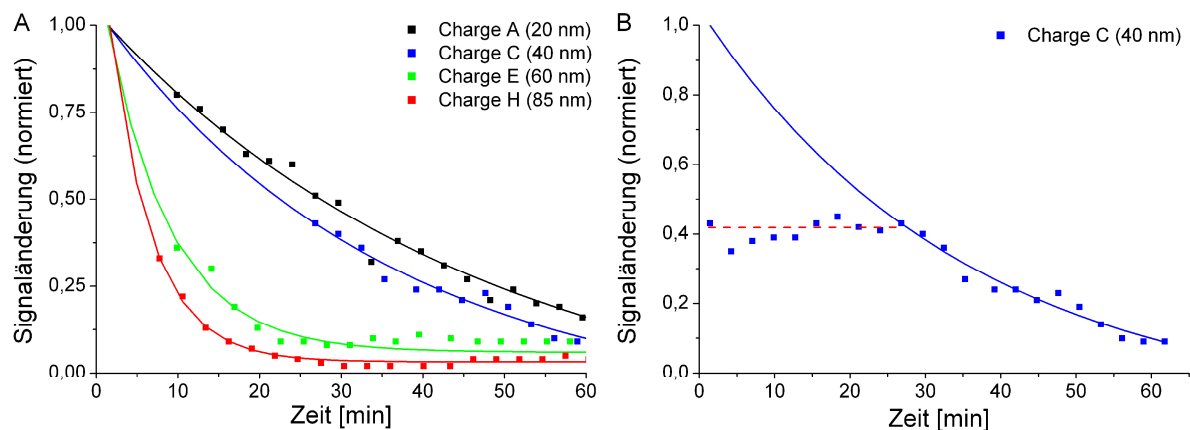


Abb. 56: (A) Änderung der Signalintensitäten im Nierenkortex nach Applikation der Chargen A (20 nm), C (40 nm), E (60 nm) und H (85 nm) für je eine untersuchte Ratte. Für die MRT-Bildgebung wurde eine  $T_2^*$ -gewichtete Gradientenechosequenz mit transversaler Schichtausrichtung verwendet (vgl. Kap. 3.5.4). (B) Ausgewertet wurde dabei bei allen Chargen nur der abfallende Teil der Signaländerung. Beispielhaft sind die Daten der Charge C dargestellt. Bei einer Dosierung von  $100 \mu\text{mol/kg}$  KG (Charge C, E und H) ist die  $T_2^*$  Zeit für die ersten Zeitpunkte maximal verkürzt (Plateau, rot markiert). Diese Daten wurden zur Berechnung der Bluthalbwertszeit nicht mit einbezogen.

Die Ausgleichsgeraden wurden über die kleinsten Fehlerquadrate errechnet. Zur besseren Vergleichbarkeit sind die dargestellten exponentiellen Abnahmen auf eins normiert worden. Die Signalintensitäten für die ersten Zeitpunkte sind annähernd konstant. Begründet werden kann dies mit der hohen Konzentration an SPIO-Partikeln im Blutkreislauf. Wenn die Konzentration der SPIO-Partikel im Blut so hoch ist, dass die  $T_2$ -Zeit aller umgebenden Protonen bereits verkürzt ist, kann auch durch eine weitere Erhöhung der Konzentration (Dosierung) keine bessere Bildqualität mehr erreicht werden. Im vorliegenden Fall ist die SPIO-Partikelkonzentration im Nierenkortex zu Beginn so hoch, dass sich selbst durch die

Eliminierung der Partikel aus dem Blutkreislauf vorerst keine Signalerhöhung bemerkbar macht. Erst wenn noch weitere SPIO-Partikel aus der Blutbahn eliminiert werden, steigt die Signalintensität langsam wieder an bzw. die Änderung der Signalintensitäten (vgl. Gl. 27, S. 52) fällt langsam wieder gegen Null ab (Abb. 56 B). Die ersten Messzeitpunkte wurden daher nicht zur Berechnung der Ausgleichsgeraden mit herangezogen.

Die nach Regressionsanalyse errechneten Bluthalbwertszeiten für die untersuchten Chargen sind in Abb. 57 zusammengefasst.

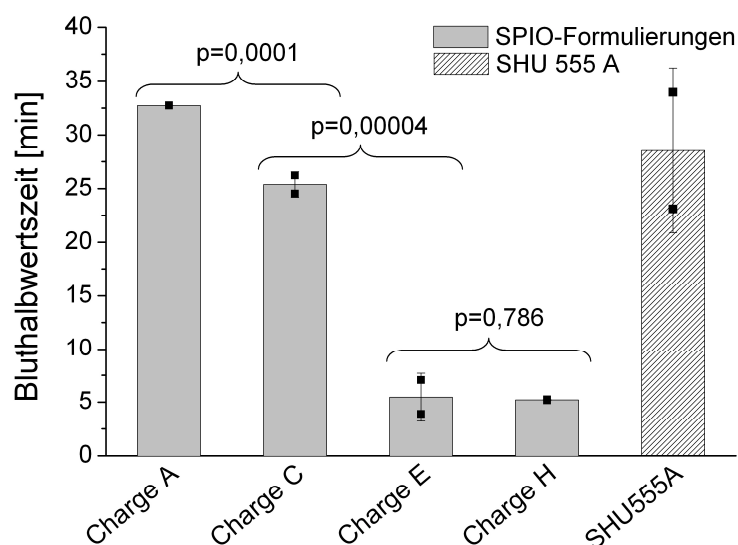


Abb. 57: Bluthalbwertszeiten von vier SPIO-Formulierungen im Vergleich zu SHU 555 A. Es wurde eine  $T_2^*$ -gewichtete Gradientenecho-Sequenz (vgl. Kap. 3.5.4) verwendet. Die Bluthalbwertszeiten verkürzen sich mit zunehmender Partikelgröße. Die Chargen E (60 nm) und H (85 nm) unterscheiden sich nicht signifikant.

Die größeren Chargen C (40 nm), E (60 nm) und H (85 nm) zeigen im Vergleich zu Charge A (20 nm) signifikant kürzere Bluthalbwertszeiten ( $p < 0,05$ ). Deutlich erkennbar ist, dass die Bluthalbwertszeiten mit zunehmender Partikelgröße zunächst stark abnehmen und dann ab ca. 60 nm annähernd konstant bleiben. Der Unterschied zwischen den Bluthalbwertszeiten von Charge E und H ist nicht signifikant (vgl. 60 nm: 5,5 min und 85 nm: 5,2 min,  $p = 0,79$ ). Die Bluthalbwertszeiten von Charge E und SHU 555 A unterscheiden sich hingegen signifikant ( $p = 0,01$ ).

#### 4.5.2 Leberhalbwertszeit

Neben der Bestimmung der Bluthalbwertszeiten wurden auch die Leberhalbwertszeiten der hergestellten Formulierungen bestimmt (vgl. Kap. 3.5.5). Die SPIO-Formulierungen wurden mit einer Dosierung von  $35 \mu\text{mol/kg}$  Körpergewicht intravenös über die Schwanzvene der Ratten appliziert.

Die applizierten SPIO-Chargen verursachen eine starke Abnahme der Signalintensitäten in der Leber. Beispielhaft sind in Abb. 58 die MRT-Aufnahmen des

Abdomens für eine der untersuchten Ratten vor und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Applikation der Charge E (60 nm) dargestellt. Neben den originalen MRT-Aufnahmen ist entsprechend der angegebenen Skala zusätzlich eine Fehlfarbandarstellung abgebildet (Abb. 58, untere Reihe).

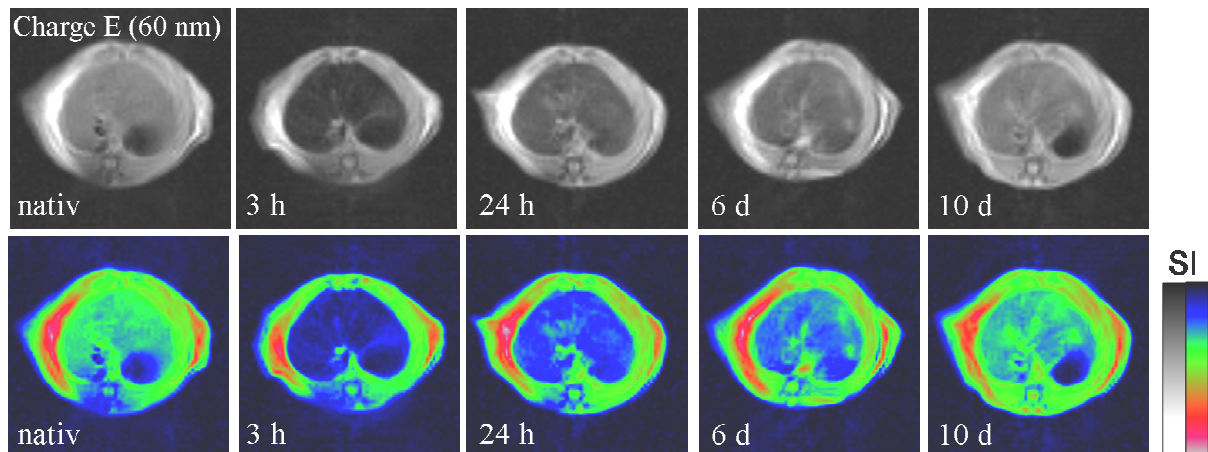


Abb. 58: MRT-Bilder des Abdomens der Ratte vor und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach i.v. Applikation der Charge E (60 nm). Es wurde eine  $T_2$ -gewichtete CPMG-Sequenz (vgl. Kap. 3.5.5) verwendet. Die Signalintensitäten nehmen nach Applikation des Kontrastmittels stark ab. In der unteren Reihe sind die MRT-Bilder als Fehlfarbandarstellung entsprechend der angegebenen Skala dargestellt.

Die MRT-Aufnahmen der Leber vor und nach intravenöser Applikation der Chargen A, C und H sind beispielhaft für je eine Ratte in Abb. 59 dargestellt.

Die dargestellten MRT-Bilder in Abb. 58 und Abb. 59 sind mit einer Echozeit (TE) von 12,9 ms aufgenommen. Jede CPMG-Sequenz wurde jedoch mit 32 verschiedenen Echozeiten gemessen (TE von 12,9 bis 412,8 ms), so dass die  $T_2$ -Zeiten daraus errechnet werden konnten. Zur Bestimmung der Leberhalbwertszeiten wurden die Änderungen der Relaxationsraten (vgl. Gl. 28, S. 53) zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Kontrastmittelapplikation ausgewertet.



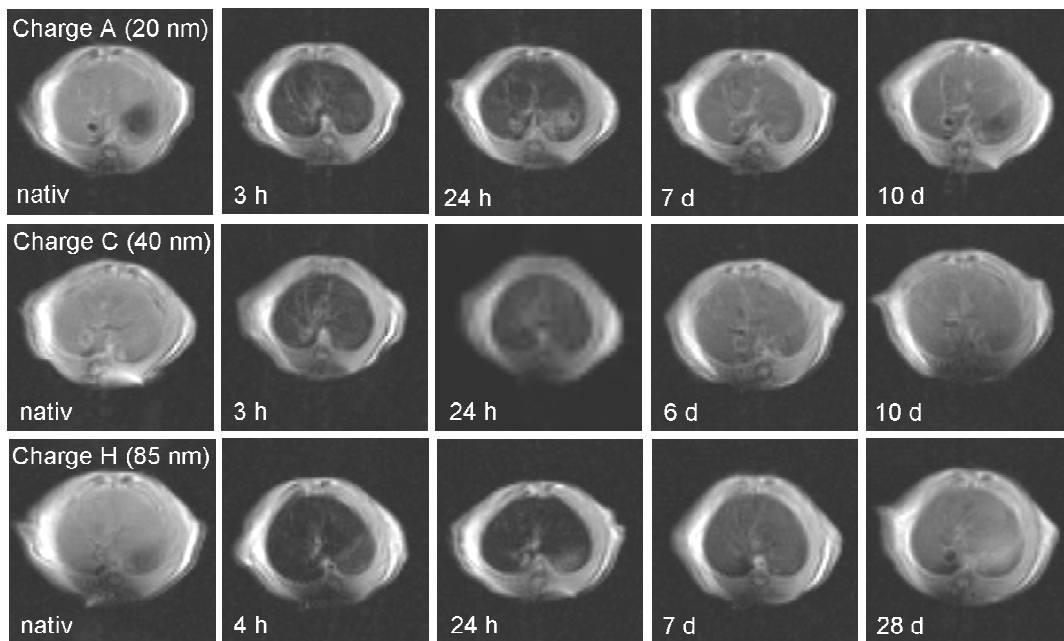


Abb. 59: Abdomen-MRT-Bilder für je eine der untersuchten Ratten vor und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach i.v. Applikation der Chargen A (20 nm), C (40 nm) und H (85 nm). Es wurde eine  $T_2$ -gewichtete CPMG-Sequenz (vgl. Kap. 3.5.5) verwendet. Nach Applikation der SPIO-Partikel nehmen die Signalintensitäten in der Leber stark ab. Durch die Metabolisierung bzw. Umwandlung der SPIO-Partikel in MRT-inaktive Metabolite nimmt die Signalintensität mit der Zeit wieder zu.

Die Abnahme der Relaxationsraten ( $1/T_2$ -Zeit) ist beispielhaft für die Charge A ( $n = 3$ ) in Abb. 60 dargestellt.

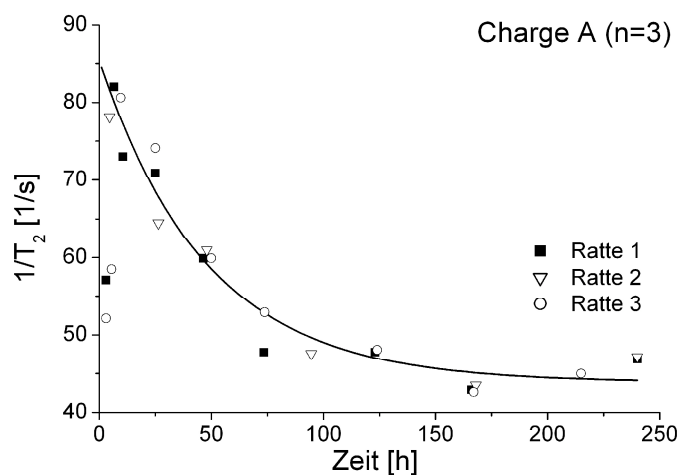


Abb. 60: Dargestellt sind die Änderungen der Relaxationsraten ( $1/T_2$ -Zeit) in der Leber für drei Ratten nach Applikation der Charge A. Für die MRT-Bildgebung wurde eine  $T_2$ -gewichtete CPMG-Sequenz (vgl. Kap. 3.5.5) verwendet.

Die aus den Regressionsanalysen errechneten Leberhalbwertszeiten für die Chargen A, C, E und H sind in Abb. 61 zusammengefasst. Der Anstieg der Leberhalbwertszeiten mit der

Partikelgröße ist dabei nicht signifikant ( $p > 0,05$ ). Auch die Leberhalbwertszeit der Charge A (20 nm) verglichen mit Charge H (85 nm) ist nicht signifikant kürzer ( $p = 0,21$ ).

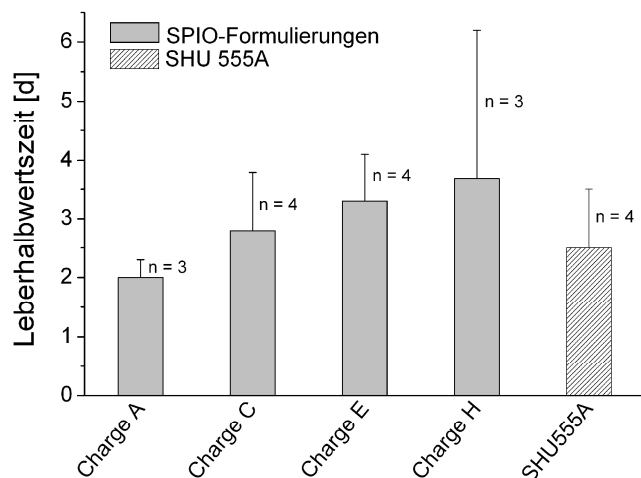


Abb. 61: Abgebildet sind die aus der Regressionsanalyse errechneten Leberhalbwertszeiten von Charge A (20 nm), C (40 nm), E (60 nm) und H (85 nm). Der Anstieg der Leberhalbwertszeiten mit der Partikelgröße ist nicht signifikant.

Zusätzlich wurde eine direkte Auswertung der Relaxationsraten ( $1/T_2$ -Zeit) zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt (vgl. Abb. 62). Die Relaxationsraten der vier untersuchten Chargen unterscheiden sich 24 Stunden nach Applikation nicht signifikant ( $p < 0,05$ ) voneinander. Werden jedoch die Relaxationsraten nach 7 Tagen betrachtet, ist ein Anstieg der Relaxationsraten mit zunehmender hydrodynamischer Partikelgröße zu beobachten. Die Relaxationsraten (7 d) von Charge C (40 nm) und E (60 nm) unterschieden sich signifikant ( $p = 0,049$ ). Die Ergebnisse der Leberuntersuchungen werden in Kapitel 5.6 diskutiert.

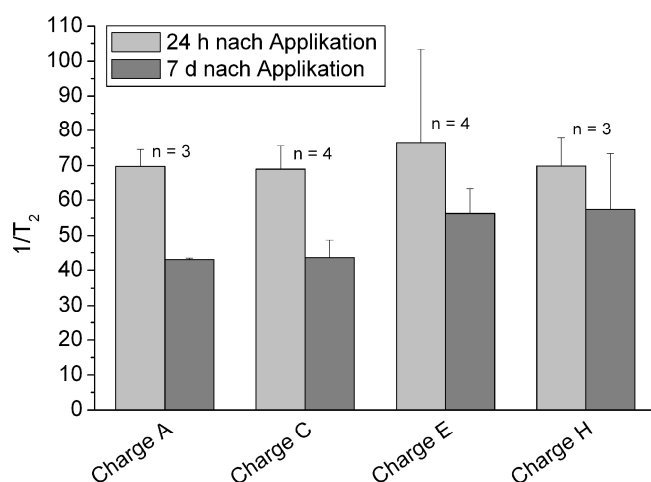


Abb. 62: Vergleich der Relaxationsraten der Chargen A, C, E und H 24 Stunden und 7 Tage nach KM-Applikation. Nach 24 Stunden sind die Relaxationsraten für alle untersuchten Chargen annähernd gleich. Die Relaxationsraten nach 7 Tagen hingegen sind mit zunehmender Partikelgröße etwas erhöht. Die Differenz zwischen Charge C und E ist dabei signifikant ( $p = 0,049$ ).

---

## 5 Diskussion

### 5.1 Stabilität der hergestellten SPIO-Formulierungen

Die Bestimmung der hydrodynamischen Radien zeigte, dass die Partikelgrößen innerhalb von zweieinhalb Jahren stabil bleiben (vgl. Abb. 22, S. 57). Die SPIO-Partikel sind durch die Carboxydextran-Beschichtung sowohl sterisch als auch elektrostatisch stabilisiert. SHU 555 A ist analog der hergestellten Chargen mit Carboxydextran beschichtet und hat aufgrund der freien Carboxylgruppen des Carboxydextrans ein negatives Zetapotential (-35,1 mV, vgl. Tab. 7, S. 58). Die SPIO-Chargen zeigen ähnliche negative Oberflächenladungen (-20,5 bis -37,9 mV, vgl. Tab. 7). Laut Herstellerangaben ist das Marktprodukt SHU 555 A über einen Zeitraum von drei Jahren stabil [50]. Wie bereits anhand des Zetapotentials zu vermuten, weisen die hergestellten SPIO-Formulierungen eine vergleichbare Stabilität auf.

### 5.2 Partikelgröße und Morphologie

#### 5.2.1 Eignung A4F-Trennmethode

Bevor die hergestellten SPIO-Formulierungen mittels A4F analysiert werden konnten, war es notwendig eine A4F-Trennmethode zu entwickeln, die Nanopartikel in einem Größenbereich von ca. 20 nm bis 100 nm ( $d_H$ ) effektiv auftrennen kann (vgl. Kap. 4.2.2). Die entwickelte A4F-Trennmethode ist trotz des hohen Querflusses (75 %) allerdings nicht in der Lage, die drei untersuchten Polystyrolstandards so aufzutrennen, dass eine vollständige Basislinientrennung erreicht wird (vgl. Abb. 23, S. 59). Für die Analyse der hydrodynamischen Partikelgrößen ist die Basislinientrennung jedoch nicht unbedingt erforderlich, so konnte in Kapitel 4.2.2 mit Hilfe von Polystyrolstandards belegt werden, dass die ermittelten Partikelgrößen sehr gut mit den zertifizierten Partikelgrößen übereinstimmen. Demnach ist die in der Arbeit entwickelte Methode sehr gut zur Bestimmung der Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung geeignet.

Auffällig ist der geringe Unterschied zwischen den mittels DLS und den mittels TEM gemessenen Radien der Polystyrolstandards. Während bei der DLS die hydrodynamischen Radien bestimmt werden, werden die Partikel bei der TEM-Probenvorbereitung auf dem Grid getrocknet. Die hydrodynamische Hülle ist im TEM nicht sichtbar. Demnach wären in der DLS theoretisch größere Radien zu erwarten. Tatsächlich jedoch weichen die Werte zwischen TEM und DLS nur um 0,6 nm bis 3,5 nm voneinander ab (vgl. Tab. 8, S. 60). Begründet

werden kann diese geringe Differenz durch die Beschaffenheit der Polystyrolstandard-Nanopartikel. Im Gegensatz zur Kern-Hülle Struktur der SPIO-Partikel, bestehen die Polystyrolstandards (PSS) nur aus einer Komponente. Die PSS-Partikel haben eine glatte Oberfläche, sind in Wasser unlöslich und quellen nur geringfügig auf. Die hydrodynamische Hülle ist demnach für PSS-Partikel vernachlässigbar klein. Darüber hinaus sind die Polystyrolstandards sehr eng verteilt, so dass die unterschiedlichen Wichtungen der Methoden nur einen geringen Einfluss haben (vgl. Kap. 8.13) Auch andere Arbeitsgruppen konnten die gute Übereinstimmung der dynamischen Lichtstreuerggebnisse mit den zertifizierten TEM-Partikelgrößen der Polystyrolstandards zeigen [184].

Neben den hydrodynamischen Radien wurden mit Hilfe eines gekoppelten MALLS-Detektors zusätzlich die Gyrationradien der Polystyrolstandards bestimmt und diese stimmen ebenfalls sehr gut mit Werten in der Literatur überein (Tab. 11) [131].

Tab. 11: Ermittelte Gyrationradien im Vergleich mit Literaturdaten.

<i>Partikelstandard</i>	<i>R<sub>G</sub> (A4F/MALLS)<sup>1</sup></i>	<i>R<sub>G</sub> Literatur<sup>2</sup></i>
20 nm	8,7 ± 0,1 nm	n.b.
50 nm	17,7 ± 0,2 nm	18,9 ± 2 %
100 nm	34,4 ± 0,2 nm	37,8 ± 2 %
<sup>1</sup> ) Gyrationradien ermittelt nach A4F/MALLS Kopplung (vgl. Kap. 4.2.2) <sup>2</sup> ) Gyrationradien ermittelt nach A4F/MALLS Kopplung laut Literatur [131].		

Somit konnte in dieser Arbeit eine A4F-Trennmethode entwickelt werden, die für die detaillierte Analyse der Teilchengrößen- und Teilchengrößenverteilung von Nanopartikeln mit hydrodynamischen Größen zwischen 20 nm und 100 nm sehr gut geeignet ist.

Neben der Validierung der A4F-Trennmethode mit Hilfe von Polystyrolstandards konnte auch für SHU 555 A eine gute Übereinstimmung des hydrodynamischen Durchmessers mittels A4F mit Literaturdaten gezeigt werden (vgl. Kap. 4.2.3: 65 nm ± 0,8 nm und Literatur: 60 nm [32]).

### 5.2.2 Hydrodynamische Radien der SPIO-Chargen

Die ermittelten Radien unterschiedlicher Methoden zur Bestimmung der Partikelgröße sind häufig nicht ohne weiteres miteinander vergleichbar. Die Ergebnisse aus der DLS („in-batch“) und der A4F/DLS-Kopplung ermöglichen jedoch den direkten Vergleich, da beide

Methoden die hydrodynamischen Radien mittels dynamischer Lichtstreuung ermitteln (Tab. 12).

Aufgrund des bimodalen Charakters der Charge B (vgl. Abb. 28, S. 64 und Abb. 36, S. 74) sind die hydrodynamischen Radien der DLS-Methoden dieser Charge allerdings nur bedingt miteinander vergleichbar. Denn die DLS „in-batch“ bestimmt eine monomodale Verteilung und gibt eine mittlere Partikelgröße an, die jedoch durchaus im Größenbereich der A4F/DLS-Methode liegt.

Die Gegenüberstellung für die übrigen Chargen zeigt teilweise eine Abweichung von bis zu 37 %. Dabei ist auffällig, dass die über A4F/DLS ermittelten Werte zumeist kleiner sind. Zu beachten ist, dass im Falle der DLS („in-batch“) die Verteilung der Teilchengrößen nicht direkt messbar ist, sondern lediglich durch Anpassung einer Streufunktion modelliert wird. Dass es sich dabei um eine theoretische Partikelgrößenverteilung handelt, konnte bereits anhand der Polystyrolstandards gezeigt werden (Abb. 23 A, S. 59). Bei der A4F/DLS-Methode hingegen werden reale Teilchengrößenverteilungen gemessen und im Gegensatz zur DLS „in-batch“ können auch unterschiedliche Partikelpopulationen in einem Gemisch unterschieden werden (Abb. 23 B, S. 59).

Tab. 12: Gegenüberstellung der hydrodynamischen Radien A4F/DLS und DLS („in-batch“).

<b>Charge</b>	<b>DLS <math>R_H</math><sup>1)</sup></b>	<b>A4F/DLS <math>R_H</math><sup>2)</sup></b>	<b>Abweichung</b>
Charge A (20 nm)	9,7 ± 0,3 nm	10,3 ± 0,8 nm	5,8 %
Charge B (30 nm)	15,7 ± 0,3 nm	9,8 ± 0,5 nm / 34,8 ± 1,6 nm	-
Charge C (40 nm)	18,1 ± 0,3 nm	13,2 ± 0,3 nm	-37,1 %
Charge D (50 nm)	25,3 ± 0,9 nm	20,6 ± 0,5 nm	-22,8 %
Charge E (60 nm)	30,4 ± 0,9 nm	27,9 ± 0,4 nm	-9,0 %
Charge F (65 nm)	31,8 ± 0,6 nm	32,3 ± 0,5 nm	+1,5 %
Charge G (70 nm)	36,2 ± 0,7 nm	34,8 ± 1,4 nm	-4,0 %
Charge H (85 nm)	43,1 ± 0,2 nm	41,2 ± 0,8 nm	-4,6 %
1) Hydrodynamischer Radius ± Standardabweichung, DLS ohne vorherige Trennung („in-batch“), Dreifachbestimmung mit je n = 5, Methodenbeschreibung in Kap. 3.2.2 (Daten vgl. Tab. 7, S.58) 2) Hydrodynamischer Radius ± Standardabweichung (n = 3), Methodenbeschreibung in Kap. 3.2.4 (Daten vgl. Tab. 9, S. 66)			

Der z-Average (DLS „in-batch“) ist ein intensitätsgewichteter Mittelwert [140]. Das Primärsignal der DLS gekoppelt an die A4F ist ebenfalls intensitätsgewichtet, jedoch werden größere Partikel abgetrennt und einzeln vermessen. Der intensitätsgewichtete mittlere Radius ist sehr viel empfindlicher gegenüber größeren Partikeln [185]. Zur Berechnung des mittleren hydrodynamischen Radius nach A4F/DLS-Methode wurde jedoch die Partikelgrößen-

verteilung anhand des statischen Lichtstredetektors verwendet (vgl. Kap. 3.2.4). Der errechnete Mittelwert nach A4F/DLS gibt demnach den hydrodynamischen Radius des kumulativ ermittelten 50 %-Wertes der statischen Lichtstreuung an ( $90^\circ$ ) und ist volumengewichtet (vgl. Anhang Gl. A 9 und Gl. A 10, S. 129). Verdeutlicht werden soll der Unterschied der Wichtungen anhand von Charge C (Abweichung: 37,1 %) und Charge F (Abweichung: 1,5 %) (Abb. 63).

Für die Charge C (40 nm) weichen die Teilchengrößenverteilungen der DLS „in-batch“ und A4F/DLS deutlich voneinander ab, was die hohe Abweichung der Radien in Tab. 12 erklärt. Für die Charge F (65 nm) hingegen sind die Teilchengrößenverteilungen beider Methoden fast identisch, was sich in einer guten Übereinstimmung zwischen den hydrodynamischen Radien nach DLS „in-batch“ und A4F/DLS widerspiegelt (vgl. Tab. 12).

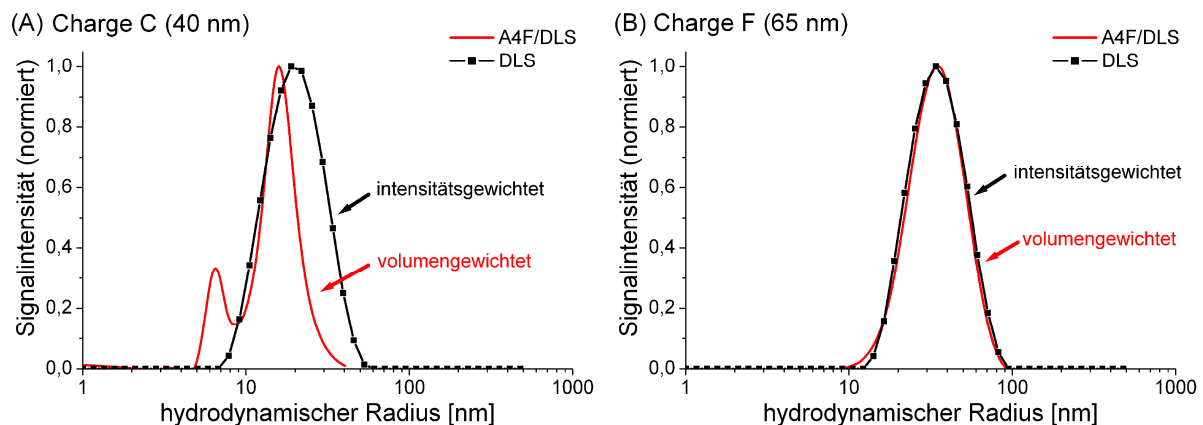


Abb. 63: In (A) sind die DLS „in-batch“ und A4F/DLS-Daten der Charge C (40 nm) dargestellt. Die volumengewichtete Teilchengrößenverteilung der A4F/DLS-Methode weicht deutlich von der intensitätsgewichteten Verteilung der DLS ab. (B) Für die Charge F (65 nm) sind die unterschiedlich gewichteten Verteilungen hingegen fast identisch und die mittleren hydrodynamischen Radien beider Methoden unterscheiden sich nur geringfügig (1,5 % vgl. Tab. 12).

### 5.2.3 Polydispersitäten der hergestellten SPIO-Chargen

Neben den Teilchengrößen wurden auch die Polydispersitäten der SPIO-Chargen bestimmt. Es wurden zwei unterschiedliche Polydispersitätsindices ermittelt (vgl. Kap. 4.2.1 und Kap. 4.2.5). Der Polydispersitätsindex (PDI) aus der dynamischen Lichtstreuung beschreibt mathematisch den Unterschied der gemessenen Autokorrelationsfunktion zur angepassten Korrelationsfunktion und gibt Werte zwischen 0 - 0,5 an (vgl. Kap. 2.4.4). Der Polydispersitätsindex nach A4F ( $Q$ ) ist bekannt aus der Polymerchemie, gibt die Breite der

gemessenen Partikelgrößenverteilung an und ist für reale Verteilungen stets größer als eins (vgl. Kap. 2.4.6).

Ist der PDI aus der DLS klein, so stimmt die Autokorrelationsfunktion sehr gut mit den gemessenen Daten überein. Im Falle der Charge B wird für die Autokorrelationsfunktion eine monomodale Verteilung angenommen. Da diese Charge jedoch eine bimodale Verteilung aufweist (vgl. Abb. 28, S. 64 und Abb. 36, S. 74), ist die Abweichung zwischen Korrelationsfunktion und den gemessenen Daten relativ groß. Der PDI (0,248) der Charge B wird folglich größer errechnet als für die übrigen Chargen (vgl. Tab. 7, S. 58). Ist eine Nanopartikel-suspension hingegen zwar sehr breit verteilt, aber monomodal, wie z.B. SHU 555 A, dann ist der PDI aus der Kumulantenmethode trotzdem relativ niedrig, da die Autokorrelation gut zu den gemessenen Daten passt (0,208, vgl. Tab. 7). Der PDI aus der dynamischen Lichtstreuung kann demnach nur bedingt zur Beurteilung einer Partikelgrößenverteilung herangezogen werden.

Der errechnete Polydispersitätsindex aus der A4F-Analyse ( $Q$ ) gibt hingegen direkt eine Aussage über die Breite einer Partikelgrößenverteilung [146]. Zur Berechnung der Polydispersitäten kann allerdings die Breite der gemessenen Teilchengrößenverteilung der A4F nicht direkt herangezogen werden, da es nicht möglich ist, zwischen Bandenverbreiterung während der Trennung und Polydispersität der Probe zu unterscheiden [109, 131]. Das Auftreten einer Bandenverbreiterung während einer Trennung ist aus dem Bereich der Chromatographie hinlänglich bekannt (z.B. Tailing in der HPLC). Stattdessen wurden die Polydispersitätsindices anhand von Gl. 30 (S. 67) errechnet. Die Ergebnisse der Polydispersitäten bestätigen, dass die Charge B bimodal verteilt ist (vgl. Abb. 31, S. 68).

#### **5.2.4 Analytische Ultrazentrifugation**

Die Daten der AUZ (vgl. Kap. 4.2.7) können nicht direkt mit den ermittelten Partikelgrößen der anderen Methoden verglichen werden, da die AUZ nach Sedimentationsgeschwindigkeiten trennt und eine andere Wichtung der Partikelgrößenverteilung verwendet (vgl. Anhang Kap. 8.13).

In der AUZ spielt sowohl die Dichte des Beschichtungsmaterials als auch die Dichte des Kerns eine entscheidende Rolle. Im Falle der SPIO-Partikel ist der Kern wesentlich schwerer als die Carboxydextran-Hülle, weswegen der Einfluss des Beschichtungsmaterials während der Zentrifugation vergleichsweise gering bleibt. Anders verhält es sich, wenn die Form der Partikel stark durch die Beschichtung beeinflusst wird. Denn haben die Partikel eine

stark vergrößerte Reibungsoberfläche, beispielsweise durch lange abstehende Seitenketten, sedimentieren sie langsamer. Die SPIO-Chargen sind alle mit Carboxydextran beschichtet, so dass die Partikelgrößen untereinander gut vergleichbar sind. Die Partikelgröße nach AUZ nimmt von Charge A bis Charge H zu (vgl. Abb. 34, S. 71). Vor allem durch die zunehmenden SPIO-Kerngrößen (Aggregate, vgl. Abb. 35, S. 72) und deren hohen Beitrag zur Gesamt-Sedimentationsgeschwindigkeit, sedimentieren die größeren Partikel in der AUZ schneller als die kleineren. Der Einfluss der verschiedenen Wichtungen ist in Abb. 64 dargestellt. Für die Chargen A, E und H ist das anzahlgewichtete Zentrifugemittel erwartungsgemäß kleiner als die intensitäts- und volumengewichteten Ergebnisse aus der DLS und A4F/DLS (vgl. Anhang Kap. 8.13). Das Zentrifugemittel der Charge C ist hingegen größer als der volumengewichtete Durchmesser, was jedoch durch eine kleine Schulter der Charge C in der Teilchengrößenverteilung der AUZ erklärt werden kann, die in der A4F/DLS nicht detektiert werden konnte (vgl. Abb. 34 C, S. 71 und Abb. 27 C, S. 63).

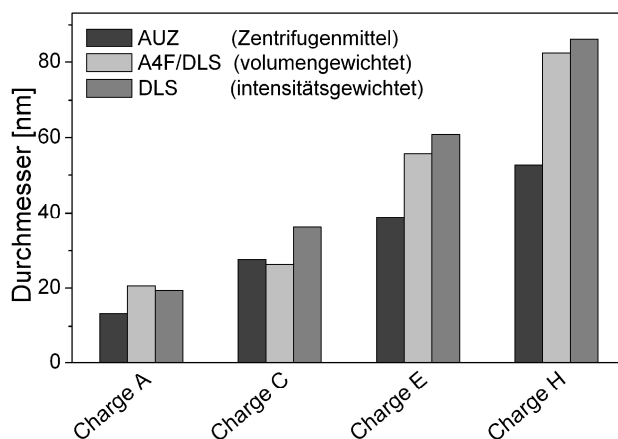


Abb. 64: Gegenüberstellung der Partikelradien nach AUZ, DLS „in-batch“ und A4F/DLS für die Chargen A, C, E und H. Mit Ausnahme der Charge C ist das anzahlgewichtete Zentrifugemittel der AUZ stets kleiner als die intensitäts- und volumengewichteten Mittelwerte.

Auffällig ist, dass sowohl die Charge C als auch Charge E in der AUZ eine Schulter in der Teilchengrößenverteilung aufweisen (vgl. Abb. 34, S. 71). In der A4F-Untersuchung hingegen zeigt lediglich die Charge B einen bimodalen Charakter. Eine mögliche Erklärung sind die starken Scherkräfte während der AUZ. Denkbar ist, dass ein Teil der sterischen Carboxydextran-Beschichtung während der AUZ-Analyse abgeschert wird und die Partikel infolgedessen agglomerieren. Im Falle der Charge E zeigt besonders die Partikeldichtevertellung einen deutlichen bimodalen Charakter (vgl. Abb. 34 E). Diese bimodale Dichteverteilung der Partikel kann durch eine ungleichmäßige Carboxydextran-Beschichtung hervorgerufen werden. Steigt bei gleich bleibendem hydrodynamischem Durchmesser das Verhältnis von Carboxydextran zu Eisenoxid in einem Partikel, sinkt die mittlere Partikeldichte und die Partikel sedimentieren langsamer in der AUZ. Da die



hydrodynamischen Größen auch bei schwankendem Verhältnis zwischen Carboxydextran und Eisenoxid gleich sein können, kann eine bimodale Partikeldichteverteilung in der asymmetrischen Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung nicht detektiert werden.

### 5.2.5 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Partikelgröße und Morphologie der SPIO-Chargen wurde mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie untersucht (vgl. Kap. 4.2.8).

Die Partikelgrößen der TEM können nicht mit den hydrodynamischen Größen der DLS verglichen werden, denn die Carboxydextran-Beschichtung kann durch den Trocknungsprozess kollabieren und gibt in der TEM keinen ausreichenden Kontrast. Zudem ist die hydrodynamische Hülle im TEM nicht sichtbar. In der DLS hingegen werden die Partikel in Lösung vermessen. Die Kohlenhydratketten des Carboxydextrans stehen dabei weit vom Kern ab (vgl. Kap. 2.3.2) und werden zusammen mit Wasser als hydrodynamische Hülle mit bestimmt. Darüber hinaus sind die hydrodynamischen Radien intensitätsgewichtet, während die Radien nach TEM anzahlsgewichtet sind (vgl. Anhang Kap. 8.13). Demnach müssen die Aggregatgrößen laut TEM wesentlich kleiner sein als die hydratisierten Radien.

Erwartungsgemäß sind die TEM-Aggregatgrößen kleiner als die hydrodynamischen Größen (Tab. 10, S. 73 und Tab. 7, S. 58). Werden die verschiedenen Wichtungen vernachlässigt, kann die Differenz zwischen beiden Partikelgrößen als Schichtdicke der hydrodynamischen Hülle diskutiert werden (Abb. 65). Aus der resultierenden theoretischen Größe der SPIO-Partikel ist ein Rückschluss auf die tatsächlichen Größenverhältnisse allerdings nur teilweise möglich, da z.B. mit der TEM nur orientierende Partikelgrößen bestimmt wurden und die SPIO-Kerne sowie die Dicke der Carboxydextranschicht eine Polydispersität aufweisen.

Die Verhältnisse von Kerndurchmesser zu hydrodynamischem Durchmesser schwanken zwischen 1 zu 4,3 (Charge A) und 1 zu 1,7 (Charge E) (vgl. Abb. 65). Büscher *et. al.* ermittelte für Carboxydextran-beschichtete Eisenoxidpartikel mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 13,4 nm mittels AFM einen Kerndurchmesser von 6,4 nm. Dies entspricht einem Verhältnis von Kerndurchmesser zu hydrodynamischen Durchmesser von 1 zu 2,1 und liegt damit innerhalb der oben beschriebenen Verhältnisse [17].

Die Kristallitgröße wird vorrangig durch die Partikelsynthese beeinflusst, z.B. durch Rühr- und Tropfgeschwindigkeit während der basischen Fällung. Die SPIO-Chargen wurden alle aus der SPIO-Rohdispersion einer Synthese-Charge hergestellt und über eine magnetische

Separation in verschiedene Partikelgrößen aufgetrennt. Erwartungsgemäß sind die mittels TEM ermittelten Kristallitgrößen für alle Chargen fast identisch. Die mittleren Kristallitgrößen liegen zwischen 3,8 und 5,4 nm (vgl. Tab. 10, S. 73). Für SHU 555 A wird in der Literatur eine ähnliche Kristallitgröße von 3 - 5 nm beschrieben [86].

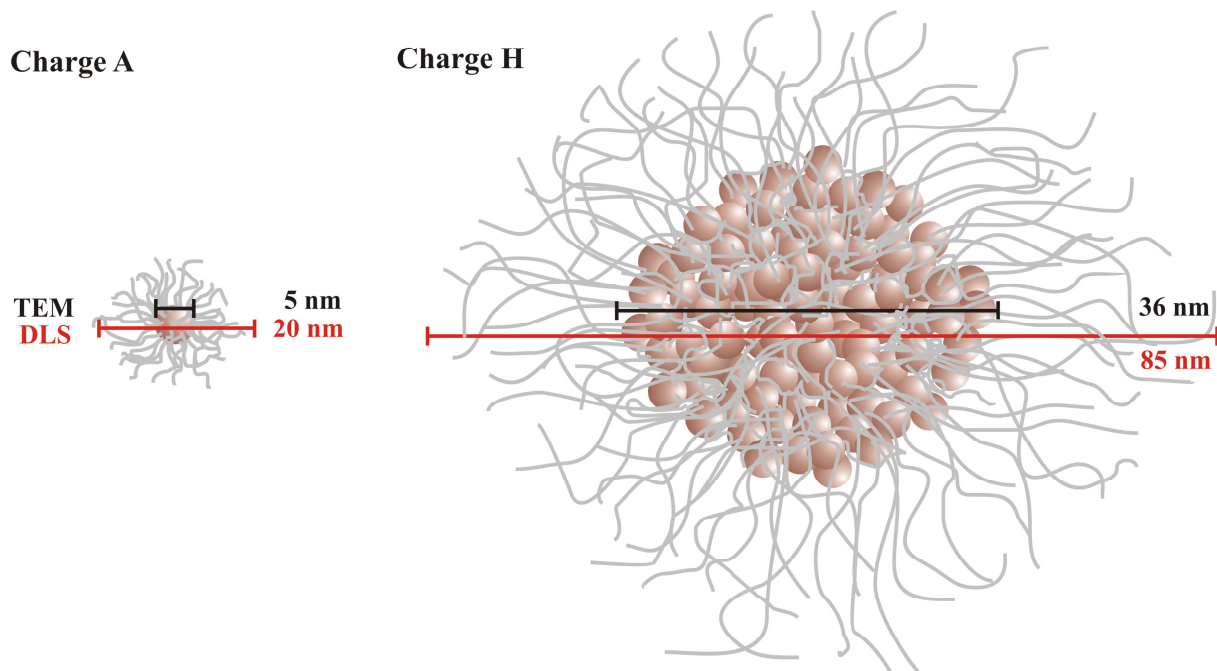


Abb. 65: Schematische Darstellung des theoretischen Aufbaus der SPIO-Partikel in Charge A und H. Unter der Annahme, dass in der TEM ausschließlich die SPIO-Kerne und in der DLS die SPIO-Kerne plus Beschichtung und hydrodynamische Hülle bestimmt werden und die verschiedenen Wichtungen der Methoden außer acht gelassen werden, kann die Differenz zwischen beiden Partikelgrößen als Schichtdicke der hydratisierten Beschichtung diskutiert werden. Für Charge A beträgt das Verhältnis der Durchmesser von Kern zu Hülle ca. 1:4 und für die Charge H nur ca. 1:2.

Laut TEM-Aufnahmen bestehen die SPIO-Kerne der Charge A aus einzelnen Eisenoxid-Kristalliten (vgl. Abb. 35, S. 72). Solche Strukturen sind in der Literatur als MIONs (Monocrystalline Iron Oxide Nanocompounds) beschrieben [186-188]. Shen *et. al.* beschreibt dextranbeschichtete MIONs mit einer Kerngröße nach TEM von  $4,6 \pm 1,2$  nm und einem hydrodynamischen Durchmesser von  $20 \pm 4$  nm [186]. Diese Größenverhältnisse stimmen sehr gut mit denen der SPIO-Partikel in der Charge A überein. Die Kerne der größeren Chargen (vgl. Abb. 65, rechts) hingegen bestehen aus mehreren aggregierten Kristalliten. Auch frühere Arbeiten beschreiben, dass größere SPIO-Partikel aus mehreren monokristallinen Untereinheiten aufgebaut sind [17, 19, 21]. Büscher *et. al.* konnte anhand von Rasterkraftmikroskopie (AFM, atomic force microscopy) für Carboxydextran

beschichtete SPIO-Partikel ebenfalls zeigen, dass die SPIO-Kerne aus aggregierten Kristalliten bestehen [17].

Die vier mittels TEM untersuchten SPIO-Chargen zeigen annähernd runde Partikelformen (vgl. Abb. 35, S. 72). Die Bestimmung der Formfaktoren mittels A4F (vgl. Kap. 4.2.6) zeigt ebenfalls charakteristische Werte für kugelförmige Partikel und kann durch die TEM-Ergebnisse bestätigt werden.

### 5.2.6 Kleinwinkel-Röntgenstreuung

Die Ergebnisse der Kleinwinkel-Röntgenstreuexperimente (SAXS) sind in Kapitel 4.2.9 präsentiert. Die SAXS-Methode reagiert empfindlich auf Elektronendichteunterschiede. Die Polymerbeschichtung der hergestellten Chargen ist in Gegenwart des Eisenoxids unsichtbar, da die Elektronendichtedifferenz zwischen Wasser und Carboxydextran verglichen zu Eisenoxid und Wasser sehr gering ist. So wird in der SAXS lediglich der Eisenoxidkern detektiert [189]. Die Radien sind somit nicht mit den hydrodynamischen Radien der DLS oder AUZ vergleichbar. Die SPIO-Kerngrößen steigen jedoch erwartungsgemäß linear mit den hydrodynamischen Partikelgrößen an (Abb. 66).

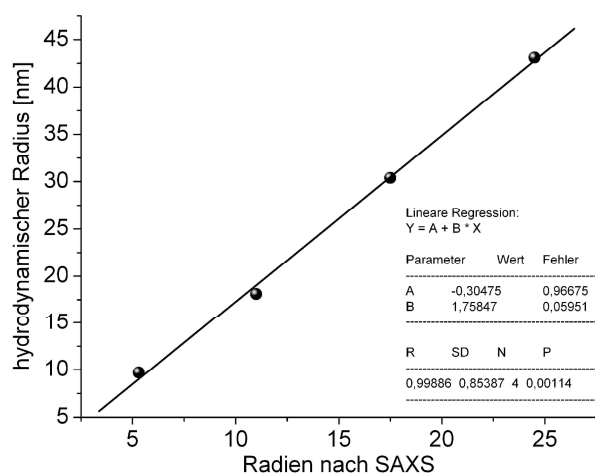


Abb. 66: Dargestellt ist das Verhältnis zwischen hydrodynamischen Radien und SAXS-Radien der Chargen A, C, E und H.

Anhand des gezeigten Streuverhaltens (vgl. Abb. 37, S. 75) lassen sich einfache Partikelstrukturen ausschließen. Es wurden zwei mögliche Hypothesen vorgestellt, welche die Streukurven erklären können.

- *Hypothese 1:* Es liegen neben größeren Partikeln zahlreiche kleine Partikel in der Lösung vor (Abb. 67 A).
- *Hypothese 2:* Die größeren Partikel bestehen aus Aggregaten kleinerer Primärpartikel (Abb. 67 B).

Einerseits ist es möglich, dass bei der magnetischen Separation eventuell einzelne kleinere Partikel mitgerissen werden, andererseits könnte die innere Struktur der zusammengesetzten Primärpartikel (Aggregate) ebenfalls ein solches Streuverhalten auf kleiner Längenskala verursachen. Beide Thesen sind denkbar und eine zweifelsfreie Unterscheidung ist nur möglich, wenn die Ergebnisse von A4F, TEM, und AUZ mit einbezogen werden.

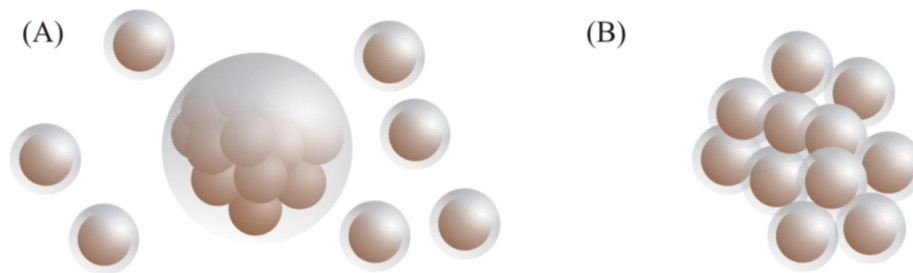


Abb. 67: Schematische Darstellung möglicher Strukturen der SPIO-Partikelkerne zur Erklärung der SAXS-Ergebnisse. (A) Neben den Aggregaten aus mehreren Kristalliten liegen in Lösung auch einzelne Kristallite vor. (B) Der aggregierte Kern, aufgebaut aus einzelnen Kristalliten, verursacht eine Streuung an der Grenzfläche des Gesamtpartikels zum Dispergiermittel und zusätzlich streuen auch die kleinen Kristallite im Inneren der Aggregate an der Grenzfläche zwischen SPIO-Kristallit und Beschichtungsmaterial.

Anhand der TEM-Bilder ist keine zweifelsfreie Unterscheidung möglich, da sich durch den Trocknungsprozess kleinere Partikel an die sichtbaren Aggregate anlagern können. In den TEM-Bildern sind zudem vereinzelt kleine Partikel sichtbar (vgl. Abb. 35 H, S. 72). Büscher *et. al.* konnte anhand von Rasterkraftmikroskopie ebenfalls zeigen, dass magnetisch separierte Fraktionen von Carboxydextran-beschichteten Eisenoxidpartikel neben den größeren Aggregaten auch einen Anteil kleinerer Primärpartikel enthalten [17].

Mit Hilfe der A4F/DLS-Kopplung (vgl. Kap. 4.2.4) sind frei vorliegende kleine Partikel auch neben aggregierten gut detektierbar, da die Partikelgrößen erst aufgetrennt werden und anschließend von nachgeschalteten Detektoren analysiert werden. Vor allem der anzahlgewichtete UV-Detektor ist gegenüber kleineren Partikeln empfindlich. Wie für SHU 555 A gezeigt, konnten kleinere Partikel auch neben größeren detektiert werden (vgl. Abb. 26, S. 62). Charge E enthält laut A4F-Analyse wesentlich weniger kleine Partikel als SHU 555 A (vgl. Abb. 71, S. 113). Aufgrund der nicht vollständigen Basislinientrennung ist jedoch ein geringer Anteil kleiner Primärpartikel in der Charge E nicht auszuschließen. Wird die Charge E mit 5 % (v/v) der Charge A versetzt, sind die kleineren Partikel der Charge A, trotz unvollständiger Basislinientrennung, neben den Partikeln der Charge E gut detektierbar (vgl. Abb. A 5, S. 127).

Setzt man die Flächendifferenz der Charge E und Charge E plus Charge A im Peakbereich (5,5-8 min) gleich 5 %, ergibt sich für die Charge E ein Anteil an kleinen Primärpartikeln von 8,2 %. Dieser Anteil ist aufgrund der Überlagerung mit dem Void-Peak nur eine Näherung. Die Messung des fraktionierten Void-Peaks lieferte in der SAXS-Messung keine Streuintensität. Der theoretische berechnete Anteil an kleinen Partikeln ist für die Charge H mit 4,6 % noch geringer. Bei großen Streuvektoren ( $0,4 < q < 2 \text{ nm}^{-1}$ ) liegen die Streukurven der Chargen C, E und H Streukurven jedoch übereinander und zeigen keine Intensitätsunterschiede (vgl. Abb. 37, S. 75). Die Änderung im Primärpartikelanteil von 8,2 % auf 4,6 % zeigt somit keinen Einfluss auf das Streuverhalten. Demnach kann man davon ausgehen, dass das Streuverhalten der Charge C, E und H auf kleiner Längenskala durch die innere Struktur der Partikel hervorgerufen wird (*Hypothese 2*).

### 5.3 Effektivität der SPIO-Formulierungen in der MRT-Bildgebung

#### 5.3.1 Magnetische Eigenschaften

Anhand der SQUID-Daten (vgl. Abb. 40, S. 79) konnte belegt werden, dass sich die SPIO-Partikel in wässriger Suspension bei Raumtemperatur superparamagnetisch verhalten. Zu beachten ist, dass die SQUID-Messungen in wässriger Suspension nicht vergleichbar mit Messungen von getrockneten SPIO-Partikeln sind. Die magnetischen Momente der Partikel sind in Lösung nicht fixiert, sondern können sich frei bewegen, so dass auch im Falle eines ferro- oder ferrimagnetischen Partikelcharakters keine Remanenz zurück bleibt. Dieser Effekt ist durch die Brownsche Molekularbewegung bzw. die freie Beweglichkeit der magnetischen Aggregate zu erklären (vgl. Brownsche Relaxation vgl. Gl. 8, S. 12). In der Literatur ist dieser Effekt als quasi-superparamagnetisches Verhalten beschrieben [190]. Werden Partikel hingegen an eine Oberfläche gebunden und damit in ihrer Mobilität eingeschränkt, erhöht sich die Remanenz. Die Änderung des Relaxationsverhaltens durch Immobilisierung von SPIO-Partikeln kann in speziellen Immunoassays zur Bestimmung von Bindungsaffinitäten ausgenutzt werden [163, 191].

Die *Sättigungsmagnetisierungen* der hergestellten Chargen wurden aus den M-H-Kurven der SQUID Messungen ermittelt (vgl. Kap. 4.3.2) und stimmen sehr gut mit Literaturdaten überein. So bestimmte Saebo *et. al.* für SHU 555 C eine Sättigungsmagnetisierung von  $78,9 \pm 0,8 \text{ emu/g Eisen}$  [25]. SHU 555 C ist mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 20 nm mit der Charge A vergleichbar, die eine Sättigungsmagnetisierung von  $74,9 \pm 1,8 \text{ emu/g Eisen}$  aufweist (vgl. Tab. A 3, S. 126).

Shen *et. al.* ermittelte bei 1,5 Tesla für Dextran beschichtete monokristalline SPIO-Partikel mit einem Kerndurchmesser von  $4,6 \pm 1,2$  nm und einem hydrodynamischen Durchmesser von  $20 \pm 4$  nm eine Sättigungsmagnetisierung von 68 emu/g Eisen [186]. Auch dieser Wert ist dem der Charge A ähnlich. Die größeren Chargen zeigen alle eine Sättigungsmagnetisierung zwischen 93 und 95 emu/g Eisen und erreichen damit annähernd die Sättigungsmagnetisierungen von Maghemit- oder Magnetit-Bulklösungen. Die Bulk-Sättigungsmagnetisierung von Maghemit und Magnetit ergeben sich aus dem magnetischen Gesamtmoment und der Masse einer Einheitszelle. Die theoretische Bulk-Sättigungsmagnetisierung beträgt für Maghemit 87,4 emu/g Eisen und für Magnetit 96,5 emu/g Eisen. In der Praxis wurden für Maghemit 83,5 emu/g Eisen und für Magnetit 98,0 emu/g Eisen bestimmt [192].

Die magnetische *Suszeptibilität* wächst für kleine Partikeldurchmesser linear an und erreicht für hydrodynamische Durchmesser ab ca. 60 nm (Kerndurchmesser TEM: 35 nm) einen Maximalwert (Abb. 43, S. 82). Dieser Verlauf kann durch die Annahme von so genannten Ein- und Mehrdomänenpartikeln erklärt werden [193]. Der Durchmesser der kleinen Partikel liegt zunächst unterhalb der Domänengröße (Domäne = Weiss'scher Bezirk) von Magnetit bzw. Maghemit. Wenn das Partikel größer wird, ordnen sich die dazukommenden Elementarmagnete zunächst in die Domäne ein, bis die typische Domänengröße von Magnetit oder Maghemit erreicht ist. Für diesen Bereich müsste das magnetische Moment der Partikel linear mit der Anzahl der magnetischen Elementarmagneten oder mit dem Volumen der Partikel ansteigen. Nach Gl. 4 (S. 8) steigt damit auch die Suszeptibilität linear mit dem Partikelvolumen an. Dies bedeutet eigentlich einen Anstieg der Suszeptibilität mit  $d^3$ . Da die Partikelchargen aber auf den gleichen Eisengehalt eingestellt waren, nimmt die Partikelanzahl der Chargen mit zunehmendem Partikeldurchmesser ungefähr mit der 3. Wurzel ab. Aus dieser Annahme folgt ein linearer Anstieg der Suszeptibilität mit dem Partikeldurchmesser wie in Abb. 43 (S. 82) zu erkennen.

Werden die Partikel größer als die typische Domänengröße von Magnetit, entstehen je nach Größe eine oder mehrere weitere Domänen. Unter der Annahme, dass das magnetische Moment der zusätzlichen Domänen räumlich zufällig orientiert ist, kann das magnetische Moment der ersten Domäne sowohl abgeschwächt als auch verstärkt werden. Statistisch über die Probe gesehen, ist somit kein weiterer Beitrag der zusätzlichen Domänen zum magnetischen Moment der ersten Domäne zu erwarten. Daraus ergibt sich ein Maximalwert der Suszeptibilität bei großen Partikeln, wie in Abb. 43 (S. 82) zu erkennen.

Am Schnittpunkt zwischen linearem Anstieg und konstantem Maximalwert lässt sich gemäß obiger Annahme aus Abb. 43 ein Grenzwert zwischen Ein- und Mehrdomänenpartikel ablesen. Im Schnittpunkt beträgt der hydrodynamische Durchmesser ca. 57 nm, was der Charge E (60 nm) am Nächsten kommt. Die Charge E hat laut TEM einen Kerndurchmesser von 35 nm (vgl. Tab. 10, S. 73) und laut SAXS einen Kerndurchmesser von 30 nm (vgl. Kap. 4.2.9). Dieser Wert ist durchaus plausibel, so beschreibt Soffel *et. al.* [193] den kritischen Durchmesser für den Eindömanen-/ Mehrdömanenteilchenübergang für Maghemit und Magnetit mit 30 bis 100 nm.

Mittels MSB-Waage wurden Suszeptibilitäten zwischen  $18.000 \times 10^{-6}$  cgs (Charge A) und ca.  $40.000 \times 10^{-6}$  cgs (Charge D bis H) bestimmt (vgl. Abb. 44, S. 82). In der Literatur sind ähnliche Werte beschrieben. So wurde für Dextran beschichtete SPIO-Partikel (AMI-25) eine Suszeptibilität von  $25.000 \times 10^{-6}$  cgs bestimmt [194]. Die Suszeptibilitäten der hergestellten Chargen liegen damit in einem Bereich wie er auch für etablierte Kontrastmittel (AMI-25) bestimmt wurde.

### 5.3.2 Protonenrelaxation in Gegenwart der SPIO-Chargen

Die ermittelten Relaxivitäten sind in Kapitel 4.3.4 beschrieben. Die Relaxivitäten der Charge A können aufgrund ähnlicher Partikelgröße und gleichem Beschichtungsmaterial mit denen von SHU 555 C verglichen werden und zeigen unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Feldstärken eine gute Übereinstimmung (Tab. 13).

In Plasma sind die  $R_2$ -Relaxivitäten aufgrund der höheren Viskosität erwartungsgemäß etwas höher als in Wasser (vgl. Abb. 46, S. 83). Auch SHU 555 A zeigt eine höhere Relaxivität in Plasma als in Wasser [195].

Tab. 13: Vergleich der  $R_1$ - und  $R_2$ - Relaxivitäten von Charge A mit Daten von SHU 555 C.

	<b>SHU 555 C (0,47T) [83]</b>	<b>Charge A (1,41 T)</b>	<b>SHU 555 C (1,5 T) [82]</b>
$R_1$ -Relaxivität <sup>1)</sup>	$24,0 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$13,2 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$11 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$
$R_2$ -Relaxivität <sup>1)</sup>	$60,0 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$49,4 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$38 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$

Entsprechend der Theorie von Roch und Gillis (siehe Kap. 2.3.3) ist ein annähernd linearer Anstieg der  $R_2$ -Relaxivitäten mit der Partikelgröße zu erwarten [71]. Die Theorie ist allerdings nur bis zu einem hydrodynamischen Partikeldurchmesser von 15 nm beschrieben und gilt genau genommen nur für Partikel, die aus einzelnen Eisenoxid-Kristalliten bestehen

(MION) [196]. Anhand der Transmissionselektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass die Partikel der Charge A (20 nm) vorrangig aus einzelnen Eisenoxid-Kristalliten bestehen (vgl. Kap. 5.2.5) und tatsächlich stimmen die experimentell ermittelten Relaxivitäten der Charge A sehr gut mit den nach Theorie errechneten  $R_1$ - und  $R_2$ -Relaxivitäten für 15 nm große Partikel überein (Charge A:  $R_1$  13,2 und  $R_2$  49,4 l/(mmol·s) Theorie:  $R_1$ : 12 und  $R_2$ : 50 l/(mmol·s)). Für größere Partikel ist das theoretische Modell aufgrund der multikristallinen Kerne nicht anwendbar [190]. Es ist jedoch auffällig, dass die Steigung der Relaxivitäten mit der Partikelgröße aus der Theorie von Roch und Gillis [71] sehr gut mit der in der Praxis ermittelten Steigung für größere Partikel übereinstimmt (Abb. 68).

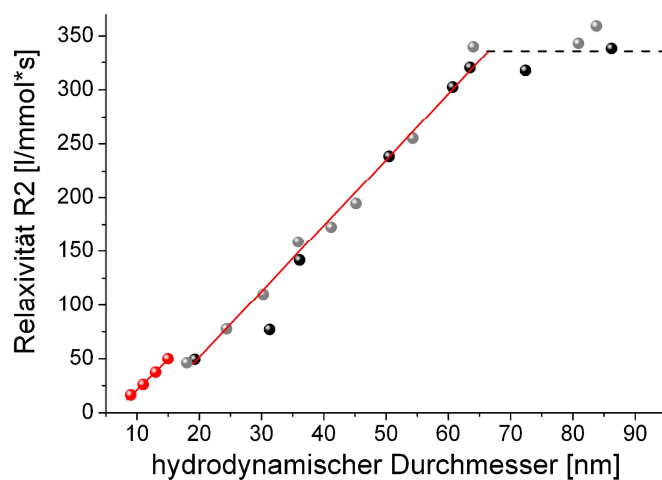


Abb. 68: Vergleich der nach Relaxationstheorie von Roch und Gillis errechneten  $R_2$ -Relaxivitäten (vgl. Abb. 14, S. 19) mit den experimentell bestimmten  $R_2$ -Relaxivitäten der hergestellten SPIO-Chargen.

Rheinländer *et. al.* konnte eine ähnliche Zunahme der  $R_2$ -Relaxivität mit zunehmender hydrodynamischer Partikelgröße zeigen [165]. Beachtenswert ist, dass die  $R_2$ -Relaxivitäten für Partikelgrößen ab ca. 60 nm nicht weiter ansteigen (vgl. Abb. 47, S. 84). Dies kann mit Hilfe der gemessenen Suszeptibilitäten erklärt werden (vgl. Kap. 5.3.1). Die Suszeptibilitäten der SPIO-Chargen steigen ebenfalls linear bis zu einem hydrodynamischen Durchmesser von ca. 60 nm an und erreichen dann einen konstanten Wert.

Die Suszeptibilitäten (vgl. Kap. 5.3.1) der SPIO-Partikel beeinflussen die Relaxivitäten der umgebenden Protonen. Nach dem HF-Impuls in der Magnetresonanztomographie befinden sich die Protonen in der Umgebung des Kontrastmittels in Phase. Je größer nun das magnetische Moment der SPIO-Partikel ist, desto schneller geraten die Protonen außer Phase und entsprechend stärker wird die  $T_2$ -Zeit verkürzt. Das heißt, je größer die Suszeptibilität der Partikel ist, desto kürzer sind die  $T_2$ -Zeiten der umgebenden Protonen und desto höher ist die Relaxivität [197].



#### 5.4 Phagozytoseaktivität der hergestellten Formulierungen

Die Zytotoxizität von Carboxydextran beschichteten SPIO-Partikeln ist bereits in der Literatur beschrieben. So zeigte Hsiao *et. al.*, dass sich die Überlebensraten der Zellen zwischen behandelter und unbehandelter Gruppe bis zu einer Konzentration von 100 µg Fe/mL nicht signifikant unterscheiden [198]. Metz *et. al.* zeigte sogar, dass sich bis zu einer 200-fachen Konzentration der humanen Dosis (2000 µg/mL) keine Zytotoxizität nachweisen lässt [199]. Auf *in vitro* Test zur Bestimmung der Zytotoxizität wurde daher in der vorliegenden Arbeit verzichtet.

Die durchgeführte *in vitro* Untersuchung zur Phagozytoseaktivität zeigt, dass die zelluläre Eisenaufnahme bis zu einer Partikelgröße von 40 nm ansteigt und dann ein Maximum erreicht (vgl. Abb. 52, S. 88). Die Ergebnisse bestätigen damit früher veröffentlichte Daten, bei denen ebenfalls eine gesteigerte Eisenaufnahme mit zunehmender Partikelgröße nachgewiesen wurde [20, 199-201].

Ein direkter Vergleich der absoluten aufgenommenen Eisenmenge mit Literaturdaten ist nicht möglich, da die Eisenaufnahme bei unterschiedlichen Zelllinien stark variieren kann. Die Größenordnung der absoluten Eisenaufnahme ist jedoch durchaus vergleichbar. So ermittelte z.B. Matuszewski *et. al.* für SHU 555 A bei einer 60-fach höheren Eisenkonzentration eine Eisenaufnahme von 16,9 pg Eisen / Zelle (Zelllinie: CLL-185, 24 h Inkubationszeit) [20]. Obwohl die P388-Zellen nur eine Stunde mit den Formulierungen inkubiert wurden, liegen die phagozytierten Eisenmengen mit 2,2 pg Eisen / Zelle bis 6,7 pg Eisen / Zelle (40 – 120 fmol Eisen / Zelle) in einem ähnlichen Bereich. Peldschus *et. al.* bestimmte für SHU 555 A eine Aufnahme von 1,5 pg Eisen / Zelle für mesenchymale Stammzellen (isoliert aus dem Knochenmark von Sprague-Dawley-Ratten) bei einer 3,3-fachen Eisenkonzentration und einer Inkubationszeit von 24 Stunden [202].

Die quantitative Eisenmenge pro Zelle gibt jedoch keine Aussage darüber, wie viele SPIO-Partikel tatsächlich von den P-388 Zellen phagozytiert wurden. Die P388-Zellen wurden für alle Chargen mit gleicher Eisenkonzentration inkubiert. Da die Partikelradien von Charge A nach H zunehmen, bedeutet das, dass die Charge A aufgrund des geringeren Volumens pro Partikel bei gleicher Eisenkonzentration eine höhere Partikelanzahl hat als die Chargen mit größeren Partikeln. Die Charge A enthält beispielsweise die 82-fache Partikelanzahl im Vergleich zu Charge H (vgl. Tab. A 4, S. 130). Wenn die unterschiedliche Partikelanzahl der SPIO-Chargen während der Inkubation außer Acht gelassen wird, ist es

möglich, aus den aufgenommenen Eisenmengen die theoretische Partikelanzahl pro Zelle zu errechnen:

$$V_{\text{Maghemit}} / \text{Zelle} = \frac{n_{\text{Fe}} \cdot M_{\text{Maghemit}} \cdot \rho_{\text{Maghemit}}}{Zelle \cdot M_{\text{Fe}} \cdot 2} \quad (\text{Gl. 34})$$

$$\text{Partikelanzahl} = \frac{V_{\text{Maghemit}}}{V_{\text{SAXS}}} \quad (\text{Gl. 35})$$

Aus den Eisenmengen pro Zelle ( $n_{\text{Fe}}/\text{Zelle}$ ) wurde mit Hilfe des Massenwirkungsgesetzes die theoretische Masse Maghemit pro Zelle errechnet. Über die Dichte von Maghemit ( $\rho_{\text{Maghemit}}$ : 4,9 g/cm<sup>3</sup>) kann das Maghemit-Volumen ( $V_{\text{Maghemit}}$ ) pro Zelle ermittelt werden. Aus dem Quotienten von Maghemit-Volumen und SPIO-Partikelvolumen der SAXS-Ergebnisse ( $V_{\text{SAXS}}$ , vgl. Kap. 4.2.9) wurde die Partikelanzahl pro Zelle berechnet. Bei der Berechnung wurde angenommen, dass die SPIO-Kerne ausschließlich aus Maghemit ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , vgl. Kap. 2.3.2) bestehen und dass die SPIO-Partikel ideal kugelförmig sind (vgl. Kap. 4.2.6). Die Berechnung der Partikelanzahlen pro Zelle ist aufgrund dieser Annahmen lediglich eine Näherungsrechnung, um eine Abschätzung über die SPIO-Partikelanzahl pro Zelle zu erhalten. Die Ergebnisse der resultierenden Partikelanzahlen pro Zelle sind in Abb. 69 dargestellt.

Aus der Modellrechnung wird ersichtlich, dass zwar die aufgenommene Eisenmenge pro Zelle mit der Partikelgröße steigt, jedoch die aufgenommene Partikelanzahl pro Zelle abnimmt. Die P388-Zellen, welche mit Charge A inkubiert wurden, enthalten demnach 20-mal mehr Partikel als die Zellen, welche mit Charge H inkubiert wurden (Abb. 70).

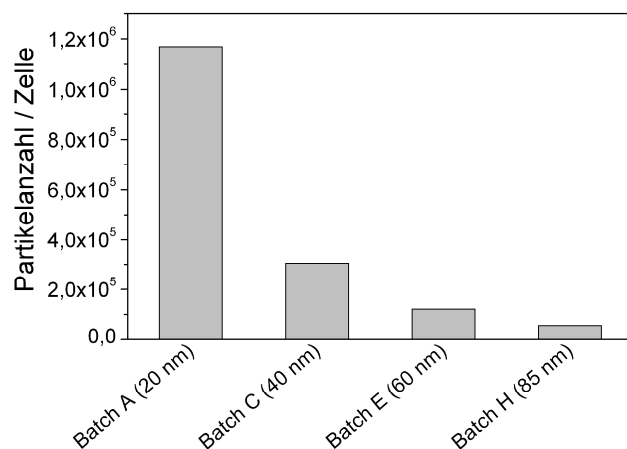


Abb. 69: Theoretische Partikelanzahl pro Zelle nach Inkubation der P388-Zellen mit vier der hergestellten Chargen (Gl. 34 und Gl. 35). Bei der Berechnung wurde angenommen, dass die SPIO-Kerne ausschließlich aus Maghemit bestehen und ideal kugelförmig sind.

Warum ab ca. 50 nm eine Sättigung der Eisenaufnahme erreicht wird (Abb. 52, S. 88), kann anhand der Ergebnisse nicht zweifelsfrei erklärt werden. Denkbar wäre z.B., dass die Phagozytose der SPIO-Partikel von der Zelle gestoppt wird, wenn ein bestimmtes Volumen in der Zelle erreicht ist (Platzbedarf der Partikel).

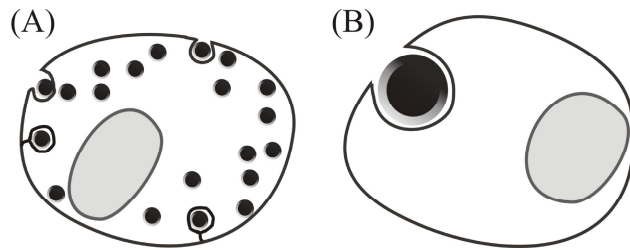


Abb. 70: Schematische Darstellung der phagozytotischen Aufnahme von SPIO-Partikeln. Für die Charge A (A) ergibt sich aus der Modellrechnung (vgl. Abb. 69) eine 20-fach höhere Partikelanzahl im Vergleich zu Charge H (B).

Kritisch ist die Diskussion des genauen Aufnahmemechanismus. Obwohl die Aufnahme von SPIO-Partikeln in Makrophagen bereits vielfach in der Literatur beschrieben wurde (vgl. Kap. 2.3.4), ist der genaue Mechanismus der zellulären Aufnahme weitgehend ungeklärt. Raynal *et. al.* [90] hat verschiedene Partikelgrößen mit Dextran-Beschichtung verglichen und konnte zeigen, dass die Aufnahme von der Partikelgröße, Inkubationszeit und Dosis abhängig ist. Die erfolgreiche Inhibition der Partikel-Aufnahme mit Fucoidan (Polysaccharid) und Polyinosinsäure (Polycytidyl-Säure) ist ein Hinweis darauf, dass eine SR-A Rezeptor-vermittelte Endozytose an der SPIO-Partikelaufnahme beteiligt ist. Die SR-A-Rezeptoren gehören zu den Scavenger-Rezeptoren (scavenger [engl.] = Straßenfeger) und ermöglichen Fresszellen die Phagozytose von Pathogenen. Der Rezeptor SR-A1 bindet an unterschiedlichste polyanionische Liganden und vermittelt physiologisch die Aufnahme von Bakterien (sowohl gram-positiv als auch -negativ) und abgestorbenen Zellen. Die hergestellten SPIO-Formulierungen sind mit Carboxydextran umhüllt und tragen eine negative Oberflächenladung (vgl. Tab. 7, S. 58). Die Beteiligung von Scavenger-Rezeptoren ist daher sehr nahe liegend, dennoch müssten zur genauen Aufklärung des Mechanismus weitere Experimente durchgeführt werden.

## 5.5 Einfluss der Partikelgröße auf die Bluthalbwertszeit

Da sich die chemische Zusammensetzung der hergestellten SPIO-Chargen nicht von dem zugelassenen SPIO-Kontrastmittel SHU 555 A unterscheidet, wurde in der vorliegenden Arbeit auf toxikologische Untersuchungen verzichtet.

Es konnte gezeigt werden, dass die Bluthalbwertszeiten bis zu einer hydrodynamischen Partikelgröße von 60 nm abnehmen und dann annähernd konstant bleiben

(vgl. Abb. 57, S. 92). Die verkürzten Bluthalbwertszeiten größerer SPIO-Chargen lassen sich durch die rasche Aufnahme in Zellen des mononukleären Phagozytensystems (MPS) in der Leber (Kupffer'sche Zellen) erklären. Der Einfluss der Partikelgröße ist in der Literatur bereits beschrieben (vgl. Kap. 2.3.4). Die humanen Bluthalbwertszeiten sind zwar wesentlich länger als bei der Ratte, jedoch ist die gleiche Tendenz zu sehen. So zeigen z.B. kleine dextranbeschichtete Partikel (AMI-227) eine Bluthalbwertszeit von 24-36 h, während die größeren Partikel (AMI-25) bereits nach 2 h eliminiert sind [203, 204]. Auch SHU 555 C (20 nm, BHWZ: 6 h) hat verglichen mit SHU 555 A (60 nm, BHWZ: 2,4 - 3,6 h) eine verlängerte humane Bluthalbwertszeit [82, 205].

Die Humandaten können aufgrund des Speziesunterschieds nicht mit den bestimmten Bluthalbwertszeiten verglichen werden. In der Literatur ist jedoch auch die Bluthalbwertszeit von SHU 555 C (20 nm) bei der Ratte beschrieben, welche gut mit der Charge A (20 nm) verglichen werden kann. Für Charge A wurde eine Bluthalbwertszeit von 32,8 min bestimmt, für SHU 555 C eine Bluthalbwertszeit von ~ 35 min [82] (beide 50  $\mu\text{mol Eisen/kg KG}$ ).

Ein sehr interessanter Aspekt ist der Vergleich der Bluthalbwertszeiten zwischen Charge E (60 nm) und SHU 555 A (vgl. Abb. 57, S. 92). SHU 555 A ist ebenfalls mit Carboxydextran beschichtet und hat einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser von ~ 60 nm [76]. Trotzdem unterscheidet sich die Bluthalbwertszeit der Charge E (5,5 min) signifikant ( $p = 0,01$ ) von der Bluthalbwertszeit von SHU 555 A (12,8 min). Dieser Unterschied lässt sich über die unterschiedlichen Partikelgrößenverteilungen der SPIO-Chargen erklären. Mit Hilfe der A4F-Trennung konnte gezeigt werden, dass SHU 555 A im Gegensatz zu Charge E eine breite Partikelgrößenverteilung aufweist und einen hohen Anteil an kleineren Partikeln enthält (Abb. 71).

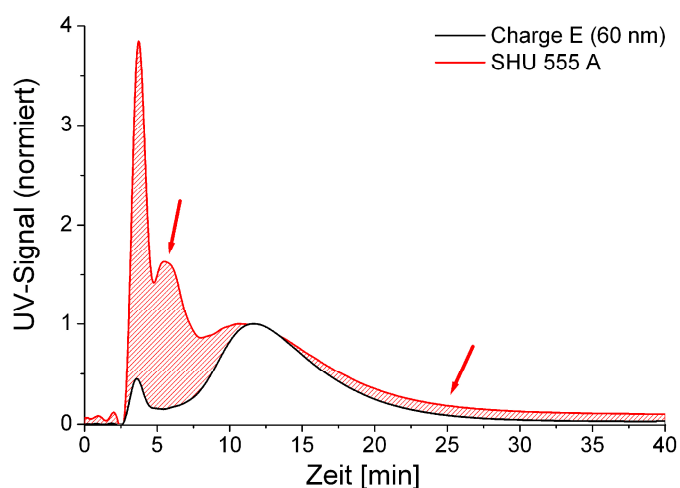


Abb. 71: A4F-Eluogramme der Charge E und von SHU 555 A (Daten vgl. Abb. 26 und Abb. 27 E). Dargestellt sind die normierten Daten des UV-Detektors als Funktion der Zeit. SHU 555 A enthält verglichen mit Charge E einen großen Anteil kleiner Partikel und einige größere Partikel (rote Pfeile).

Die kleineren Partikel zirkulieren länger im Blutkreislauf und verursachen insgesamt eine Verlängerung der Bluthalbwertszeit. Dies macht deutlich, dass Partikelchargen selbst bei gleich bleibender Beschichtung, gleicher Ladung und Zusammensetzung nur vergleichbar sind, wenn sie eine ähnliche Partikelgrößenverteilung aufweisen. Der bimodale Charakter von SHU 555 A wurde kürzlich auch von Thünemann *et. al.* mit Hilfe einer A4F-SAXS Kopplung bestätigt [189].

## 5.6 Einfluss der Partikelgröße auf die Leberhalbwertszeit

Pharmakokinetisch ist zu erwarten, dass die applizierten SPIO-Partikel schnell von den Kupffer'schen Zellen in der Leber aufgenommen werden. In der Leber verursachen sie eine starke  $T_2$ -Relaxationszeitverkürzung der umgebenden Protonen und führen dadurch zu einer Abnahme der Signalintensitäten (vgl. Kap. 2.3.4). Die Abnahme der Signalintensitäten konnte für alle vier untersuchten Chargen gezeigt werden (vgl. Abb. 58, Abb. 59, S. 94).

Wie in Kapitel 4.5.2 beschrieben, ist der Anstieg der Leberhalbwertszeiten mit zunehmender Partikelgröße nicht signifikant (vgl. Abb. 61, S. 95,  $p > 0,05$ ). Auffällig sind die im Vergleich zu den Bluthalbwertszeiten relativ hohen Standardabweichungen der Leberhalbwertszeiten. Das Versuchsdesign zur Bestimmung der Leberhalbwertszeiten unterscheidet sich erheblich von dem der Bluthalbwertszeiten. So kann das Tier während der Bluthalbwertszeitbestimmung im MRT verbleiben und es wird nur jeweils eine Schicht über den erforderlichen Zeitraum gemessen und ausgewertet. Die Leberhalbwertszeiten sind im Gegensatz zu den Bluthalbwertszeiten wesentlich länger. Dass heißt, die Tiere wurden über einen Zeitraum von ca. 4 Wochen immer wieder erneut mittels MRT untersucht. Folglich können die absoluten Signalintensitäten zu verschiedenen Zeitpunkten nicht zur Auswertung verwendet werden. Stattdessen wurde eine  $T_2$ -gewichtete Multi-Spinechosequenz mit 32 unterschiedlichen Echozeiten (TE von 12,9 bis 412,8 ms) verwendet, um daraus die  $T_2$ -Zeiten errechnen zu können. Trotzdem ist die Datenerfassung für die Leberhalbwertszeit, verglichen mit der Bluthalbwertszeit als kritischer zu betrachten. Denn das Messergebnis kann durch mehrere Parameter beeinflusst werden (z.B. Nahrungsaufnahme, Stoffwechselaktivität, Narkose).

Trotz der möglichen Fehlerquellen stimmen die Daten der Leberhalbwertszeiten gut mit Literaturdaten überein. So beschreibt z.B. Lawaczek *et. al.* [76] für SHU 555 A eine Leberhalbwertszeit von  $63 \pm 15$  Stunden, während in der vorliegenden Arbeit für SHU 555 A ein Wert von  $60 \pm 24$  ermittelt wurde.

Wichtig ist, dass bei der Leberhalbwertszeitbestimmung im MRT nur MRT-aktive Metabolite erfasst werden. MRT-inaktive Metabolite, wie oxidierte Verbindungen und Hydroxide, werden mit der beschriebenen  $T_2$ -Methode im MRT nicht erfasst. Studien, die die Eisenkonzentration in der Leber *ex vivo* untersuchen oder szintigraphische  $^{59}\text{Fe}$ -Methoden beschreiben, zeigen längere Leberhalbwertszeiten. Dies liegt daran, dass nicht nur MRT-aktive Metabolite erfasst werden, sondern auch metabolisierte Eisenverbindungen, welche über den Eisenstoffwechsel abgebaut werden (vgl. Kap. 2.3.4). So bestimmte Briley-Saebo *et al.* in einer *ex vivo* Eisenoxidkonzentrationsbestimmung eine Leberhalbwertszeit von 10 Tagen für SHU 555 A und für SHU 555 C [15]. Auch in dieser Studie konnte kein signifikanter Unterschied der Leberhalbwertszeiten in Abhängigkeit von der hydrodynamischen Partikelgröße festgestellt werden. Wie in der vorliegenden Arbeit anhand der Phagozytoseaktivität gezeigt werden konnte, nehmen zwar die Kupffer'schen Zellen in der Leber mit zunehmender Partikelgröße eine größere Menge an Eisen auf, jedoch hat dies keinen großen Einfluss auf die Leberhalbwertszeiten. Betrachtet man allerdings die Relaxationsraten für alle Chargen zu einem bestimmten Zeitpunkt (vgl. Abb. 62, S. 95), so kann nach 7 Tagen ein geringer aber signifikanter Unterschied im Abbau der SPIO-Partikel gezeigt werden. Während nach 24 Stunden die  $T_2$ -Zeiten in der Leber für alle vier untersuchten Chargen noch annähernd gleich sind, ist nach 7 Tagen die  $T_2$ -Zeit bei größeren Chargen noch deutlicher verkürzt. Denkbar ist, dass größere Partikel verglichen mit kleineren Partikeln aufgrund ihrer verringerten Oberfläche nach Aufnahme in die Lysosomen etwas länger brauchen, bis sie unter dem Einfluss von Säure (pH Lysosomen  $\sim 4.5$ ), hydrolytischen Enzymen und Proteinen abgebaut werden und das freie Eisen in den Eisenstoffwechsel des Körpers überführt wird (vgl. Kap. 2.3.4).

## 6 Zusammenfassung

Superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel (SPIOs) werden erfolgreich als Kontrastmittel in der Magnetresonanztomographie (MRT) eingesetzt [206]. Es ist bekannt, dass die Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung der SPIOs die Effektivität im MRT und die Pharmakokinetik stark beeinflusst [13, 15, 78].

Ziel der Arbeit war die Herstellung und Charakterisierung neuer SPIO-Partikel für die MRT-Bildgebung. Mit Hilfe einer magnetischen Separation konnten aus einer synthetisierten SPIO-Rohdispersion acht verschiedene SPIO-Formulierungen mit hydrodynamischen Partikeldurchmessern zwischen 20 nm und 85 nm (Charge A bis H) hergestellt werden. Es ist gelungen, Partikelchargen herzustellen, die sich lediglich in ihrer Partikelgröße unterscheiden und eine enge Partikelgrößenverteilung aufweisen. Zudem konnte gezeigt werden, dass die wässrigen Formulierungen nach Autoklavieren über einen langen Zeitraum (> 2,5 Jahre) stabil sind und für eine intravenöse Applikation geeignet sind.

Die physikochemischen Eigenschaften der hergestellten SPIO-Formulierungen wurden mit vielfältigen analytischen Methoden genau charakterisiert. So konnte die Teilchengrößenanalyse neben bewährten Messverfahren (TEM, SAXS, AUZ, DLS) durch eine bisher selten angewandte separierende und hoch auflösende Charakterisierungsmethode, die *asymmetrischen Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung* (A4F), vorteilhaft unterstützt und intensiviert werden. Dazu wurde erfolgreich eine A4F-Methode etabliert, mit der es möglich ist, Nanopartikelgrößen und deren Partikelgrößenverteilung in einem Größenbereich von 20 nm bis 100 nm richtig und reproduzierbar zu bestimmen. Durch die Kopplung der A4F mit dynamischer Lichtstreuung, statischer Mehrwinkellichtstreuung, UV- und Brechungsindexdetektor konnten die Partikelgrößenverteilungen, die mittleren hydrodynamischen Radien und Gyrationradien direkt und simultan gemessen werden. Zusätzlich war es möglich aus den ermittelten Daten die Polydispersitäten sowie die Formfaktoren zu errechnen. Mit Hilfe der Kleinwinkel-Röntgenstreuung und der Transmissionselektronenmikroskopie konnte ferner die innere Kernstruktur der SPIO-Partikel näher untersucht werden. So wurde gezeigt, dass die SPIO-Kerne der größeren Partikelchargen aus aggregierten monokristallinen Untereinheiten aufgebaut sind.

Mit Hilfe einer supraleitenden Quanteninterferenzeinheit konnte belegt werden, dass sich alle hergestellten SPIO-Chargen bei Raumtemperatur in wässriger Suspension superparamagnetisch verhalten. Die Sättigungsmagnetisierungen lagen dabei zwischen 75 (Charge A) und 95 emu/g Eisen (Charge H). Damit erreichten die größeren Chargen

annähernd die theoretischen Sättigungsmagnetisierung eines Magnetit-Ferrofluids (96,5 emu/g Eisen [192]). Wie aufgrund der hohen Sättigungsmagnetisierungen und der ermittelten hohen Suszeptibilitäten zu erwarten, konnte mit Hilfe der durchgeführten Phantom- und *in vivo* Messungen eine hohe Effektivität der hergestellten SPIO-Formulierungen im MRT belegt werden. Anhand einer T<sub>2</sub>-gewichteten MRT-Phantom-Messung (CPMG-Sequenz) konnte gezeigt werden, dass die Chargen D bis H eine höhere Effektivität im MRT aufweisen als SHU 555 A. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die R<sub>2</sub>-Relaxivitäten mit zunehmender Partikelgröße ansteigen und die R<sub>1</sub>-Relaxivitäten hingegen leicht abnehmen. Die Ergebnisse bestätigen damit die Relaxationstheorie von Roch und Gillis [71].

Mit Hilfe einer *in vitro* Zellstudie mit P388-Zellen (makrophagenähnliche Maus-Zelllinie) konnte gezeigt werden, dass die hergestellten SPIO-Formulierungen phagozytiert werden. Die Eisenaufnahme pro Zelle stieg dabei bis zu einem hydrodynamischen Partikeldurchmesser von 40 nm kontinuierlich an und erreichte ab 50 nm, bei einem Wert von ca. 100 fmol Eisen / Zelle, ein Maximum. Die Ergebnisse der quantitativen Eisenbestimmung in P388-Zellen nach Phagozytose konnten mit Hilfe einer MRT-Zellphantom-Untersuchung weitestgehend bestätigt werden.

Die Blut- und Leberhalbwertszeiten wurden *in vivo* für vier ausgewählte SPIO-Formulierungen (Charge A, C, E und H) in einer explorativen Tierstudie untersucht (Han-Wista-Ratten, Siemens MAGNETOM Allegra syngo MRT 3.0 Tesla). Nach intravenöser Applikation verteilten sich die SPIO-Partikel schnell im intravaskulären Raum und wurden von Zellen des Mononukleären Phagozytensystems (vor allem Leber und Milz) aufgenommen. Es konnte gezeigt werden, dass die Bluthalbwertszeiten der hergestellten SPIO-Formulierungen mit zunehmender Partikelgröße abnehmen. So wurde für die Charge A (20 nm) eine Bluthalbwertszeit von 33 min ermittelt, während die Charge H (85 nm) eine Bluthalbwertszeit von 5 min zeigte. Wie anhand der *in vitro* Zellversuche zu vermuten, unterschieden sich die Bluthalbwertszeiten der Chargen E (60 nm) und H (85 nm) nicht signifikant. Die Leberhalbwertszeiten zeigten eine geringere Abhängigkeit von der Partikelgröße und lagen zwischen 2,0 und 3,7 Tagen. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit sind wertvolle Informationen zur zukünftigen Entwicklung von SPIO-Kontrastmitteln ableitbar.

Die Anwendung von Eisenoxidpartikeln in der molekularen Bildgebung bietet interessante, neue Möglichkeiten in der Medizin und Pharmazie. So können spezifische, funktionalisierte Eisenoxidpartikel in der MRT zur Darstellung vaskulärer Targets genutzt



werden. Limitierender Faktor bei der molekularen Bildgebung mit Eisenoxidpartikeln ist häufig die Sensitivität. So sind oftmals wenige funktionalisierte Eisenoxidpartikel im Zielgewebe zwar histologisch nachweisbar, in der MRT jedoch nicht sichtbar [11, 207]. Im Bereich der molekularen Bildgebung mittels  $T_2$ - oder  $T_2^*$ -gewichteter Sequenzen sollten daher größere Partikel ( $> 50 \text{ nm } d_H$ ) mit hohen  $R_2$ -Relaxivitäten bevorzugt werden. Target-spezifische SPIO-Partikel können sich während der ersten Blutpassage im Zielgewebe anreichern, so dass in der Regel eine kurze Bluthalbwertszeit ausreichend ist. Durch die höheren Suszeptibilitäten bzw.  $R_2$ -Relaxivitäten der größeren SPIO-Partikel können im Zielgewebe höhere Sensitivitäten erreicht werden. Ist die Bindungsstärke zwischen Antikörper und Antigen (Avidität) allerdings schwach, ist vorstellbar dass größere Partikel durch den Blutstrom leichter abgelöst werden können. Es muss daher je nach Anwendung ein Optimum zwischen  $R_2$ -Relaxivität und Rezeptorbindungsstärke gefunden werden. Zur Entwicklung von SPIO-Kontrastmitteln für die Gefäßdarstellung (Angiographie) sollten aufgrund der verlängerten Bluthalbwertszeiten kleinere Partikel ( $< 20 \text{ nm } d_H$ ) bevorzugt werden. Darüber hinaus können kleine Partikel aufgrund ihres geringeren  $R_2/R_1$ -Verhältnisses auch als positive Kontrastmittel in  $T_1$ -gewichteten Sequenzen verwendet werden.

## 7 Abstract

Superparamagnetic Iron Oxide nanoparticles (SPIOs) are widely used as contrast agents for Magnetic Resonance Imaging (MRI) [206]. It is known that the size and size distribution of SPIOs have dramatic effects on pharmacokinetics and contrast efficacy in MRI [13, 15, 78].

The aim of this work was to synthesize and characterize novel SPIOs as contrast agents for application in MRI. By means of a magnetic separation method, eight SPIO-batches having different average particle hydrodynamic sizes in the range of 20 to 85 nm (Batches A to H) were successfully separated from a single SPIO bulk dispersion. The different iron oxide nanoparticle batches varied solely in their particle size and were found to exhibit narrow particle size distributions. Additionally, it was shown that after sterilization by autoclaving, the synthesized aqueous SPIO-formulations are stable over a long period ( $>2.5$  years) and that they are applicable for intravenous administration.

The physicochemical properties of the synthesized SPIO-batches were thoroughly characterized by several analytical methods. Besides the established methods for particle size determination (TEM, SAXS, AUC and DLS), a rarely used *in vitro* characterization method, namely *asymmetrical flow-field-flow-fractionation* (A4F), was applied. Here, an adequate A4F-separation method that allowed separation of nanoparticles in the range of 20 - 100 nm effectively with a high resolution, high accuracy and reproducibility was established. Through the direct coupling of the A4F with a dynamic light scattering, a multi-angle laser light scattering, a UV- and a refractive index detector, it was possible to directly and simultaneously measure the particle size distributions, hydrodynamic radii as well as gyration radii. In addition, the measured A4F data enabled the calculation of the polydispersity indices as well as the shape factors. Furthermore, the inner core particle structure was investigated by means of small-angle X-ray scattering as well as transmission electron microscopy. It was shown that the SPIO-cores of the larger batches are composed of aggregated monocrystalline subunits.

By means of superconducting quantum interference device (SQUID) measurements it was demonstrated that at room temperature all synthesized SPIO-batches show a superparamagnetic behavior in aqueous solution. The saturation magnetizations were found to lie in the range of 75 (Batch A) to 95 emu/g Fe (Batch H). Thus, the values obtained for the larger SPIO-batches, practically reached saturation magnetization of magnetite ferrofluid (96.5 emu/g Fe [192]). As a result of the high saturation magnetization and susceptibility values, a high effectiveness was observed for all of the SPIO-batches in the conducted MRI-phantom and *in vivo* studies. Of interest is that in the T<sub>2</sub>-weighted MRI-phantom study (CPMG sequence) particle batches with average particle sizes greater than 50 nm (Batches D to H) were found have a higher MRI efficacy than SHU 555 A. Additionally, it could be shown that with increasing particle size, the R<sub>2</sub>-Relaxivities increase while the R<sub>1</sub>-Relaxivities slightly decrease. These results confirm the relaxation theory of Roch und Gillis [71].

In an *in vitro* cell study using the P388 cell-line (selected since these cells are known to have a phagocytic activity similar to that of macrophages), it was shown that the SPIO-particles were taken up by the cells by phagocytosis. In the hydrodynamic particle size range of 20 - 50 nm, the Fe uptake per cell was found to increase continuously with increasing particle size, reaching a maximum of ca. 100 fmol Fe/cell for the 50 nm particle batch. The results of the quantitative Fe content determination were subsequently confirmed by the MRT-cell-phantom study.

The blood and liver half-lives of four SPIO-formulations (Batch A, C, E and H) were investigated *in vivo* in an explorative study (using Han-Wistar rats and a Siemens MAGNETOM Allegra syngo MRI clinical scanner at 3.0 Tesla). After intravenous injection, the SPIO particles remain within the intravascular space and are rapidly absorbed by cells of the reticuloendothelial system (mainly liver and spleen). It was shown that the blood half-life increased with decreasing particle size and ranged between 5 min (Batch H; 85 nm) and 33 min (Batch A; 20 nm). The blood half-lives of Batch E (60 nm) and Batch H (85 nm) were found to be very similar (5.5 min and 5.2 min) and confirmed the results obtained in the *in vitro* cell study. The liver half-lives showed a lower dependency on particle sizes and were found to lie in the range of 2.0 to 3.7 days. These findings are likely to be of benefit for the development of next-generation contrast media.

The application of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in molecular imaging creates novel, innovative possibilities in future medicine. Specific, functionalized SPIOs could, for instance, be used for imaging of vascular targets. Often, the detection sensitivity in MRI is a limiting factor. Although functionalized SPIO particles are often histologically found in target tissues, these particles are not commonly visible in MRI. Hence, molecular imaging using  $T_2$ - or  $T_2^*$ -weighted sequences should preferably involve the use of larger particles ( $> 50$  nm  $d_H$ ) since these generally exhibit higher  $R_2$ -relaxivities. Target-specific SPIO particles are able to accumulate in target tissue during the first pass; thus a short blood half-life of 5 min is adequate and a higher blood half-life is not of necessity. Due to their larger susceptibilities or, rather,  $R_2$ -relaxivities, the larger particles enable higher sensitivities to be achieved in target tissue. However, it is conceivable that when the binding strength (avidity) between the vector and target is low, larger particles could more easily detach from the target in cases where blood flow is high. Hence, a balance between  $R_2$ -Relaxivity and avidity must be found for the respective application. For development of SPIO contrast agents for use in angiography, smaller particles ( $< 20$  nm  $d_H$ ) should be preferred because of their extended blood half-life. Furthermore, due to their low  $R_2/R_1$ -ratio, smaller particles are of increasing importance since they are applicable as positive contrast agents in  $T_1$ -weighted imaging.

## 8 Anhang

### 8.1 Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie

Tab. A 1: Überblick über zugelassene Magnetresonanztomographie-Kontrastmittel.

<i>Paramagnetische Kontrastmittel [16]</i>				
<i>Substanz</i>	<i>Handelsname</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Verteilung im Körper</i>	<i>Region</i>
Gadopentetat-Dimeglumine	Magnevist <sup>®</sup>	Bayer Schering Pharma AG	extrazellulär <sup>I</sup>	Ganzkörper
Gadobutrol	Gadovist <sup>®</sup>	Bayer Schering Pharma AG	extrazellulär <sup>I</sup>	ZNS, Gefäße (Perfusion, Angiographie)
Gadoteridol	ProHance <sup>®</sup>	Bracco Diagnostics Inc.	extrazellulär <sup>I</sup>	ZNS; Mamma, Bewegungsapparat, Kopf-Hals Tumore, Leber, Becken
Gadodiamid	Omniscan <sup>™</sup>	GE Healthcare Buchler	extrazellulär <sup>I</sup>	ZNS, Kopf-Hals Tumore, Bewegungsapparat
Gadotersäure	Dotarem <sup>®</sup>	Guerbet GmbH	extrazellulär <sup>I</sup>	ZNS, Mamma, Lunge, Herz, Gefäße, Bewegungsapparat, Leber, Pankreas und Becken
Gadobenat-Dimegulumin	MultiHance <sup>®</sup>	Bracco Diagnostics Inc.	extrazellulär <sup>I</sup> , Hepatozyten <sup>III</sup>	ZNS, Leber (Albuminbindend)
Gadoxetsäure, Dinatrium	Primovist <sup>®</sup>	Bayer Schering Pharma AG	Hepatozyten <sup>III</sup> , Gallenwege	Leber
Gadfosveset-Trinatrium	Vasovist <sup>®</sup>	Bayer Schering Pharma AG	vaskulär <sup>II</sup>	Gefäße (Angiographie), (Albuminbindend)
Mangafodipir-Trinatrium	Teslascan <sup>™</sup>	GE Healthcare Buchler	Hepatozyten <sup>III</sup>	Leber und Pankreas
<i>Superparamagnetische Kontrastmittel [17]</i>				
<i>Substanz</i>	<i>Handelsname</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Verteilung im Körper</i>	<i>Region</i>
Ferucarbotran, SHU 555A	Resovist <sup>®</sup>	Bayer Schering Pharma AG	RES-spezifisch <sup>IV</sup>	Leber
Eisenoxid-Nanopartikel	Endorem <sup>®</sup> Feridex <sup>®</sup>	Guerbet GmbH	RES-spezifisch <sup>IV</sup>	Leber
Eisen(II, III)-oxid, silikonisiert	Gastromark <sup>®</sup> Lumirem <sup>®</sup>	Guerbet GmbH	oral	Verdauungstrakt
<p>I. Wasserlöslicher Komplexe mit niedriger Molmasse, verteilen sich direkt nach i.v. Applikation in den Extrazellular-Raum und werden über die Niere ausgeschieden (glomeruläre Filtration).</p> <p>II. Höhermolekulare Verbindungen oder Verbindungen die an Plasmaproteine binden und langsamer extravasieren (Blood pool KM).</p> <p>III. Substanzen werden von Leberzellen aufgenommen (hepatozytenspezifische KM).</p> <p>IV. Intravaskuläre Kontrastmittel, Abbau erfolgt in Zellen des Retikuloendothelialen Systems (passives Target).</p>				

## 8.2 Relaxationstheorie superparamagnetischer Eisenoxidpartikel

Die Theorie von Roch, Muller und Gillis ist von der „outer-sphere“ Theorie abgeleitet (vgl. Kap. 2.3.3). Die NMRD-Profile (vgl. Abb. 13, S. 19) sind nach folgenden Formeln berechnet [71].

$$\begin{aligned} \frac{1}{T_1} = & \left( \frac{32\pi}{135000} \right) \cdot \hbar^2 \gamma_s^2 \cdot \gamma_I^2 \cdot \left( \frac{N_A c}{R \cdot D} \right) \\ & \times \left\langle \sum_{i,j} (\exp(-\beta E_i) / Z) \left\{ (S_{-,ij} S_{+,ij} + S_{+,ij} S_{-,ij}) / 2 [1/2 J^F(\omega_I - \omega_{ij}, \tau_D, \tau_N) + 3 J^F(\omega_I - \omega_{ij}, \tau_D, \tau_N)] \right. \right. \\ & + 3 |S_{z,ij}|^2 [J^F(\omega_I + \omega_{ij}, \tau_D, \tau_N) + J^F(\omega_I + \omega_{ij}, \tau_D, \tau_N)] / 2 \left. \right\} \\ & - 3 \langle S_z \rangle^2 [J^F(\omega_I - \omega_{ij}, \tau_D, \tau_N) - J^A(\sqrt{2\omega_I \tau_D})] \left. \right\rangle \end{aligned} \quad (\text{Gl. A 1})$$

$$\begin{aligned} \frac{1}{T_2} = & \left( \frac{32\pi}{135000} \right) \cdot \hbar^2 \gamma_s^2 \cdot \gamma_I^2 \cdot \left( \frac{N_A c}{R \cdot D} \right) \\ & \times \left\langle \sum_{i,j} (\exp(-\beta E_i) / Z) \left\{ (S_{-,ij} S_{+,ij} + S_{+,ij} S_{-,ij}) / 2 \times [1/4 J^F(\omega_I - \omega_{ij}, \tau_D, \tau_N) + (3/2) J^F(\omega_I - \omega_{ij}, \tau_D, \tau_N)] \right. \right. \\ & + |S_{z,ij}|^2 [2 J^F(\omega_{ij}, \tau_D, \tau_N) + (3/4) (J^F(\omega_I - \omega_{ij}, \tau_D, \tau_N) + J^F(\omega_I + \omega_{ij}, \tau_D, \tau_N))] \left. \right\} \\ & - 2 \langle S_z \rangle^2 \left\{ J^F(0, \tau_D, \tau_N) + (3/4) (J^F(\omega_I, \tau_D, \tau_N) - J^A(0) + (3/4) J^A(\sqrt{2\omega_I \tau_D})) \right\} \left. \right\rangle \end{aligned} \quad (\text{Gl. A 2})$$

Die Gleichungen Gl. A 1 und Gl. A 2 sind abhängig vom Winkel ( $\theta$ ). Diese Abhängigkeit wurde über folgende Näherung eliminiert.

$$R_{1,2} = \int_0^{\pi/2} d\theta \cdot p(\theta) \cdot R_{1,2}(\theta) \quad (\text{Gl. A 3})$$

$1/T_1$	longitudinale Relaxationsrate (Einheit: $s^{-1}$ )
$1/T_2$	Spin - Spin oder transversale Relaxationsrate (Einheit: $s^{-1}$ )
$c$	Konzentration superparamagnetischer Eisenoxidpartikel
$\hbar$	reduziertes Planck'sches Wirkungsquantum
$\gamma_s$	gyromagnetische Verhältnis des Elektrons ( $s = \text{Superspin}$ )
$\gamma_I$	gyromagnetische Verhältnis von Protonen
$R$	Partikelradius der superparamagnetischen Eisenoxidpartikel
$D$	Diffusionskoeffizient von Wasser
$N_A$	Avogadro Konstante, $N_A = 6,0221367 \cdot 10^{23}$

$\tau_N$	Néel Relaxationsrate
$\tau_D$	$=R^2/D$
$\omega_I$	Präzessionsfrequenz der Protonen (vgl. Gl. 1, S. 4)
S	Superspin der Kristallite
$J^A$	Ayant Funktion [208]
$J^F$	Feed Funktion [209]
$R_1$	longitudinale Relaxivität eines Kontrastmittels (Einheit: $L \text{ mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )
$R_2$	transversale Relaxivität eines Kontrastmittels (Einheit: $L \text{ mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )

### 8.3 Mehrwinkellichtstreuung - Winkelabhängigkeit der Streulichtintensitäten

Partikel, welche größer als ein zwanzigstel der verwendeten Wellenlänge (verwendeter Detektor,  $\lambda = 632,8 \text{ nm}$ ) sind, streuen nicht mit gleicher Intensität in alle Raumrichtungen (isotropisch), sondern sie zeigen eine vermehrte Vorwärtsstreuung. Die Winkelabhängigkeit des Streulichtes für unterschiedlich große Partikel ist in Abb. A 1 verdeutlicht.

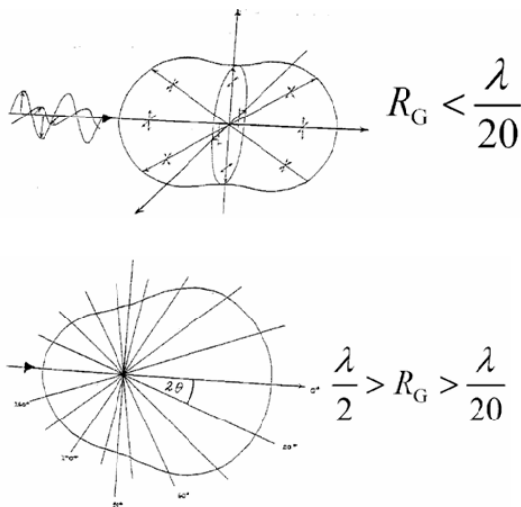


Abb. A 1: Winkelabhängigkeit der Streulichtintensitäten eines Mehrwinkellichtstredetektors in Abhängigkeit von der Partikelgröße. Partikel, die einen Radius kleiner als 1/20-zigstel der Wellenlänge haben, streuen isotropisch in alle Raumrichtungen. Größere Partikel ( $R_G > \lambda/20$ ) streuen hingegen verstärkt in Vorwärtsrichtung.

#### 8.4 Kleinwinkel-Röntgenstreuung

Die gemessenen Streukurven der SAXS-Messungen wurden mit modellierten Streukurven angepasst (vgl. Kap. 3.2.7). Bei der Berechnung wurde angenommen, dass die gemessenen SPIO-Chargen annähernd einer Gauß-Verteilung folgen.

$$f_i(R) = \frac{1}{\sigma_i \sqrt{2\pi}} \exp\left[-\frac{(R - R_i)^2}{2\sigma_i^2}\right] \quad (\text{Gl. A 4})$$

Dabei beschreibt  $f_i(R)$  die Verteilung der Radien ( $R$ ),  $R_i$  ist der mittlere Radius und  $\sigma_i$  gibt die Breite der Verteilung an. Um vergleichbare Aussagen für die Partikelgrößen zu erhalten, wurden die Polydispersitäten ( $\sigma_i$ ) in den Modellrechnungen mit 0,2 als fester Wert eingesetzt. Des Weiteren wurde für die Auswertung der SPIO-Chargen eine kugelförmige Gestalt der Nanopartikel in Dispersion angenommen. Die Streuintensität  $I_i(q)$  einer Fraktion  $i$  kann demnach wie folgt berechnet werden:

$$I_i(q) = k \frac{\phi_i}{V_i} (\rho - \rho_S)^2 \int_0^\infty f_i(R) R^6 [F(qR)]^2 dR \quad (\text{Gl. A 5})$$

Dabei ist  $k$  eine Gerätekonstante,  $\phi_i$  die Volumenfraktion der Partikel und die Differenz:  $(\rho - \rho_S)$  die Elektronendichtedifferenz zwischen Partikel und Lösemittel.  $V_i$  ist dabei das durchschnittliche Volumen der Partikel in einer Fraktion:

$$\langle V_i \rangle = \frac{4}{3} \pi \langle R_i \rangle^3 = \frac{4}{3} \pi R_i^3 (1 + 3p_i^2) \quad (\text{Gl. A 6})$$

und  $F(qR)$  ist die Streuamplitude einer Kugel.

$$F(qR) = (qR)^{-3} [\sin(qR) - qR \cos(qR)] \quad (\text{Gl. A 7})$$

## 8.5 Reproduzierbarkeit der A4F-Methode

Tab. A 2: Berechnung der relativen Standardabweichungen für den UV- und SLS-Detektor zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Die relativen Standardabweichungen liegen unter 3 %.

Detektor:	UV			SLS 90°			SLS 15°		
Probe	$t_{0,25}$	$t_{0,50}$	$t_{0,75}$	$t_{0,25}$	$t_{0,50}$	$t_{0,75}$	$t_{0,25}$	$t_{0,50}$	$t_{0,75}$
1	10,39	12,50	15,53	12,87	15,84	19,68	13,03	16,11	20,10
2	10,81	13,11	16,30	13,51	16,82	21,06	13,70	17,22	21,75
3	10,64	12,81	15,88	13,28	16,47	20,66	13,49	16,88	21,38
4	10,62	12,82	15,97	13,25	16,41	20,54	13,41	16,80	21,10
5	10,51	12,66	15,70	13,16	16,33	20,49	13,41	16,82	21,29
6	10,95	13,24	16,42	13,71	16,98	21,20	13,94	17,39	21,87
<b>MW</b>	<b>10,65</b>	<b>12,86</b>	<b>15,97</b>	<b>13,30</b>	<b>16,47</b>	<b>20,60</b>	<b>13,49</b>	<b>16,87</b>	<b>21,25</b>
<b>SD</b>	<b>0,20</b>	<b>0,28</b>	<b>0,34</b>	<b>0,29</b>	<b>0,40</b>	<b>0,54</b>	<b>0,306</b>	<b>0,442</b>	<b>0,633</b>
<b>VK [%]</b>	<b>1,90</b>	<b>2,14</b>	<b>2,15</b>	<b>2,19</b>	<b>2,42</b>	<b>2,60</b>	<b>2,27</b>	<b>2,62</b>	<b>2,98</b>

MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, VK: Variationskoeffizient bzw. relative Standardabweichung

## 8.6 Analytische Ultrazentrifugation

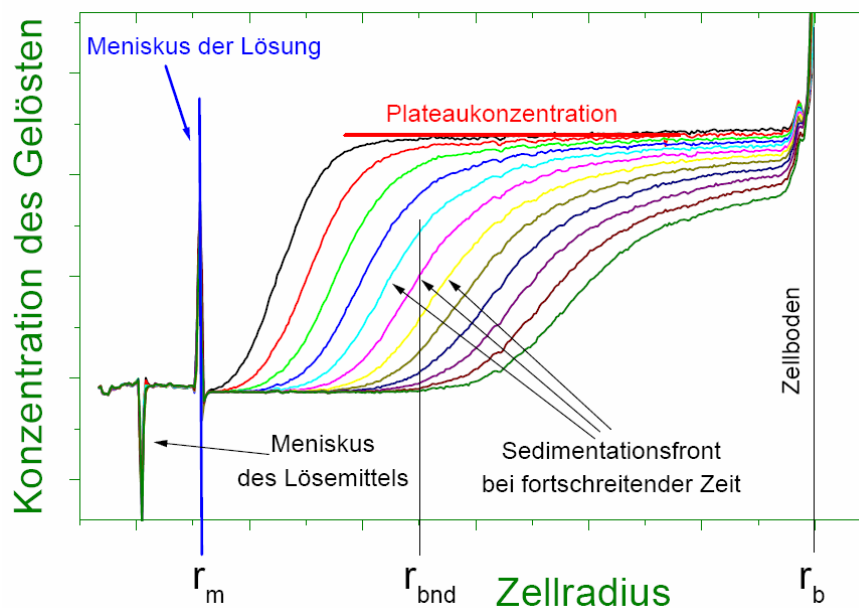


Abb. A 2: Dargestellt ist eine Beispielmessung der analytischen Ultrazentrifugation [210]. Gemessen wird ein orts aufgelöstes Konzentrationsprofil über den radialen Verlauf der Messzelle. Die Messung wird während der Ultrazentrifugation wiederholt, wodurch auch zeitaufgelöste Daten erhalten werden. Die erste Messkurve ist in der Abbildung schwarz und die letzte grün dargestellt. Aufgrund der Zentrifugalkraft sedimentieren die Partikel und mit fortschreitender Zeit verschiebt sich die Sedimentationsfront in Richtung Zellboden. Je schärfer die Sedimentationsfront ausgebildet ist, desto schmäler ist die Partikelgrößenverteilung. Ist die Sedimentationsfront hingegen flach, liegt eine breite Partikelgrößenverteilung vor und die Partikel werden durch ihre unterschiedlichen Sedimentationsgeschwindigkeiten aufgetrennt.



## 8.7 Superconducting Quantum Interference Device (SQUID)

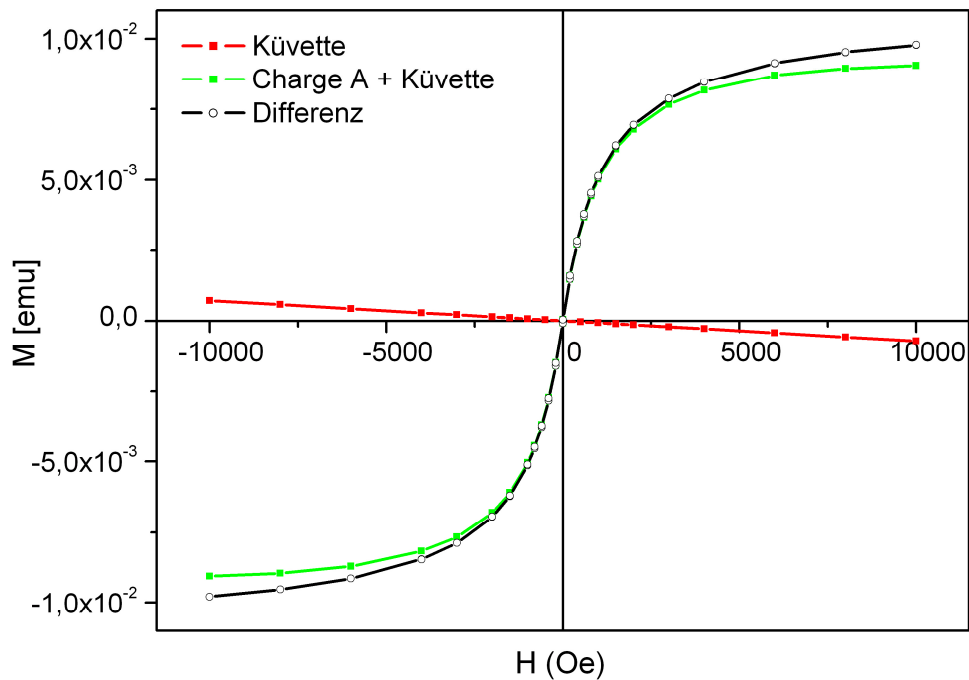


Abb. A 3: Dargestellt sind die SQUID-Rohdaten einer Leermessung der verwendeten Glasküvette (rot), einer Glasküvette mit SPIO-Charge A (grün) und die errechnete Differenz (schwarz). Die Differenz wurde zur Berechnung der Magnetisierung pro Gramm Eisen verwendet (vgl. Kap. 3.3.1). Die Korrektur der Messdaten war notwendig, da die leere Glasküvette ein leichtes diamagnetisches Verhalten zeigte.

## 8.8 Sättigungsmagnetisierungen

Tab. A 3: Sättigungsmagnetisierungen der hergestellten SPIO-Chargen.

<i>Charge</i>	<i>Ms (emu/g Fe)<sup>1)</sup></i>	<i>Ms<sub>1</sub> (emu/g Fe)</i>	<i>Ms<sub>2</sub> (emu/g Fe)</i>
Charge A (20 nm)	74,9 ± 1,8	39,2 ± 1,8	35,7 ± 1,2
Charge B (30 nm)	75,7 ± 1,5	44,2 ± 1,1	31,5 ± 1,0
Charge C (40 nm)	76,3 ± 8,2	62,1 ± 6,0	14,2 ± 5,6
Charge D (50 nm)	84,0 ± 3,8	73,4 ± 2,8	10,6 ± 2,6
Charge E (60 nm)	94,0 ± 4,5	74,6 ± 3,3	19,4 ± 3,1
Charge F (65 nm)	94,1 ± 3,9	74,7 ± 3,3	19,4 ± 3,1
Charge G (70 nm)	92,8 ± 8,5	76,7 ± 6,2	16,1 ± 5,7
Charge H (85 nm)	95,1 ± 5,3	72,1 ± 3,8	23,0 ± 3,7

1) Mittelwert Sättigungsmagnetisierung ± Standardabweichung, errechnet nach einer zusammengesetzten Langevin Gleichung (vgl. Gl. 10, S. 12 und Gl. 33, S. 80)

## 8.9 Anfangsuszeptibilität

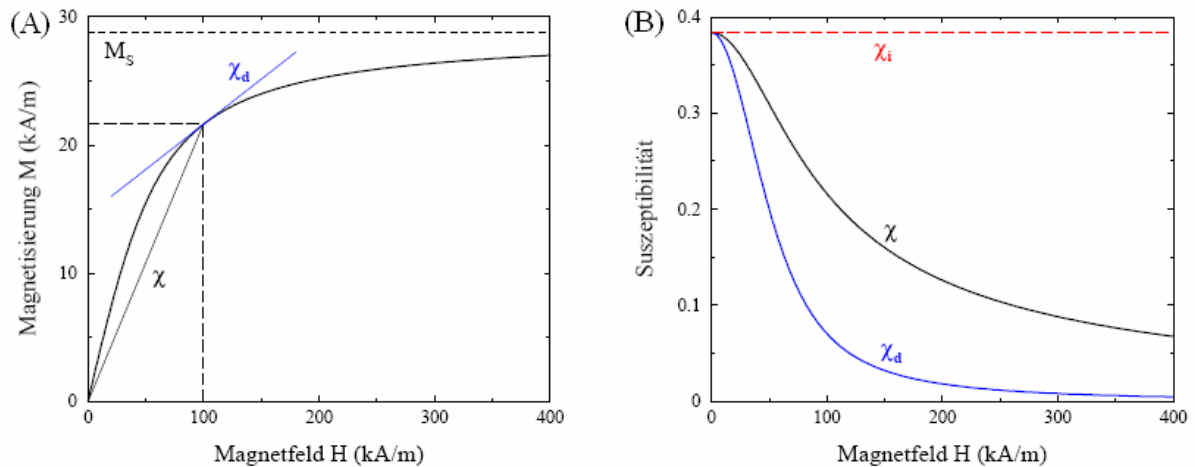


Abb. A 4: (A) Bei kleiner Magnetfeldstärke ( $H$ ) steigt die Suszeptibilität linear an und erreicht bei großen Magnetfeldstärken den Sättigungswert  $M_s$  ( $5000 \text{ Oe} = 397,9 \text{ kA/m}$ ). Die Definition der Suszeptibilität (vgl. Gl. 4, S. 8) als Quotient von Magnetisierung und Feldstärke gilt nur für den linearen Bereich. Aus diesem Grund wird neben der Anfangsuszeptibilität (auch initiale Suszeptibilität genannt,  $\chi_i$ ) die differentielle Suszeptibilität  $\chi_d$  eingeführt. (B) Für  $H \rightarrow 0$  stimmen  $\chi$ ,  $\chi_i$  und  $\chi_d$  überein. Abbildung entnommen aus Langer *et. al.* [211].

## 8.10 Bestimmung des Feinpartikelanteils in Charge E mittels A4F

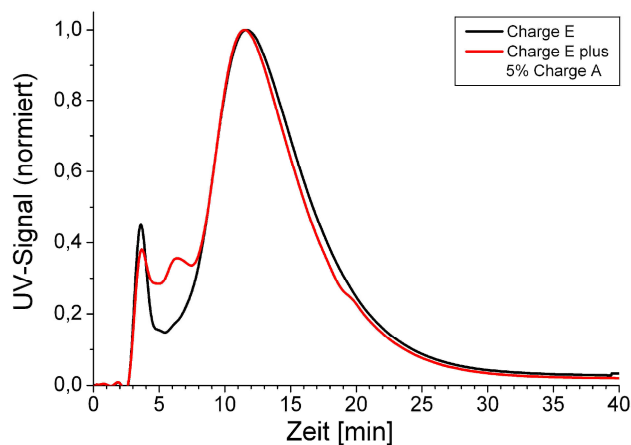


Abb. A 5: Dargestellt sind die A4F-Elugramme der Charge E (schwarz) und der Charge E nach Zugabe von 5 % (v/v) Charge A (rot). Die kleinen Partikel der Charge A (20 nm) sind neben denen der Charge E gut detektierbar.

### 8.11 Komplexometrische Phenanthrolinfärbung

Zur Bestimmung des Eisengehaltes in P-388 Zellen nach phagozytotischer Aufnahme der SPIO-Chargen (vgl. Kap. 3.4.3) wurde eine komplexometrische Phenanthrolinfärbung durchgeführt (vgl. Abb. A 6).

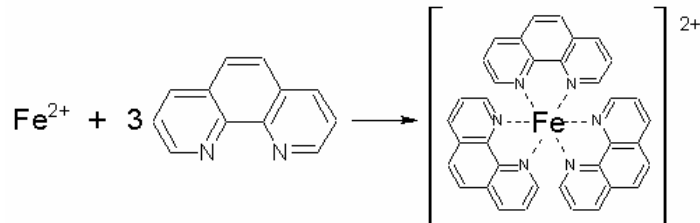


Abb. A 6: Phenanthroline bildet mit Eisen-(II)-Ionen einen orangeroten Komplex, der spektroskopisch quantifizierbar ist.

Phenanthrolinehydrochlorid-Reagenzlösung enthielt: 1,0 g Phenanthrolinehydrochlorid (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), 14 g Eisessig (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), 21,7 g Natriumacetat-Trihydrat (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland) ad 1000 ml Millipore Wasser.

### 8.12 TEM-Bilder zur Größenbestimmung

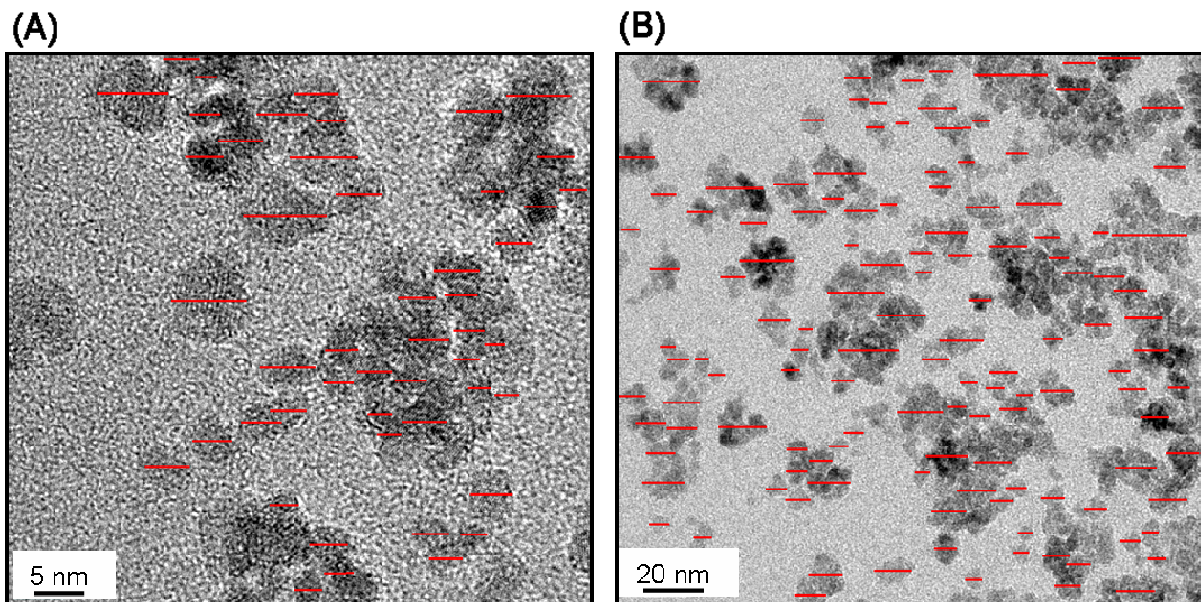


Abb. A 7: Beispielhaft sind die ausgewerteten TEM-Bilder der Charge C (40 nm) dargestellt. Es wurden sowohl die Kristallit- (A) als auch die Aggregatgrößen (B) ausgewertet. Da Trocknungsartefakte während der Probenpräparation nicht auszuschließen sind, handelt es sich um orientierende Größen. Die Ergebnisse der Auswertung sind in Tab. 10 (S. 73) zusammengefasst.

### 8.13 Berechnung von Partikelgrößenverteilungen

Die mittleren hydrodynamischen Radien einer Partikelgrößenverteilung können mit unterschiedlicher Wichtung errechnet werden [146]. Es wird zwischen anzahlgewichteten, volumengewichteten (massengewichteten) und intensitätsgewichteten Mittelwerten unterschieden.

Anzahlgewichtete Verteilung

$$R_{Hn} = \frac{\sum_{i=1}^k n_i R_{Hi}}{\sum_{i=1}^k n_i} \quad (\text{Gl. A 8})$$

Volumengewichtete Verteilung

$$R_{Hw} = \frac{\sum_{i=1}^k n_i R_{Hi}^3 R_{Hi}}{\sum_{i=1}^k n_i R_{Hi}^3} \quad (\text{Gl. A 9})$$

Intensitätsgewichtete Verteilung:

$$R_{Hnt} = \frac{\sum_{i=1}^k n_i R_{Hi}^6 R_{Hi}}{\sum_{i=1}^k n_i R_{Hi}^6} \quad (\text{Gl. A 10})$$

$R_{Hn}$	hydrodynamischer Radius, anzahlgewichtet
$R_{Hw}$	hydrodynamischer Radius, volumengewichtet
$R_{Hnt}$	hydrodynamischer Radius, intensitätsgewichtet
$k$	Umfang der Grundgesamtheit
$i$	Zählvariante
$n$	Partikelanzahl

### 8.14 Partikelanzahl der hergestellten SPIO-Chargen

Die angegebenen Partikelanzahlen (Tab. A 4) wurden mit Hilfe der hydrodynamischen Radien (DLS, „in-batch“) errechnet. Dazu wurde das theoretische Volumen errechnet, welches mit Hilfe der mittleren Dichte des Gesamtpartikels aus der AUZ in g pro Nanopartikel umgerechnet wurde (Dichte AUZ: 1,8 g/ml). Es handelt sich dabei um Näherungswerte, da bei der Berechnung eine mittlere Dichte und eine ideal kugelförmige Gestalt der Partikel angenommen wurden. Ferner wurde ausgehend von der Eisenkonzentration die Masse an Maghemit ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) pro ml-Dispersion berechnet und damit angenommen, dass die Eisenoxidkerne ausschließlich aus Maghemit bestehen.

Tab. A 4: Errechnete Partikelanzahl der hergestellten SPIO-Chargen

<i>Charge</i>	<i>Partikelanzahl / ml</i>
Charge A (20 nm)	$5,129 \cdot 10^{15}$
Charge B (30 nm)	$7,571 \cdot 10^{14}$
Charge C (40 nm)	$4,968 \cdot 10^{14}$
Charge D (50 nm)	$1,975 \cdot 10^{14}$
Charge E (60 nm)	$1,044 \cdot 10^{14}$
Charge F (65 nm)	$8,606 \cdot 10^{13}$
Charge G (70 nm)	$5,243 \cdot 10^{13}$
Charge H (85 nm)	$4,169 \cdot 10^{13}$

---

## Literaturverzeichnis

1. Popov I, Gemming S, Okano S, Ranjan N, Seifert G: Electromechanical switch based on Mo<sub>6</sub>S<sub>6</sub> nanowires. *Nano Lett* 8: 4093-7 (2008)
2. Langer R: Drug delivery and targeting. *Nature* 392: 5-10 (1998)
3. Gupta AK, Gupta M: Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* 26: 3995-4021 (2005)
4. Gabizon AA: Pegylated liposomal doxorubicin: metamorphosis of an old drug into a new form of chemotherapy. *Cancer Invest* 19: 424-36 (2001)
5. Lyass O, Uziely B, Ben-Yosef R, et al.: Correlation of toxicity with pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin (Doxil) in metastatic breast carcinoma. *Cancer* 89: 1037-47 (2000)
6. Safra T, Muggia F, Jeffers S, et al.: Pegylated liposomal doxorubicin (doxil): reduced clinical cardiotoxicity in patients reaching or exceeding cumulative doses of 500 mg/m<sup>2</sup>. *Ann Oncol* 11: 1029-33 (2000)
7. Northfelt DW, Dezube BJ, Thommes JA, et al.: Pegylated-liposomal doxorubicin versus doxorubicin, bleomycin, and vincristine in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma: results of a randomized phase III clinical trial. *J Clin Oncol* 16: 2445-2451 (1998)
8. Corot C, Robert P, Idee JM, Port M: Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. *Adv Drug Deliv Rev* 58: 1471-504 (2006)
9. Taupitz M, Schmitz S, Hamm B: Superparamagnetische Eisenoxidpartikel: Aktueller Stand und zukünftige Entwicklungen. *Superparamagnetic Iron Oxide Particles: Current State and Future Development*: 752-765 (2003)
10. Jordan A, Scholz R, Wust P, Fahling H, Roland F: Magnetic fluid hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 201: 413-419 (1999)
11. Lee JH, Huh YM, Jun YW, et al.: Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-sensitive molecular imaging. *Nat Med* 13: 95-9 (2007)
12. Zhang Y, Kohler N, Zhang M: Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake. *Biomaterials* 23: 1553-1561 (2002)
13. Chouly C, Pouliquen D, Lucet I, Jeune JJ, Jallet P: Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution. *J Microencapsul* 13: 245-55 (1996)
14. Natarajan A, Gruettner C, Ivkov R, et al.: NanoFerrite Particle Based Radioimmunonanoparticles: Binding Affinity and In Vivo Pharmacokinetics. *Bioconjugate Chem.* 19: 1211-1218 (2008)
15. Briley-Saebo KC, Johansson LO, Hustvedt SO, et al.: Clearance of iron oxide particles in rat liver: effect of hydrated particle size and coating material on liver metabolism. *Invest Radiol* 41: 560-71 (2006)
16. LaConte LEW, Nitin N, Zurkiya O, et al.: Coating thickness of magnetic iron oxide nanoparticles affects R<sub>2</sub> relaxivity. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 26: 1634-1641 (2007)
17. Büscher K, Helm CA, Gross C, et al.: Nanoparticle composition of a ferrofluid and its effects on the magnetic properties. *Langmuir* 20: 2435-44 (2004)
18. Itrich H, Lange C, Dahnke H, et al.: Untersuchungen zur Markierung von mesenchymalen Stammzellen mit unterschiedlichen superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln und Nachweisbarkeit in der MRT bei 3T. *Fortschr Röntgenstr* 177: 1151-1163 (2005)

19. Jung CW, Jacobs P: Physical and chemical properties of superparamagnetic iron oxide MR contrast agents: Ferumoxides, ferumoxtran, ferumoxsil. *Magnetic Resonance Imaging* 13: 661-674 (1995)
20. Matuszewski L, Persigehl T, Wall A, et al.: Cell Tagging with Clinically Approved Iron Oxides: Feasibility and Effect of Lipofection, Particle Size, and Surface Coating on Labeling Efficiency. *Radiology*: 2351040094 (2005)
21. Sjögren CE, Johansson C, Nævestad A, et al.: Crystal size and properties of superparamagnetic iron oxide (SPIO) particles. *Magnetic Resonance Imaging* 15: 55-67 (1997)
22. Niederlag W, Lemke HU, Semmler W, Bremer C: *Molecular Imaging – Innovationen und Visionen in der medizinischen Bildgebung*, Dresden (2003)
23. Brix G, Kolem H, Nitz WR, et al.: Basics of Magnetic Resonance Imaging and Magnetic Resonance Spectroscopy in. *Magnetic Resonance Tomography*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg (2008). pp 3-167
24. Schild HH: *MRI made easy (well almost)*, Berlin (1990)
25. Saebo KB: Degradation, Metabolism and Relaxation Properties of Iron Oxide Particles for Magnetic Resonance Imaging. *Faculty of Medicine, Department of Oncology, Radiology and Clinical Immunology*. Uppsala University (2004)
26. Bloch F, Hansen WW, Packard M: Nuclear Induction. *Physical Review* 69: 127 (1946)
27. Purcell EM, Torrey HC, Pound RV: Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid. *Physical Review* 69: 37 (1946)
28. Fletcher LM, Barsotti JB, Hornak JP: A multispectral analysis of brain tissues. *Magn Reson Med* 29: 623-30 (1993)
29. Reimer P, Vosshenrich R: Kontrastmittel in der MRT. *Der Radiologe* 44: 273-283 (2004)
30. Runge VM: Safety of approved MR contrast media for intravenous injection. *J Magn Reson Imaging* 12: 205-13 (2000)
31. Krause W: *Contrast Agents I*. Springer-Verlag, Berlin / Heidelberg (2002)
32. Taupitz M, Schmitz S, Hamm B: Superparamagnetic iron oxide particles: current state and future development. *Rofo* 175: 752-65 (2003)
33. Glöckl G, Weitschies W: Nanopartikelbasierte Kontrastmittel. *Der Onkologe* 13: 931-938 (2007)
34. Martin DH: *Magnetism in Solids*. MIT Press, Cambridge (1967)
35. Hollemann AF, Wiberg N: Lehrbuch der Anorganischen Chemie in. de Gruyter-Verlag, Berlin (1995). pp 1307
36. Rosensweig RE: *Ferrohydrodynamics* in. Dover Publications, Inc., New York 1998 pp 61
37. Samara GA, Giardini AA: Effect of Pressure on the Néel Temperature of Magnetite. *Physical Review* 186: 577 (1969)
38. Lefever R: Maghemite gamma-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in. *Landolt-Börnstein: Numerical Data and Functional Relationships in Science and Technology* Springer-Verlag (1970). pp 18-20
39. Pankhurst QA, Connolly J, Jones SK, Dobson J: Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*: R167 (2003)
40. Wang YX, Hussain SM, Krestin GP: Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging. *Eur Radiol* 11: 2319-31 (2001)
41. Getzlaff M: Solid State Magnetism in. *Fundamentals of Magnetism* (2006). pp 25-39
42. Néel L: Thermoremanent Magnetization of Fine Powders. *Reviews of Modern Physics* 25: 293 (1953)

43. Aharoni A: Introduction to the Theory of Ferromagnetism in. 2nd. Oxford Science Publications, Oxford 2000. pp 94
44. Brown WF: Thermal Fluctuations of a Single-Domain Particle. *Physical Review* 130: 1677 (1963)
45. Bulte JW, Brooks RA, Moskowitz BM, Bryant LH, Jr., Frank JA: Relaxometry and magnetometry of the MR contrast agent MION-46L. *Magn Reson Med* 42: 379-84 (1999)
46. Gupta AK, Naregalkar RR, Vaidya VD, Gupta M: Recent advances on surface engineering of magnetic iron oxide nanoparticles and their biomedical applications. *Nanomed* 2: 23-39 (2007)
47. Sode K, Kudo S, Sakaguchi T, Nakamura N, Matsunaga T: Application of bacterial magnetic particles for highly selective mRNA recovery system. *Biotechnology Techniques* 7: 688-694 (1993)
48. Morisada S, Miyata N, Iwahori K: Immunomagnetic separation of scum-forming bacteria using polyclonal antibody that recognizes mycolic acids. *Journal of Microbiological Methods* 51: 141-148 (2002)
49. Hu A, Yee GT, Lin W: Magnetically Recoverable Chiral Catalysts Immobilized on Magnetite Nanoparticles for Asymmetric Hydrogenation of Aromatic Ketones. *Journal of the American Chemical Society* 127: 12486-12487 (2005)
50. Bayer Schering Pharma AG: Fachinformation: Resovist<sup>®</sup> 0,5 mmol Fe/ml Injektionslösung, Fertigspritze (2007)
51. Blakeborough A, Ward J, Wilson D, et al.: Hepatic lesion detection at MR imaging: a comparative study with four sequences. *Radiology* 203: 759-765 (1997)
52. Tang T, Howarth SPS, Miller SR, et al.: Assessment of Inflammatory Burden Contralateral to the Symptomatic Carotid Stenosis Using High-Resolution Ultrasmall, Superparamagnetic Iron Oxide-Enhanced MRI. *Stroke* 37: 2266-2270 (2006)
53. Trivedi RA, U-King-Im J-M, Graves MJ, et al.: In Vivo Detection of Macrophages in Human Carotid Atheroma: Temporal Dependence of Ultrasmall Superparamagnetic Particles of Iron Oxide-Enhanced MRI. *Stroke* 35: 1631-1635 (2004)
54. Trivedi RA, Mallawarachi C, U-King-Im J-M, et al.: Identifying Inflamed Carotid Plaques Using In Vivo USPIO-Enhanced MR Imaging to Label Plaque Macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 1601-1606 (2006)
55. Hyafil F, Laissy J-P, Mazighi M, et al.: Ferumoxtran-10-Enhanced MRI of the Hypercholesterolemic Rabbit Aorta: Relationship Between Signal Loss and Macrophage Infiltration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 176-181 (2006)
56. Corot C, Petry KG, Trivedi R, et al.: Macrophage imaging in central nervous system and in carotid atherosclerotic plaque using ultrasmall superparamagnetic iron oxide in magnetic resonance imaging. *Invest Radiol* 39: 619-25 (2004)
57. Dousset V, Brochet B, Deloire MS, et al.: MR imaging of relapsing multiple sclerosis patients using ultra-small-particle iron oxide and compared with gadolinium. *AJNR Am J Neuroradiol* 27: 1000-5 (2006)
58. Kresse M, Wagner S, Pfefferer D, et al.: Targeting of ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO) particles to tumor cells in vivo by using transferrin receptor pathways. *Magn Reson Med* 40: 236-42 (1998)
59. Jordan A, Rheinländer T, Waldöfner N, Scholz R: Increase of the Specific Absorption Rate (SAR) by Magnetic Fractionation of Magnetic Fluids. *Journal of Nanoparticle Research* 5: 597-600 (2003)
60. Sneed PK, Stauffer PR, McDermott MW, et al.: Survival benefit of hyperthermia in a prospective randomized trial of brachytherapy boost +/- hyperthermia for glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 40: 287-95 (1998)



61. Wust P, Hildebrandt B, Sreenivasa G, et al.: Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncol* 3: 487-97 (2002)
62. Bulte JWM, Kraitchman DL: Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. *NMR in Biomedicine* 17: 484-499 (2004)
63. Hoehn M, Küstermann E, Blunk J, et al.: Monitoring of implanted stem cell migration in vivo: A highly resolved in vivo magnetic resonance imaging investigation of experimental stroke in rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 16267-16272 (2002)
64. Kraitchman DL, Heldman AW, Atalar E, et al.: In Vivo Magnetic Resonance Imaging of Mesenchymal Stem Cells in Myocardial Infarction. *Circulation* 107: 2290-2293 (2003)
65. Sosnovik DE, Nahrendorf M, Weissleder R: Molecular Magnetic Resonance Imaging in Cardiovascular Medicine. *Circulation* 115: 2076-2086 (2007)
66. Berkova Z, Jirak D, Zacharovova K, et al.: Labeling of pancreatic islets with iron oxide nanoparticles for in vivo detection with magnetic resonance. *Transplantation* 85: 155-9 (2008)
67. Tóth É, Helm L, Merbach A: Relaxivity of MRI Contrast Agents in. *Contrast Agents I*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg (2002). pp 61-101
68. Lauffer RB: Paramagnetic metal complexes as water proton relaxation agents for NMR imaging: theory and design. *Chem. Rev.* 87: 901-927 (1987)
69. Koenig SH, Kellar KE: Theory of  $1/T_1$  and  $1/T_2$  NMRD profiles of Solutions of Magnetic Nanoparticles. *Magnetic Resonance in Medicine* 34: 227-233 (1995)
70. Roch A, Gillis P, Muller RN: Longitudinal Relaxation of water protons in colloidal suspensions of superparamagnetic crystals. *Proceedings of the 11th Annual Meeting of the Society of Magnetic Resonance in Medicine, Works in Progress*, p. 1447 (1992)
71. Roch A, Muller RN, Gillis P: Theory of proton relaxation induced by superparamagnetic particles. *The Journal of Chemical Physics* 110: 5403-5411 (1999)
72. Cline MJ: Histiocytes and histiocytosis. *Blood* 84: 2840-53 (1994)
73. Weissleder R, Stark DD, Engelstad BL, et al.: Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity. *AJR Am J Roentgenol* 152: 167-73 (1989)
74. Pouliquen D, Le Jeune JJ, Perdrisot R, Ermias A, Jallet P: Iron oxide nanoparticles for use as an MRI contrast agent: Pharmacokinetics and metabolism. *Magnetic Resonance Imaging* 9: 275-283 (1991)
75. Majumdar S, Zoghbi SS, Gore JC: Pharmacokinetics of superparamagnetic iron-oxide MR contrast agents in the rat. *Invest Radiol* 25: 771-7 (1990)
76. Lawaczeck R, Bauer H, Frenzel T, et al.: Magnetic iron oxide particles coated with carboxydextran for parenteral administration and liver contrasting. Pre-clinical profile of SH U555A. *Acta Radiol* 38: 584-97 (1997)
77. Kato N, Takahashi M, Tsuji T, et al.: Dose-dependency and rate of decay of efficacy of Resovist on MR images in a rat cirrhotic liver model. *Invest Radiol* 34: 551-7 (1999)
78. Papisov MI, Bogdanov Jr A, Schaffer B, et al.: Colloidal magnetic resonance contrast agents: effect of particle surface on biodistribution. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 122: 383-386 (1993)
79. Song M, Moon WK, Kim Y, et al.: Labeling efficacy of superparamagnetic iron oxide nanoparticles to human neural stem cells: comparison of ferumoxides, monocrystalline iron oxide, cross-linked iron oxide (CLIO)-NH<sub>2</sub> and tat-CLIO. *Korean J Radiol* 8: 365-71 (2007)
80. Bonnemain B: Superparamagnetic agents in magnetic resonance imaging: physicochemical characteristics and clinical applications. A review. *J Drug Target* 6: 167-74 (1998)

81. Tomlinson E: Theory and practice of site-specific drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1: 87-198 (1987)
82. Simon GH, von Vopelius-Feldt J, Fu Y, et al.: Ultrasmall supraparamagnetic iron oxide-enhanced magnetic resonance imaging of antigen-induced arthritis: a comparative study between SHU 555 C, ferumoxtran-10, and ferumoxytol. *Invest Radiol* 41: 45-51 (2006)
83. Clarke SE, Weinmann H-J, Dai E, Lucas AR, Rutt BK: Comparison of Two Blood Pool Contrast Agents for 0.5-T MR Angiography: Experimental Study in Rabbits. *Radiology* 214: 787-794 (2000)
84. Weissleder R, Bogdanov A, Neuwelt EA, Papisov M: Long-circulating iron oxides for MR imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews* 16: 321-334 (1995)
85. Reimer P, Rummeny EJ, Daldrup HE, et al.: Clinical results with Resovist: a phase 2 clinical trial. *Radiology* 195: 489-496 (1995)
86. Hamm B, Staks T, Taupitz M, et al.: Contrast-enhanced MR imaging of liver and spleen: First experience in humans with a new superparamagnetic iron oxide. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 4: 659-668 (1994)
87. Chen F, Ward J, Robinson PJ: MR imaging of the liver and spleen: a comparison of the effects on signal intensity of two superparamagnetic iron oxide agents. *Magnetic Resonance Imaging* 17: 549-556 (1999)
88. Arbab AS, B. L., Ashari WP, et al.: A model of lysosomal metabolism of dextran coated superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles: implications for cellular magnetic resonance imaging. *NMR in Biomedicine* 18: 383-389 (2005)
89. Wilhelm C, Billotey C, Roger J, et al.: Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. *Biomaterials* 24: 1001-1011 (2003)
90. Raynal I, Prigent P, Peyramaure S, et al.: Macrophage endocytosis of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: mechanisms and comparison of ferumoxides and ferumoxtran-10. *Invest Radiol* 39: 56-63 (2004)
91. Moore A, Weissleder R, Bogdanov A, Jr.: Uptake of dextran-coated monocrystalline iron oxides in tumor cells and macrophages. *J Magn Reson Imaging* 7: 1140-5 (1997)
92. Van Beers BE, Sempoux C, Materne R, Delos M, Smith AM: Biodistribution of ultrasmall iron oxide particles in the rat liver. *J Magn Reson Imaging* 13: 594-9 (2001)
93. Müller K, Skepper JN, Posfai M, et al.: Effect of ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles (Ferumoxtran-10) on human monocyte-macrophages in vitro. *Biomaterials* 28: 1629-1642 (2007)
94. Schulze E, Ferrucci JT, Jr., Poss K, et al.: Cellular uptake and trafficking of a prototypical magnetic iron oxide label in vitro. *Invest Radiol* 30: 604-10 (1995)
95. Abramjuk C: Magnetresonanztomographische und histologische Untersuchungen zum biologischen und physikalischen Verhalten eines monomer stabilisierten superparamagnetischen Kontrastmittels für die Magnetresonanztomographie am Modell der Ratte. *FB Veterinärmedizin*. Freie Universität, Berlin (2001)
96. Taupitz M, Wagner S, Schnorr J, et al.: 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* 39: 394-405 (2004)
97. Kopp AF, Laniado M, Dammann F, et al.: MR imaging of the liver with Resovist: safety, efficacy, and pharmacodynamic properties. *Radiology* 204: 749-756 (1997)
98. Taylor AM, Panting JR, Keegan J, et al.: Safety and preliminary findings with the intravascular contrast agent NC100150 injection for MR coronary angiography. *J Magn Reson Imaging* 9: 220-7 (1999)

99. Petersein J, Saini S, Weissleder R: Liver. II: Iron oxide-based reticuloendothelial contrast agents for MR imaging. Clinical review. *Magn Reson Imaging Clin N Am* 4: 53-60 (1996)
100. Giddings JC: A New Separation Concept Based on a Coupling of Concentration and Flow Nonuniformities. *Separation Science and Technology* 1: 123 - 125 (1966)
101. Fraunhofer W, Winter G: The use of asymmetrical flow field-flow fractionation in pharmaceuticals and biopharmaceutics. *Eur J Pharm Biopharm* 58: 369-83 (2004)
102. Wahlund KG, Giddings JC: Properties of an asymmetrical flow field-flow fractionation channel having one permeable wall. *Anal Chem* 59: 1332-9 (1987)
103. Litzen A: Separation speed, retention, and dispersion in asymmetrical flow field-flow fractionation as functions of channel dimensions and flow rates. *Anal. Chem.* 65: 461-470 (1993)
104. Wahlund K-G, Giddings JC: Properties of an asymmetrical flow field-flow fractionation channel having one permeable wall. *Anal Chem* 59: 1332-9 (1987)
105. Litzen A, Wahlund K-G: Effects of temperature, carrier composition and sample load in asymmetrical flow field-flow fractionation. *Journal of Chromatography A* 548: 393-406 (1991)
106. Suslov SA, Roberts AJ: Modeling of sample dynamics in rectangular asymmetrical flow field-flow fractionation channels. *Anal Chem* 72: 4331-45 (2000)
107. Giddings JC, Myers MN: Steric Field-Flow Fractionation: A New Method for Separating 1 to 100  $\mu\text{m}$  Particles *Separation Science and Technology* 13: 637-645 (1978)
108. Ratanathanawongs SK, Giddings JC: Dual-field and flow-programmed lift hyperlayer field-flow fractionation. *Anal Chem* 64: 6-15 (1992)
109. Andreev V, Stefanovich L: Theory of field-flow fractionation with the reversible adsorption on channel walls. *Chromatographia* 37: 325-328 (1993)
110. Cölfen H, Antonietti M: Field-Flow Fractionation Techniques for Polymer and Colloid Analysis in. *New Developments in Polymer Analytics I* (2000). pp 67-187
111. Schimpf ME: Experimental field-flow fractionation: overview in Martin E. Schimpf KC, John Calvin Giddings, ed. *Field Flow Fractionation Handbook*. Wiley Interscience, New York (2000). pp 185-188
112. Tank C, Antonietti M: Characterization of water-soluble polymers and aqueous colloids with asymmetrical flow field-flow fractionation. *Macromolecular Chemistry and Physics* 197: 2943-2959 (1996)
113. Gimbert LJ, Andrew KN, Haygarth PM, Worsfold PJ: Environmental applications of flow field-flow fractionation (FIFFF). *Trends in Analytical Chemistry* 22: 615-633 (2003)
114. Liu M-K, Li P, Giddings JC: Rapid protein separation and diffusion coefficient measurement by frit inlet flow field-flow fractionation. *Protein Science* 2: 1520-1531 (1993)
115. Augsten C, Mäder K: Asymmetrische Fluß Feld-Fluß-Fraktionierung in Verbindung mit Mehrwinkel-Lichtstreuungdetektion. *Pharm. Ind.* 68: 1420-1428 (2006)
116. Madörlein M, van Hoogevest P, Hilfiker R, et al.: Analysis of Drug-Plasma Protein Interactions by Means of Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation. *Pharmaceutical Research* 14: 1706-1712 (1997)
117. Liu J, Andya JD, Shire SJ: A critical review of analytical ultracentrifugation and field flow fractionation methods for measuring protein aggregation. *Aaps J* 8: E580-9 (2006)

118. Reschiglian P, Zattoni A, Roda B, et al.: Bacteria Sorting by Field-Flow Fractionation. Application to Whole-Cell Escherichia coli Vaccine Strains. *Analytical Chemistry* 74: 4895-4904 (2002)
119. Hood DK, Senak L, Kopolow SL, et al.: Structural insights into a novel molecular-scale composite of soluble poly(vinyl pyrrolidone) supporting uniformly dispersed nanoscale poly(vinyl pyrrolidone) particles. *Journal of Applied Polymer Science* 89: 734-741 (2003)
120. Viebke C, Williams PA: Determination of molecular mass distribution of [ $\kappa$ ]-carrageenan and xanthan using asymmetrical flow field-flow fractionation. *Food Hydrocolloids* 14: 265-270 (2000)
121. Wittgren B, Wahlund K-G: Fast molecular mass and size characterization of polysaccharides using asymmetrical flow field-flow fractionation-multiangle light scattering *Journal of Chromatography A* 760: 205-218 (1997)
122. Augsten C, Mäder K: Characterizing molar mass distributions and molecule structures of different chitosans using asymmetrical flow field-flow fractionation combined with multi-angle light scattering. *International Journal of Pharmaceutics* 351: 23-30 (2008)
123. Mao S, Augsten C, Mäder K, Kissel T: Characterization of chitosan and its derivatives using asymmetrical flow field-flow-fractionation: A comparison with traditional methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* In Press, Corrected Proof (2007)
124. Ratanathanawongs Williams SK, Lee D: Field-flow fractionation of proteins, polysaccharides, synthetic polymers, and supramolecular assemblies. *J Sep Sci* 29: 1720-32 (2006)
125. Rheinlander T, Roessner D, Weitschies W, Semmler W: Comparison of size-selective techniques for the fractionation of magnetic fluids. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 214: 269-275 (2000)
126. Williams SKR, Lee H, Turner MM: Size characterization of magnetic cell sorting microbeads using flow field-flow fractionation and photon correlation spectroscopy. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 194: 248-253 (1999)
127. Glatter O, Sieberer J, Schnablegger H: A Comparative Study on Different Scattering Techniques and data evaluation methods for sizing of colloidal systems using light scattering. *Particle and Particle Systems Characterization* 8: 274-281 (1991)
128. Stulik K, Pacakova V, Ticha M: Some potentialities and drawbacks of contemporary size-exclusion chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 56: 1-13 (2003)
129. Schimpf ME: Resolution and fractionating power. in Martin E. Schimpf KC, John Calvin Giddings, ed. *Field Flow Fractionation Handbook*. Wiley Interscience, New York (2000). pp 71-78
130. Litzen A, Walter JK, Krischollek H, Wahlund KG: Separation and Quantitation of Monoclonal Antibody Aggregates by Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation and Comparison to Gel Permeation Chromatography. *Analytical Biochemistry* 212: 469-480 (1993)
131. Thielking H, Roessner D, Kulicke W-M: Online Coupling of Flow Field-Flow Fractionation and Multiangle Laser Light Scattering for the Characterization of Polystyrene Particles. *Anal. Chem.* 67: 3229-3233 (1995)
132. Fraunhofer W, Winter G, Coester C: Asymmetrical flow field-flow fractionation and multiangle light scattering for analysis of gelatin nanoparticle drug carrier systems. *Anal Chem* 76: 1909-20 (2004)
133. Augsten C, Mäder K: Characterizing molar mass distributions and molecule structures of different chitosans using asymmetrical flow field-flow fractionation combined with

- multi-angle light scattering. *International Journal of Pharmaceutics* In Press, Corrected Proof (2007)
134. Berne BJ, Pecora R: *Dynamic Light-Scattering*. John Wiley and Sons, New York (1976)
  135. Pusey PN, Tough RJA: *Dynamic light scattering*. Plenum Press, New York (1985)
  136. Chu B: *Laser Light Scattering*, New York, San Francisco, London (1991)
  137. Winter WT: Measurement of suspended particles by quasi-elastic light scattering in Dahneke BE, ed. *Journal of Polymer Science: Polymer Letters Edition*. Wiley, New York (1983). pp 570
  138. Wagner J: Teilchengrößen-Bestimmung mittels dynamischer Lichtstreuung. *Chemie Ingenieur Technik* 58: 578-583 (1986)
  139. Müller RH, Schuhmann R: *Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (1996)
  140. Malvern Instruments Ltd.: User Manual: Zetasizer Nano Series, Mano 317, Issue 2.2 (2005)
  141. Wyatt PJ: Submicrometer Particle Sizing by Multiangle Light Scattering following Fractionation. *J Colloid Interface Sci* 197: 9-20 (1998)
  142. Kratochvíl P: *Light Scattering from Polymer Solutions*. Elsevier Science, Amsterdam (1987)
  143. Schärfl W: *Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions*. Springer Laboratory, Berlin, Heidelberg (2007)
  144. Roessner D, Kulicke W-M: On-line coupling of flow field-flow fractionation and multi-angle laser light scattering. *Journal of Chromatography A* 687: 249-258 (1994)
  145. Burchard W: Static and dynamic light scattering from branched polymers and biopolymers in. *Light Scattering from Polymers, Advances in Polymer Science* 48 (1983). pp 1-124
  146. Elias H-G: *An Introduction to Polymer Science*. VHC, New York (1997)
  147. Karaiskakis G, Koliadima A, Klepárník K: Estimation of polydispersity in polymers and colloids by field-flow fractionation. *Colloid & Polymer Science* 269: 583-589 (1991)
  148. Nuno CS, Castanho MJEPAM-GDBMARB: Structural characterization (shape and dimensions) and stability of polysaccharide/lipid nanoparticles. *Biopolymers* 41: 511-520 (1997)
  149. Baalousha M, Kammer FV, Motelica-Heino M, Hilal HS, Le Coustumer P: Size fractionation and characterization of natural colloids by flow-field flow fractionation coupled to multi-angle laser light scattering. *J Chromatogr A* 1104: 272-81 (2006)
  150. Chu B, Liu T: Characterization of Nanoparticles by Scattering Techniques. *Journal of Nanoparticle Research* 2: 29-41 (2000)
  151. Kunz D, Thurn A, Burchard W: Dynamic light scattering from spherical particles. *Colloid & Polymer Science* 261: 635-644 (1983)
  152. Fuierer PA, Li B, Jeon HS: Characterization of Particle Size and Shape in an Ageing Bismuth Titanate Sol Using Dynamic and Static Light Scattering. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* 27: 185-192 (2003)
  153. Horak D, Babic M, Mackova H, Benes MJ: Preparation and properties of magnetic nano- and microsized particles for biological and environmental separations. *J Sep Sci* 30: 1751-72 (2007)
  154. Massart R: Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE Transactions on Magnetics* 17: 1247- 1248 (1981)
  155. Lu AH, Salabas EL, Schuth F: Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. *Angew Chem Int Ed Engl* 46: 1222-44 (2007)

156. Tartaj P, Morales MdP, Veintemillas-Verdaguer S, González-Carreño T, Serna CJ: The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine *Journal of Physics D: Applied Physics* 36: 182-197 (2003)
157. Hasegawa M, Hokkoku S: Magnetic iron oxide-dextran complex and process for its production *United States Patent 4101435*. Meito Sangyo Kabushiki Kaisha (Nagoya, JP) (1976)
158. Massart R: Magnetic fluids and process for obtaining them *United States Patent 4329241*. Agence Nationale de Valorisation de la Recherche (ANVAR) (Paris, FR) (1982)
159. Molday RS: Magnetic iron-dextran microspheres *United States Patent 4452773*. Canadian Patents and Development Limited (CA) (1982)
160. Palmacci S, Josephson L: Synthesis of polysaccharide covered superparamagnetic oxide colloids *United States Patent 5262176*. Advanced Magnetics, Inc. (Cambridge, MA) (1993)
161. Groman EV, Paul KG, Frigo TB, Bengeler H, Lewis JM: Heat stable colloidal iron oxides coated with reduced carbohydrates and carbohydrate derivatives *United States Patent 6599498*. Advanced Magnetics, Inc. (Cambridge, MA) (2003)
162. Gunther W, Kellar K, Fujii DK, et al.: Contrast Media. *WO 97/25073*. Nycomed Imaging AS, Großbritannien (1997)
163. Aurich K, Glöckl G, Romanus E, et al.: Magneto-optical relaxation measurements for the characterization of biomolecular interactions. *J. Phys.: Condens. Matter* 18: S2847-S2863 (2006)
164. Glöckl G, Hergt R, Zeisberger M, et al.: The effect of field parameters, nanoparticle properties and immobilization on the specific heating power in magnetic particle hyperthermia. *J. Phys.: Condens. Matter* 18: S2935-S2949 (2006)
165. Rheinlander T, Kotitz R, Weitschies W, Semmler W: Magnetic fractionation of magnetic fluids. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 219: 219-228 (2000)
166. Boumans PWJM: *Inductively Coupled Plasma Emission Spectroscopy, Part I: Methodology, Instrumentation, and Performance* Wiley-Interscience, New York (1987)
167. Müller RH, Hildebrand GE: *Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (1996)
168. Furst A, Taulbee DN, Paul W, Alan T, Colin P: CENTRIFUGATION, Analytical Ultracentrifugation in. *Encyclopedia of Analytical Science*. Elsevier, Oxford (2005). pp 463-469
169. Mächtle W, Börger L: *Analytical Ultracentrifugation of Polymers and Nanoparticles*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg (2006)
170. Williams DB, Carter CB: *Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science*. Springer Verlag, New York (1996)
171. Glatter O, Krakty O: *Small angle x-ray scattering*. Academic Press, London (1982)
172. Kline S: Reduction and analysis of SANS and USANS data using IGOR Pro. *Journal of Applied Crystallography* 39: 895-900 (2006)
173. Pedersen JS: Analysis of small-angle scattering data from colloids and polymer solutions: modeling and least-squares fitting. *Advances in Colloid and Interface Science* 70: 171-210 (1997)
174. Chesca B, Kleiner R, Koelle D: SQUID Theory in Prof. Dr. John Clarke PDAIB, ed. *The SQUID Handbook* (2005). pp 29-92
175. Levy S, Lahoud E, Shomroni I, Steinhauer J: The a.c. and d.c. Josephson effects in a Bose-Einstein condensate. *Nature* 449: 579-583 (2007)

176. Höhne R, Esquinazi P, Heera V, et al.: The influence of iron, fluorine and boron implantation on the magnetic properties of graphite. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 320: 966-977 (2008)
177. Croft GT, Donahoe FJ, Love WF: Automatic Recording Torsional Magnetic Susceptibility Balance. *Review of Scientific Instruments* 26: 360-363 (1955)
178. Mullins CE: Magnetic Susceptibility of the Soil and its significance in soil science. *European Journal of Soil Science* 28: 223-246 (1977)
179. Sachs L: *Angewandte Statistik*. Springer Verlag (1992)
180. Grubbs FE: Procedures for Detecting Outlying Observations in Samples. *Technometrics* 11: 1-21 (1969)
181. Myers MN, Giddings JC: Properties of the Transition from Normal to Steric Field-Flow Fractionation. *Anal. Chem.* 54: 2284-2289 (1982)
182. Fresnais J, Berret JF, Qi L, et al.: Universal scattering behavior of coassembled nanoparticle-polymer clusters. *Physical Review E* 78 (4): 040401-4 (2008)
183. Krakty O: *Small-Angle X-ray Scattering*. Academic Press., London (1982)
184. Kaszuba M, Connah MT, McNeil-Watson FK, Nobbmann U: Resolving Concentrated Particle Size Mixtures Using Dynamic Light Scattering. *Particle & Particle Systems Characterization* 24: 159-162 (2007)
185. Weiner B: Particle sizing using photon correlation spectroscopy in Barth H, ed. *Modern Methods of Particle Size Analysis*, New York (1984). pp 109-113
186. Shen T, Weissleder R, Papisov M, Bogdanov A, Jr., Brady TJ: Monocrystalline iron oxide nanocompounds (MION): physicochemical properties. *Magn Reson Med* 29: 599-604 (1993)
187. Weissleder R: Target-specific superparamagnetic MR contrast agents. *Magnetic Resonance in Medicine* 22: 209-212 (1991)
188. Weissleder R, Lee AS, Khaw BA, Shen T, Brady TJ: Antimyosin-labeled monocrystalline iron oxide allows detection of myocardial infarct: MR antibody imaging. *Radiology* 182: 381-385 (1992)
189. Thünemann AF, Rolf S, Knappe P, Weidner S: In situ analysis of a bimodal size distribution of superparamagnetic nanoparticles. *Anal Chem* 81: 296-301 (2009)
190. Miguel OB, Gossuin Y, Morales MP, et al.: Comparative analysis of the <sup>1</sup>H NMR relaxation enhancement produced by iron oxide and core-shell iron-iron oxide nanoparticles. *Magnetic Resonance Imaging* 25: 1437-1441 (2007)
191. Aurich K, Nagel S, Glockl G, Weitschies W: Determination of the Magneto-Optical Relaxation of Magnetic Nanoparticles as a Homogeneous Immunoassay. *Analytical Chemistry* 79: 580-586 (2006)
192. Hülser T: Strukturelle und magnetische Eigenschaften von Eisenkarbid- und Eisenoxid-Nanopartikeln. *Fakultät für Naturwissenschaften der Universität Duisburg-Essen*, Duisburg (2003)
193. Soffel HC: *Paläomagnetismus und Archäomagnetismus*. Springer-Verlag, Heidelberg (1991)
194. Josephson L, Bigler J, White D: The magnetic properties of some materials affecting MR images. *Magnetic Resonance in Medicine* 22: 204-208 (1991)
195. Rohrer M, Bauer H, Mintorovitch J, Requardt M, Weinmann HJ: Comparison of magnetic properties of MRI contrast media solutions at different magnetic field strengths. *Invest Radiol* 40: 715-24 (2005)
196. Roch A, Gossuin Y, Muller RN, Gillis P: Superparamagnetic colloid suspensions: Water magnetic relaxation and clustering. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 293: 532-539 (2005)

197. Pouliquen D, Perroud H, Calza F, Jallet P, Jeune JLL: Investigation of the magnetic properties of iron oxide nanoparticles used as contrast agent for MRI. *Magnetic Resonance in Medicine* 24: 75-84 (1992)
198. Hsiao J-K, Chu H-H, Wang Y-H, et al.: Macrophage physiological function after superparamagnetic iron oxide labeling. *NMR in Biomedicine* 21: 820-829 (2008)
199. Metz S, Bonaterra G, Rudelius M, et al.: Capacity of human monocytes to phagocytose approved iron oxide MR contrast agents in vitro. *European Radiology* 14: 1851-1858 (2004)
200. Bremer C, Allkemper T, Baermig J, Reimer P: RES-specific imaging of the liver and spleen with iron oxide particles designed for blood pool MR-angiography. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 10: 461-467 (1999)
201. Daldrup-Link HE, Rudelius M, Oostendorp RA, et al.: Targeting of hematopoietic progenitor cells with MR contrast agents. *Radiology* 228: 760-7 (2003)
202. Peldschus K, Kaul M, Lange C, et al.: Magnetic Resonance Imaging of Single SPIO Labeled Mesenchymal Stem Cells at 3 Tesla. *Fortschr Röntgenstr* 179: 473-479 (2007)
203. Clement O, Siauve N, Cuenod CA, Frija G: Liver imaging with ferumoxides (Feridex): fundamentals, controversies, and practical aspects. *Top Magn Reson Imaging* 9: 167-82 (1998)
204. McLachlan SJ, Morris MR, Lucas MA, et al.: Phase I clinical evaluation of a new iron oxide MR contrast agent. *J Magn Reson Imaging* 4: 301-7 (1994)
205. Reimer P, Marx C, Rummeny EJ, et al.: SPIO-enhanced 2D-TOF MR angiography of the portal venous system: results of an intraindividual comparison. *J Magn Reson Imaging* 7: 945-9 (1997)
206. Thorek DL, Chen AK, Czupryna J, Tsourkas A: Superparamagnetic iron oxide nanoparticle probes for molecular imaging. *Ann Biomed Eng* 34: 23-38 (2006)
207. Leimgruber A, Berger C, Cortez-Retamozo V, et al.: Behavior of Endogenous Tumor-Associated Macrophages Assessed In Vivo Using a Functionalized Nanoparticle. *Neoplasia* 11 (2009)
208. Ayant Y, Belorizky E, Aluzon J, Gallice J: Calcul des densités spectrales résultant d'un mouvement aléatoire de translation en relaxation par interaction dipolaire magnétique dans les liquides. *Journal de Physique* 36: 991-1004 (1975)
209. Freed JH: Dynamic effects of pair correlation functions on spin relaxation by translational diffusion in liquids. II. Finite jumps and independent  $T_1$  processes. *The Journal of Chemical Physics* 68: 4034-4037 (1978)
210. Schilling K: Einführung in die Analytische Ultrazentrifugation, [http://www.nanolytics.de/pdf/de/auz\\_einf.pdf](http://www.nanolytics.de/pdf/de/auz_einf.pdf)
211. Lange A: Instabilitäten magnetischer Flüssigkeiten in statischen Magnetfeldern. *Fakultät für Naturwissenschaften der Otto-von-Guericke-Universität, Magdeburg* (2003)



## Publikationen

### Posterpräsentationen:

J. Lohrke, J. Hütter, K. Mäder, Characterization of novel Superparamagnetic Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging, *CRS Local Chapter Annual Meeting 2009*, Halle (Saale), Deutschland

J. Lohrke, A. Briel, K. Mäder, Synthesis and Characterization of Novel Magnetic Nanoparticles for MRI, *BSP-Young Scientific Poster Session 2008*, Berlin, Deutschland

A. Briel, G. Schütz, E. Blazek, D. Franke, N. Gehrke, V. Sudmann, J. Lohrke, D. Schrader, J. Hütter, Molecular Imaging of Cancer and Inflammation, *Global Drug Discovery Meeting 2007*, Berlin, Deutschland

### Wissenschaftliche Artikel:

J. Lohrke, A. Briel, K. Mäder, Characterization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles by asymmetrical flow-field-flow-fractionation, *Nanomedicine* 3: 437-452(2008)

## Danksagung

### Ich danke...

...Herrn Prof. Dr. Karsten Mäder für die Vergabe des Themas, für die herzliche Aufnahme in den Arbeitskreis der pharmazeutischen Technologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, für die jederzeit gewährte Unterstützung, für sein Interesse am Fortgang der Arbeit, für seine wertvollen Ratschläge bei der Erstellung der Arbeit und für die vielen begeisternden Diskussionen und Gespräche.

...Herrn Dr. Hanns-Joachim Weinmann und Herrn Dr. Andreas Briel für die Möglichkeit diese Arbeit in der diagnostischen Bildgebung der Bayer Schering Pharma AG durchführen zu können. Herrn Dr. Andreas Briel danke ich besonders für die Betreuung meiner Arbeit, für den hilfreichen Austausch zu inhaltlichen Fragen und für die mir gegebene Freiheit bei der Gestaltung der Arbeit.

...Herrn Dr. Joachim Hütter (Bayer Schering Pharma AG) besonders für die von Anfang an gewährte Unterstützung, die Übernahme der Betreuung, sein Interesse an der Arbeit und die vielen interessanten, wissenschaftlichen Diskussionen.

...der Firma Bayer Schering Pharma AG für die Überlassung des Arbeitsplatzes und die großzügige finanzielle und materielle Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

...Herrn Dr. habil. Andreas F. Thünemann und Herrn Dr. Ralf Bienert von der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM) für die Möglichkeit superparamagnetische Eisenoxidpartikel mittels Kleinwinkel-Röntgenstreuung untersuchen zu können.

...Herrn Prof. Dr. Pablo Esquinazi und Frau Dipl.-Krist. Anette Setzer vom Institut für Experimentelle Physik an der Universität Leipzig für die Durchführung der SQUID-Messungen.

...Herrn Dr. Hendrik Metz von der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für die vielen fruchtbaren, fachlichen Diskussionen und für die durchgeführten  $T_1$ - und  $T_2$ -Zeit-Messungen.

...Herrn Matthias Rothe (Bayer Schering Pharma AG) für seine Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei der Durchführung der magnetischen Separation.

...Dr. Gunnar Schütz für seine Unterstützung bei der Durchführung der Tierversuche und für die wertvollen Diskussionen und Gespräche.

...Herrn Dr. Hans Bauer (Bayer Schering Pharma AG) und Herrn Dr. Frank-Detlef Scholle für die jederzeit gewährte Unterstützung bei physikalischen und mathematischen Problemen und die vielen wertvollen und spannenden Diskussionen.

...Herrn Dr. Kristian Schilling von der Firma Nanolytics für die Durchführung der Versuche mit der analytischen Ultrazentrifugation.

...Herrn Arne Wolfart für das rasche Gegenlesen dieser Arbeit und die erfrischenden, wertvollen Diskussionen und Gespräche.

...Frau Elsa Maria Richter für die schnelle Rechtschreibkorrektur dieser Arbeit.

**Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bedanken bei...**

...Anne-Katrin Kirchherr die immer an mich geglaubt hat, mich stets motiviert und unterstützt hat und die in dieser Zeit zu einer guten Freundin geworden ist.

...meinen BSP Kolleginnen Violetta Sudmann, Danielle Franke und Nicole Gehrke für die tolle Arbeitsatmosphäre, die Unterstützung während dieser Zeit, die vielen hilfreichen, fachlichen Diskussionen und für das schöne gemeinsame Wellness-Wochenende an der Ostsee.

...Bernhard Vos und Matthias Urich für Ihre Hilfe, die moralische Unterstützung, Ihren Humor, die gemeinsamen schönen Abende und die spannende Fußball-WM auf der Fanmeile.

...allen namentlich nicht genannten Kollegen und Kolleginnen der Bayer Schering Pharma AG, die auf vielfältige Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, für die konstruktive Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

...meinen Freunden für Ihre Geduld und Treue, auch wenn ich häufig wenig Zeit für Sie hatte.

...meinen Eltern für den Zuspruch und die Unterstützung während des Studiums und der Promotion und meinem Freund Jens, der mir die ganze Zeit den Rücken frei gehalten hat und mich stets bestärkt hat, wenn ich an mir gezweifelt habe.

## Curriculum vitae

### Persönliche Daten

Name: Jessica Lohrke  
Geburtstag: 06.11.1977  
Geburtsort: Berlin  
Nationalität: deutsch

### Berufliche Erfahrung

seit 04/2009           Wissenschaftliche Mitarbeiterin bei der Bayer Schering Pharma AG  
Abteilung: „Cardiovascular Imaging & Contrast Media Research“

Werkstudentin bei der Bayer Schering Pharma AG, in den Abteilungen:

10/2004 – 04/2005   „Magnetic Resonance Imaging & X-Ray“ in der Forschung  
02/2002 – 09/2004   „Drug Delivery Systems“ in der Pharmazeutischen Entwicklung  
07/2000 – 01/2002   Zentrale Aus- und Weiterbildung

### Ausbildung

05/2006 – 03/2009   Promotion bei der Bayer Schering Pharma AG  
Abteilung: „Cardiovascular Imaging & Contrast Media Research“  
09/2006                Approbation als Apothekerin  
11/2005 – 04/2006   Pharmaziepraktikum bei der Bayer Schering Pharma AG  
Abteilung: „Magnetic Resonance Imaging & X-Ray“  
05/2005 – 10/2005   Pharmaziepraktikum in der Apotheke am Strausberger Platz in Berlin  
10/2000 – 03/2005   Pharmaziestudium an der Freien Universität Berlin, Deutschland  
07/2000                Abschluss Ausbildungsberuf: Chemielaborantin – Chemie (IHK)  
09/1997 – 07/2000   Ausbildung zur Chemielaborantin bei der Bayer Schering Pharma AG  
09/1991 – 06/1997   Gymnasium an der Weide, Berlin (Abitur)

Berlin, den 17. August 2009

Jessica Lohrke

## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich gemäß § 5 (2) der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, dass ich die Ergebnisse der vorliegenden Dissertationsarbeit:

**„Herstellung und Charakterisierung neuer nanopartikulärer  
SPIO-Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie“**

selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst und nur die in der Arbeit angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die aus anderen Werken wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Weiterhin habe ich diese Arbeit bisher an keiner in- oder ausländischen Fakultät als Dissertationsschrift vorgelegt.

Berlin, den 17. August 2009

Jessica Lohrke