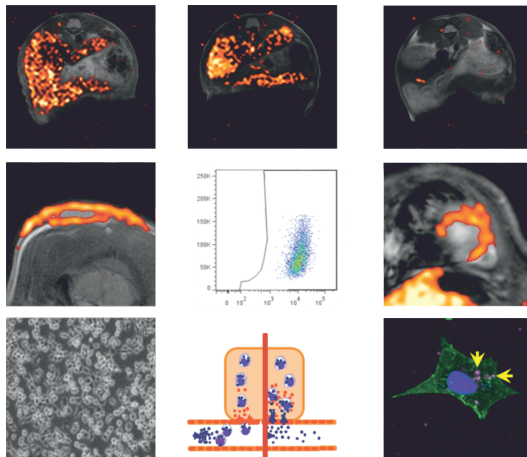


**KATRIN BECKER**

Untersuchung der Gewebeverteilung und -halbwertszeit  
sowie der zellulären Aufnahme von  $^{19}\text{F}$ -Tracern unter  
entzündlichen und nicht-entzündlichen Bedingungen



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines

**Dr. med. vet.**

beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autoren dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2020

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1<sup>st</sup> Edition 2020

© 2020 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Ch. D. Rummel

**und dem**

Institut für Molekulare Kardiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Betreuer: Prof. Dr. U. Flögel

**Untersuchung der Gewebeverteilung und -halbwertszeit sowie  
der zellulären Aufnahme von <sup>19</sup>F-Tracern unter entzündlichen  
und nicht-entzündlichen Bedingungen**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Katrin Becker**

Tierärztin aus Troisdorf

Gießen 2020

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter:

apl. Prof. Dr. Ch. D. Rummel

Univ.-Prof. Dr. U. Flögel

Prüferin:

Univ.-Prof. Dr. habil. Ch. Herden

Tag der Disputation: 07.09.2020

**Gewidmet meiner Familie**

Die Natur versteht gar keinen Spaß, sie ist immer wahr, immer ernst, immer streng, sie hat immer Recht, und die Fehler und Irrtümer sind immer des Menschen.

Johann Wolfgang von Goethe

## Inhaltsverzeichnis

1.1.	Einleitung.....	8
1.1	Grundlagen der Magnetresonanztomografie (MRT).....	8
1.1.1	Physikalische Grundlagen.....	8
1.1.2	Erzeugung von Bildern mittels MRT.....	9
1.2	Entzündungsprozesse.....	10
1.2.1	Entstehung und Verlauf einer akuten Entzündung.....	10
1.2.2	Die Rolle von Immunzellsubpopulationen bei Entzündung.....	11
1.2.3	Entzündungsprozesse in der Human- und Veterinärmedizin.....	13
1.3	Bildgebung von Entzündungsprozessen.....	15
1.3.1	Entzündungsbildgebung mittels <sup>1</sup> H-basierter Magnetresonanztomografie.....	15
1.3.2	Grundlagen der <sup>19</sup> F-MRT.....	16
1.3.3	Perfluorkarbonate, PFCs und PLGA-Nanopartikel.....	17
1.3.4	Darstellung von Entzündungsprozessen mittels <sup>19</sup> F-MRT.....	20
1.4	Zielsetzung der Arbeit.....	23
2	Material und Methoden.....	25
2.1	Materialien.....	25
2.1.1	Technische Geräte.....	25
2.1.2	Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien.....	27
2.1.3	Substanzen und Chemikalien.....	29
2.1.4	Puffer.....	31
2.1.5	Antikörper.....	32
2.1.6	Zelllinien.....	32
2.1.7	Tiere.....	32
2.1.8	Software.....	32
2.2	Methoden.....	33
2.2.1	Herstellung und Charakterisierung von PFCs.....	33
2.2.2	Arbeiten mit Zellen.....	34
2.2.3	Tierexperimentelle Arbeiten.....	44
2.2.4	Durchflusszytometrie.....	50
2.2.5	Mikroskopische Techniken.....	53
2.2.6	Kombinierte <sup>1</sup> H/ <sup>19</sup> F Magnetresonanztomografie (MRT).....	54
3	Ergebnisse.....	65
3.1	Zelluläre Aufnahme, Gewebeverteilung und Bioeliminierung von PFCs und PLGA-Nanopartikeln.....	65
3.1.1	Charakterisierung von PFCs und PLGA-Nanopartikeln.....	65
3.1.2	Gewebeverteilung und Gewebehalbwertszeit von PFCs und PLGA-Nanopartikeln.....	67

## Inhaltsverzeichnis

3.1.3	Zelluläre Aufnahme von PFCs und PLGA-Nanopartikeln .....	72
3.1.4	Mechanismen der Aufnahme von PFCs und PLGA-Nanopartikeln.....	78
3.1.5	PFCs und PLGA-Nanopartikel besitzen keine zytotoxischen Eigenschaften.....	86
3.2	Einfluss von sterilen und nicht-sterilen Entzündungsprozessen auf die zelluläre Aufnahme und Gewebeverteilung von PFCs .....	89
3.2.1	$^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT von Entzündungsherd, Blut und peripheren Organen .....	89
3.2.2	Zusammensetzung der aus dem Entzündungsherd isolierten Immunzellpopulation...	96
3.2.3	Zelluläre Partikelaufnahme unter entzündlichen Bedingungen .....	98
4	Diskussion.....	109
4.1	Zelluläre Aufnahme, Gewebeverteilung und Bioeliminierung von PFCE-haltigen Nanopartikeln .....	109
4.1.1	Die Ultrastruktur der Nanopartikel beeinflusst die Gewebehalbwertszeit.....	110
4.1.1	Größe und Oberflächeneigenschaften beeinflussen die zelluläre Aufnahme von Nanopartikeln.....	112
4.1.2	Die Größe der Nanopartikel beeinflusst die Bluthalbwertszeit .....	114
4.1.3	Die Größe der Nanopartikel beeinflusst die Gewebeverteilung .....	116
4.1.4	Nanopartikelkonzentration, Phagozytose und Opsonierung beeinflussen die zelluläre Aufnahme von Nanopartikeln .....	118
4.1.5	PFCs und PLGA-Nanopartikel zeigen keine zytotoxischen Effekte .....	119
4.2	Einfluss von sterilen und nicht-sterilen Entzündungsprozessen auf die zelluläre Aufnahme und Gewebeverteilung von PFCs .....	121
4.2.1	Die zelluläre Partikelaufnahme ist unter entzündlichen Bedingungen gesteigert.....	121
4.2.2	Lokale Entzündungsreaktionen bewirken nur geringe Veränderungen des $^{19}\text{F}$ -Signals in peripheren Organen .....	125
5	Zusammenfassung und Ausblick .....	128
6	Summary and outlook .....	131
7	Literaturverzeichnis.....	134
8	Abbildungsverzeichnis.....	149
9	Tabellenverzeichnis .....	151
10	Abkürzungsverzeichnis .....	152
11	Anhang.....	157
11.1	Eigene Publikationen .....	157
11.2	Danksagung .....	159
11.3	Eidesstattliche Erklärung .....	160



## 1.1. Einleitung

### 1.1 Grundlagen der Magnetresonanztomografie (MRT)

Mit der Entdeckung der Kernspinresonanz legten Isidor Rabi (1938)<sup>1</sup> sowie Felix Bloch<sup>2</sup> und Edward Purcell<sup>3</sup> (1946) die Basis für alle Anwendungen der Magnetresonanztomografie (MRT). In den 1970er Jahren wurden mit den Arbeiten von Damadian (Detektion von Tumorgewebe anhand unterschiedlicher Relaxationszeiten)<sup>4</sup> und Lauterbur (Generierung der ersten 2D und 3D MR-Bilder unter Verwendung von Gradienten)<sup>5,6</sup> die Grundlagen für die Bilderzeugung mittels MRT geschaffen<sup>7</sup>. Die in der <sup>1</sup>H MRT erzeugten Bilder geben die Dichte der Wasserstoffatome im Körper und deren Verhalten bei Anregung mit elektromagnetischer Strahlung über die Zeit wieder. Mittels MRT können auf diese Weise anatomische Schnittbilder des Körpers erzeugt werden. Anders als bei weiteren in der klinischen Routinediagnostik verwendeten Bildgebungsverfahren<sup>7,8</sup>, wie z. B. der Computertomografie (CT), SPECT („single photon emission computed tomography“) oder Positronenemissionstomographie (PET) entsteht bei der MRT weder ionisierende Strahlung noch ist der Einsatz radioaktiver Kerne erforderlich. Zudem bietet die MRT einen exzellenten Kontrast zwischen verschiedenen Geweben sowie eine hohe räumliche Auflösung<sup>9</sup>.

#### 1.1.1 Physikalische Grundlagen

NMR-sensitive Atomkerne besitzen einen Kernspin, wodurch sie zum einen einen Drehimpuls, zum anderen ein magnetisches Moment in Richtung der Kreisachse aufweisen. Das magnetische Moment des Atomkerns wird von Magnetfeldern und elektromagnetischen Wellen beeinflusst und erzeugt, wenn sich seine Lage verändert selber eine Spannung. Unter gewöhnlichen Bedingungen sind die Spins zufällig verteilt und der Mittelwert aller Kernmomente ist 0. Sind die Spins jedoch einem äußeren Magnetfeld ausgesetzt, richten sich die Achsen aller Spins parallel zur Feldlinienrichtung aus, wodurch eine Längsmagnetisierung  $M_z$  in Z-Richtung entsteht (**Abbildung 1.1, A-C**). Die Ausweichbewegungen der Spins bei Einwirken eines äußeren Magnetfeldes werden als Präzessionsbewegung bezeichnet. Die Präzessionsbewegung erfolgt mit einer für jede Kernart charakteristischen Frequenz, die als Larmorfrequenz bezeichnet wird und welche proportional zur Stärke des Magnetfeldes ist:

$$\omega_0 = \gamma_0 \cdot B_0$$

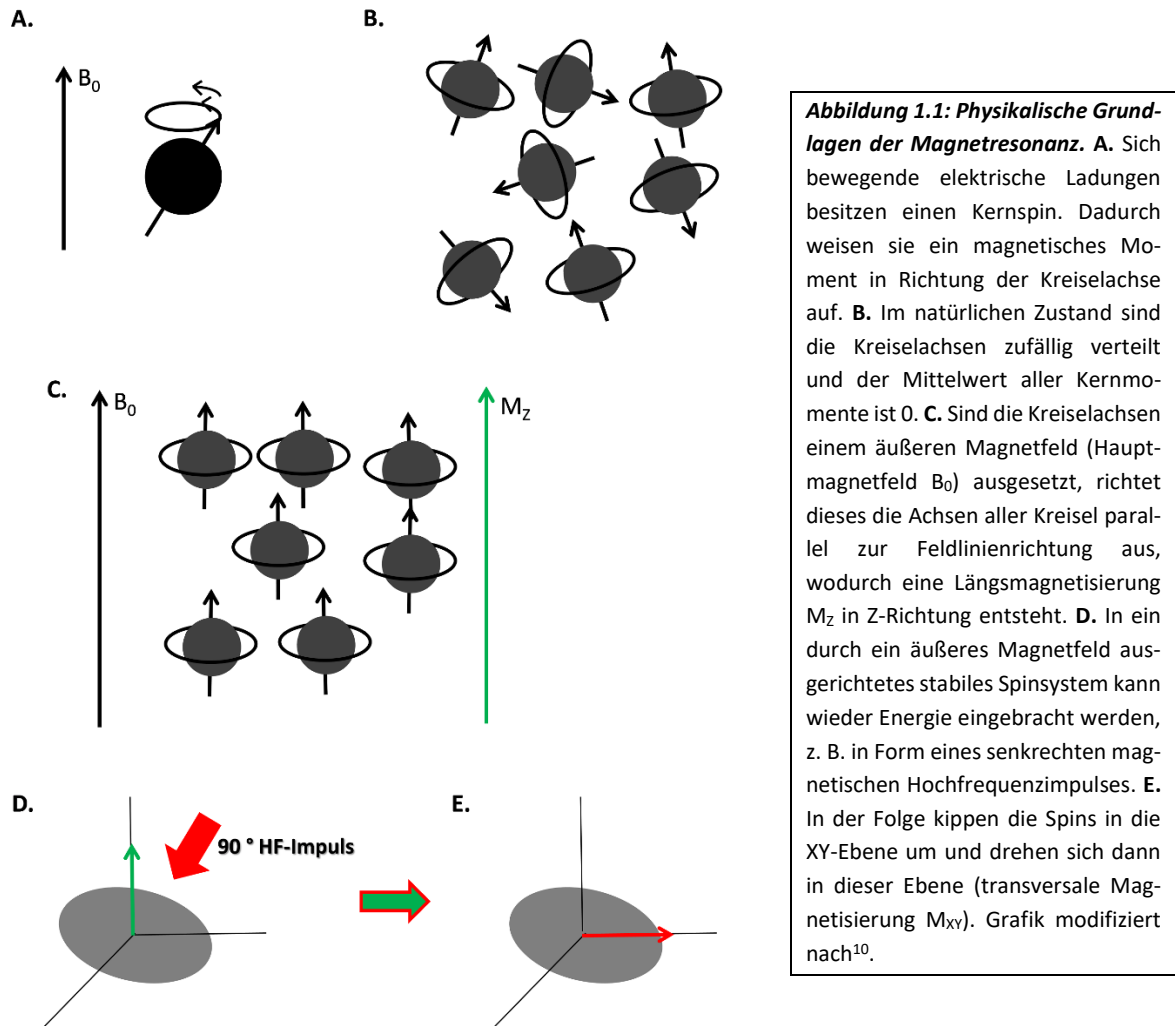
$\omega_0$  = Larmorfrequenz in Megahertz;

$\gamma_0$  = gyromagnetisches Verhältnis (Konstante, die für jedes Element einen typischen Wert besitzt);

$B_0$  = Stärke des Magnetfeldes in Tesla.

## Einleitung

Bringt man Energie in Form von elektromagnetischen Wellen in ein ausgerichtetes, stabiles Spinsystem ein, wird dieses angeregt. Voraussetzung ist, dass die Frequenz der elektromagnetischen Wellen der Larmorfrequenz entspricht. Wirkt diese Energie z. B. in Form eines senkrechten Hochfrequenzfeldes ein, „kippen“ die Spins in die XY-Ebene um und rotieren in der Z-Achse (transversale oder Längsmagnetisierung  $M_{xy}$ ) (**Abbildung 1.1, D-E**). Hierdurch wird das NMR-Signal erzeugt, welches in der Empfangsspule eine detektierbare Wechselspannung generiert<sup>8,10,11</sup>.



### 1.1.2 Erzeugung von Bildern mittels MRT

Die Erzeugung von NMR-Signalen liefert jedoch noch keine räumlichen Informationen. Um eine Ortskodierung zu erhalten, ist der Einsatz von Gradientenspulen erforderlich. Diese Technik nutzt die Tatsache, dass die Larmorfrequenz proportional zur Magnetfeldstärke ist: Von den Gradientenspulen werden eigene Magnetfelder erzeugt, die das Hauptmagnetfeld überlagern. Diese Zusatzmagnetfelder weisen einen Gradienten in X-, Y- bzw. Z-Richtung auf<sup>10</sup>.

Wie oben beschrieben, erfolgt eine Anregung des stabilen Spinsystems nur, wenn die Anregungsfrequenz der Larmorfrequenz entspricht (Resonanz). Werden Gradientenspulen eingesetzt, die in Z-Richtung einen Magnetfeldgradienten erzeugen, hat dies zur Folge, dass die Spins entlang des Gradienten unterschiedliche Resonanzfrequenzen besitzen. Wird nun mit einer bestimmten Frequenz angeregt, reagieren nur die Spins in der Schicht, in der die Larmorfrequenz genau der anregenden Frequenz entspricht<sup>10</sup>. Um innerhalb einer Schicht eine Zahl von Spins anzuregen, die für die Generierung einer ausreichenden Menge an Bilddaten genügt, liegen in den klinischen Systemen die üblichen Schichtdicken bei 5-10 mm. In Hochfeldsystemen sind hingegen Schichtdicken von 0,5 mm und weniger möglich<sup>8</sup>. Für die Ortskodierung in Y- und X-Richtung werden eine Phasen- und eine Frequenzkodierung verwendet. Der Phasengradient bewirkt, dass die durch einen senkrechten Hochfrequenzimpuls angeregten, in der X-Ebene präzedierenden Spins entlang der Y-Richtung unterschiedlich schnell kreisen. Somit entsteht eine Phasenverschiebung der Spins innerhalb der Y-Richtung. Diese Phasenverschiebung bleibt bestehen, wenn der Gradient ausgeschaltet wird. Hierdurch kann jede Zeile innerhalb der Schicht durch ihre Phase identifiziert werden. Der Frequenzgradient erzeugt einen Gradienten in X-Richtung, so dass die Spins entlang der X-Richtung unterschiedlich schnell präzedieren. Hierdurch entsteht ein Frequenzspektrum, innerhalb dessen jede Spalte durch ihre Frequenz identifiziert werden kann. Durch Frequenz und Phase ist jedes Volumenelement (Voxel) eindeutig charakterisiert. Mittels einer Fourier-Transformation können alle in einem Signal vorkommenden Frequenzen bestimmt werden. Um die Phasenaufteilung ermitteln zu können, muss die Messung viele Male wiederholt werden, jedes Mal mit einer anderen Phasenkodierung. Aus den so erhaltenen Daten kann schließlich die Phasenaufteilung mittels einer zweiten, zweidimensionalen Fourier-Transformation entlang der Phasenrichtung berechnet werden<sup>10</sup>.

## 1.2 Entzündungsprozesse

### 1.2.1 Entstehung und Verlauf einer akuten Entzündung

Die Entzündung ist eine Reaktion des Körpers auf eine Schädigung von Zellen durch Noxen wie Trauma, Gewebnekrose, Tumorzellen oder Infektionserreger<sup>12</sup>. Diese Schädigungen führen innerhalb von Stunden zu einer Serie definierter Gewebsantworten, die unter dem Begriff „akute Entzündung“ zusammengefasst werden<sup>13</sup>. Gesteuert werden diese durch eine gut organisierte und fein regulierte Ereigniskaskade, die von zahlreichen Molekülen vermittelt wird<sup>12</sup>. Die Gewebsantworten beinhalten die Ansammlung von Flüssigkeit, Elektrolyten und Plasmaproteinen sowie von Leukozyten im extravaskulären Raum. Zudem werden Gewebsmakrophagen aktiviert. Die Stimulation von Endothelzellen führt

zu einer adhäsiven Interaktion zwischen Leukozyten und dem Gefäßendothel. Im Blutgefäßsystem treten eine Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten, Gerinnung und Fibrinolyse auf. Darüber hinaus wird das Komplementsystem aktiviert<sup>12,13</sup>. Klinisch manifestiert sich die Entzündung in Form der von Cornelius Celsus (25 v. Chr. bis 50 n. Chr.) eingeführten Kardinalsymptome der Entzündung: Rötung, Schwellung, Schmerz und Wärme, die von Rudolf Virchow Mitte des 19. Jhd. um den Funktionsverlust als fünftes Kardinalsymptom ergänzt wurden. Diese Symptome werden auch heute noch herangezogen, um das Vorhandensein einer Entzündung zu diagnostizieren<sup>12,13</sup>. Die akute Entzündung dauert wenige Stunden bis einige Tage und geht im optimalen Fall recht schnell in die Reparatur und Heilungsphase über<sup>12</sup>.

### 1.2.2 Die Rolle von Immunzellsubpopulationen bei Entzündung

Die erste und zahlenmäßig größte Gruppe von Zellen, die in den Ort des Gewebeschadens einwandern, sind neutrophile Granulozyten<sup>12-14</sup>. Etwas später als die Neutrophilen wandern Monozyten und Lymphozyten in den Entzündungsherd ein<sup>12</sup>. Die Auswanderung der Leukozyten aus dem Blut wird durch die Aktivierung von Endothelzellen durch den Gewebeschaden bedingt<sup>13</sup>. Diese führt dazu, dass die Blutimmunzellen, die sich zunächst der Gefäßwand annähern, in der Folge an dieser entlangrollen, dann fest an das Endothel adhären, um schließlich durch interzelluläre Spalten ins Gewebe zu transmigrieren. In diesem angelangt, wandern sie entlang eines chemotaktischen Gradienten zum Stimulus<sup>15,16</sup>.

#### *Neutrophile Granulozyten*

Neutrophile sind Teil der angeborenen Immunabwehr<sup>12,17</sup> und die Haupteffektoren der akuten Entzündung<sup>18,19</sup>. Inzwischen gibt es aber auch Belege dafür, dass sie ebenso an chronischen Entzündungsprozessen<sup>18</sup>, Ischämie-Reperfusionsschädigung<sup>20</sup> sowie erworbenen Immunantworten beteiligt sind<sup>18</sup>. Sie dienen der Bekämpfung eines breiten Spektrums an Bakterien, Pilzen, Protozoen, Viren sowie viral infizierter Zellen und von Tumorzellen<sup>19,20</sup>. Neutrophile werden kontinuierlich im Knochenmark gebildet ( $5 \cdot 10^{10}$ - $2 \cdot 10^{11}$  Zellen/Tag beim Menschen)<sup>18,20</sup>, wobei ihre Produktion von Granulozyten-Koloniestimulierendem Faktor (G-CSF) und Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF) kontrolliert wird<sup>18,20,21</sup>. Ihre Level im Blut können sich unter Stress und Infektion verzehnfachen, was zum einen durch beschleunigte Freisetzung und vermehrte Reifung im Knochenmark, zum anderen durch vermehrte Demargination in der Lunge oder der Milz verursacht wird<sup>22</sup>. Beim Menschen machen die Neutrophilen ca. 50-70 % der zirkulierenden Leukozyten aus (granulozytäres Blutbild), bei der Maus, die ein lymphozytäres Blutbild besitzt, nur 10-25 %<sup>18,20,23</sup>. Nach ihrer Freisetzung zirkulieren Neutrophile im Blut, jedoch ist ihre genaue Lebensspanne unbekannt. Man geht von 1,5 - 12,5 h in der Maus bis hin zu 8 h - 5,4 d beim Menschen aus. Im Gewebe wird die Überlebensdauer mit bis zu vier Tagen angegeben<sup>17,24</sup>. Möglicherweise können Neutrophile jedoch auch aus dem Gewebe wieder in

## Einleitung

das Blutgefäßsystem eintreten und sekundär z. B. in Lunge und Knochenmark einwandern<sup>18,23</sup>. Unter physiologischen Bedingungen finden sich Neutrophile außer im Knochenmark zudem in Milz, Leber und Lunge. Jedoch ist unbekannt, wie und warum sich Neutrophile in diesen Organen konzentrieren<sup>18</sup>.

Neutrophile können sowohl intra- als auch extrazelluläre Pathogene abtöten. Dies wird im ersteren Fall durch Phagozytose mit nachfolgender intrazellulärer Degradation („respiratory burst“<sup>25</sup> etc.) vermittelt; im zweiten Fall durch die Freisetzung von Granulainhalt<sup>20,26</sup>. Darüber hinaus können Neutrophile sogenannte neutrophile extrazelluläre Fallen (NETs) freisetzen, die aus Kern-DNA Elementen bestehen, an die Histone, weitere Proteine (z. B. Lactoferrin, Cathepsine) und Enzyme (z. B. Myeloperoxidase, Elastase) gebunden sind. NETs immobilisieren Pathogene und erleichtern deren Phagozytose, können aber möglicherweise auch direkt Pathogene abtöten<sup>18,24,27</sup>. Weitere Funktionen der Neutrophilen bestehen in der Rekrutierung von Monozyten, der Sekretion von Zytokinen, Chemokinen, Leukotrienen und Prostaglandinen, ebenso wie in der Regulation der erworbenen Immunantwort. Neben ihrer pro-inflammatorischen Wirkung können Neutrophile auch anti-inflammatorisch wirken, da sie Wunddebridement durchführen, zur Revaskularisierung beitragen und darüber hinaus an der Gewebereparatur beteiligte Proteasen produzieren<sup>18,27</sup>. Mögliche Schädigungen für Gewebe entstehen durch die Freisetzung von Oxidanzien, Proteasen und antimikrobiellen Proteinen<sup>28,29</sup>.

### *Monozyten und Makrophagen*

Monozyten und Makrophagen gehören zum mononukleären Phagozytensystem<sup>30</sup> und sind Teil des angeborenen Immunsystems, spielen jedoch auch eine Rolle in der erworbenen Immunantwort<sup>12,31</sup>. Nach ihrer Bildung im Knochenmark werden Monozyten in noch unvollständig differenziertem Zustand ins Blut entlassen<sup>12,31</sup>. Blutmonozyten können in nahezu alle Gewebe des Körpers einwandern, wo sie lokal in spezielle Gewebemakrophagen differenzieren. Ob diese Einwanderung jedoch nur unter entzündlichen Bedingungen geschieht<sup>12,31</sup> und sich die Gewebemakrophagen im Zustand der Homöostase vorrangig durch lokale Proliferation erneuern<sup>32-36</sup>, oder ob auch physiologischerweise ein Ersatz der lokalen Makrophagen durch zirkulierende Monozyten erfolgt<sup>37</sup> ist noch unklar. Ein interessanter Aspekt ist, dass sich Monozyten zudem in der Milz anreichern können, wo sie einen sekundären Speicherpool bilden, aus dem sie bei erhöhtem Bedarf rasch freigesetzt werden können<sup>38,39</sup>. Gewebemakrophagen werden in allen Organen und im Bindegewebe gefunden und nach ihrer Lokalisation benannt, wie Mikroglia im zentralen Nervensystem (ZNS), Kupfferzellen in der Leber, Alveolarmakrophagen in der Lunge und Osteoklasten im Knochen<sup>30,40,41</sup>.

Im Falle eines entzündlichen Geschehens treten Monozyten vermehrt in das geschädigte Gewebe über<sup>12,31</sup> und differenzieren dort in Makrophagen oder dendritische Zellen (DCs)<sup>40,42,43</sup>. Bereits 24-48 h nach Beginn einer akuten Entzündung können Monozyten im Entzündungsherd nachgewiesen werden<sup>31,40,41</sup>, ihre Einwanderung kann für mehrere Tage andauern<sup>43</sup>. Die Rekrutierung von Monozyten ist

für eine effektive Kontrolle und Beseitigung von viralen, bakteriellen, Pilz- und Protozoeninfektionen essentiell. Sie spielen zudem eine Rolle in der Tumorbekämpfung. Jedoch tragen sie auch zur Pathogenese von entzündlichen und degenerativen Erkrankungen bei (z. B. Atherosklerose)<sup>42,44</sup>.

Klassische M1 polarisierte Makrophagen besitzen bei Entzündung drei Hauptfunktionen: Antigenpräsentation, Phagozytose (Beseitigung von Zelltrümmern und Pathogenen) und Immunomodulation durch die Produktion verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren, von Chemokinen, reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Stickstoffmonoxid (NO). Als Hauptproduzenten entzündlicher Zytokine spielen sie eine Schlüsselrolle in der Initiation der Entzündung<sup>31,40,41</sup>. Jedoch können Makrophagen auch alternativ aktiviert werden (M2) und dann zur Gewebereparatur und Vaskularisierung beitragen<sup>30,41,45</sup>. Bei unkontrollierter Freisetzung ihrer Produkte können Makrophagen hingegen einen erheblichen Gewebeschaden bzw. Fibrose auslösen<sup>40,44</sup>.

### *Lymphozyten*

Lymphozyten spielen bei den meisten chronischen Entzündungen, vor allem bei Autoimmunerkrankungen und Krankheiten mit Antigenpersistenz eine Schlüsselrolle<sup>31,46</sup>. Lymphozyten werden anhand ihrer Größe und Granularität in natürliche Killerzellen (NKs) sowie kleine Lymphozyten (B-Zellen und T-Zellen) unterteilt. NKs sind größer als die T- und B-Zellen und granulär. Sie erkennen entartete Zellen, wie mikrobiell infizierte und Tumorzellen und töten diese ab, ohne jedoch einen Antigenerkennungszereptor zu besitzen – entsprechend werden sie dem angeborenen Immunsystem zugerechnet<sup>47,48</sup>. B-Zellen differenzieren sich, wenn sie durch Antigene, T-Helferzellen, Zytokine und Toll-like Rezeptor Signale<sup>49</sup> aktiviert wurden in immunglobulinbildende Zellen (Plasmazellen)<sup>50</sup> oder in Gedächtniszellen<sup>51,52</sup>. T-Zellen unterstützen andere Immunzellen (T-Helferzellen) oder attackieren Körperzellen, wenn diese z. B. viral infiziert oder tumorös entartet sind (zytotoxische T-Zellen/T-Suppressorzellen)<sup>53,54</sup>.

### 1.2.3 Entzündungsprozesse in der Human- und Veterinärmedizin

Entzündungen, insbesondere chronische Entzündungen stellen laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) aktuell die größte Bedrohung für die menschliche Gesundheit dar<sup>55</sup>. Entzündliche Erkrankungen und assoziierte Syndrome nehmen dabei in ihrer Prävalenz in den westlichen Gesellschaften zu und betreffen z. B. aktuell in den USA eine Population von 60 Mio. Menschen<sup>56</sup>. Verschiedene Erkrankungen sind mit chronischer Entzündung assoziiert, d. h. sie treten parallel mit dieser auf oder werden durch sie ausgelöst. Hierzu gehören kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes, Krebs, Autoimmunerkrankungen (rheumatische *Arthritis*, chronisch entzündliche Darmerkrankung/IBD), Allergisches Asthma, chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD), chronische Leber-, Milz- und Nierenerkrankungen, Alzheimer etc.<sup>55</sup>. Risikofaktoren für chronische Entzündung sind Alter, Fettleibigkeit, Ernäh-

rung, Rauchen, geringe Level von Geschlechtshormonen, Stress und Schlafstörungen<sup>57-60</sup>. Entzündungen sind häufig durch eine relativ langsame Entwicklung charakterisiert sowie durch scheinbar generalisierte, unspezifische Symptome, wodurch sie schwierig zu diagnostizieren sind; ihre Folgen können jedoch schwerwiegend sein<sup>56</sup>.

Beispielhaft führt zum einen ein vermehrtes Auftreten von Gehirnentzündungen bei älteren Menschen verstärkt z. B. zu kognitiven Defiziten. Des Weiteren wurden entzündliche Prozesse mit dem Auftreten von Demenz und neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht<sup>61</sup>, oder entzündliche Prozesse sind an der Pathogenese von affektiven Verhaltensabnormalitäten beteiligt, wie Depressionen und Angststörungen. Umgekehrt werden bei psychischer Belastung wie Stress vermehrt Zytokine produziert<sup>62,63</sup>. Erhöhte Konzentrationen von Zytokinen im maternalen Serum *in utero* sowie in der frühen Kindheit sind mit einer schlechteren neuronalen Entwicklung assoziiert<sup>64</sup>. Zudem führt chronische Entzündung möglicherweise zu einer Erschöpfung von Stammzellen, mit im Folgenden schwerwiegend beeinträchtigter *Hämatopoese*<sup>65</sup>. Entzündungen haben darüber hinaus einen wesentlichen Einfluss auf das Wohlbefinden von Patienten. So leiden Patienten mit rheumatischer *Arthritis*<sup>66-69</sup>, IBD<sup>70-72</sup> und Pankreatitis<sup>73</sup> unter Schmerzen und ihre Lebensqualität ist reduziert. Zudem sind die Patienten häufig pflegebedürftig<sup>56</sup>. Insbesondere chronisch-entzündliche Erkrankungen stellen zudem eine schwere gesellschaftliche und ökonomische Bürde dar<sup>56,74</sup>. So führen z. B. *Arthritis*<sup>75-77</sup>, IBD<sup>70,72,78</sup> und COPD<sup>79-81</sup> zu Behinderung, niedrigerem Bildungsstand, Arbeitskraftverlust, verminderter Aktivität, Therapiekosten und vorzeitigem Versterben.

Auch in der Tiermedizin spielen entzündliche Prozesse eine wichtige Rolle. Die größte Bedeutung besitzen aufgrund ihrer großen ökonomischen Bedeutung verschiedene Formen von Entzündungen, die bei Nutztieren auftreten. Diese ziehen hohe Kosten nach sich, da sie die Produktivität mindern, krankheitsbedingte Tierverluste verursachen und zudem zu direkt durch die Erkrankungen bedingten Ausgaben führen. Aufgrund der großen Vielfalt an entzündlichen Erkrankungen wird hier nur kurz auf zwei besonders bedeutsame Beispiele eingegangen: Die Mastitis und bovine respiratorische Erkrankungen (BRD).

Die Mastitis wird durch die Ansiedlung verschiedener Bakterien im Euter ausgelöst. Sie ist eine der häufigsten Produktionserkrankungen in Milchkuhherden und für gravierende Produktionseinbußen verantwortlich. Der Milchertrag kann durch eine mehr oder weniger schwere Kurzzeitdepression der Milchleistung reduziert werden. Diese Leistungsdepression geht, wenn keine Heilung erfolgt, in langdauernde Effekte über, die möglicherweise bis in folgende Laktationen reichen. Zu den Folgen zählen Produktionsverluste sowie Merzung von betroffenen Tieren. Der Prozentsatz der Merzungen liegt in der Summe bei 38 %, bzw. 25 % für die erste und 46 % für weitere Laktationen<sup>82</sup>. Die höchsten Verluste entstehen durch indirekte Kosten, wie vorzeitige Abgänge (was den größten Kostenfaktor ausmacht)

und Remontierung. Des Weiteren fallen Ausgaben für Tierarztleistungen, Therapie und zeitaufwändige Mastitiskontrollprogramme an<sup>83–86</sup>.

Bovine respiratorische Erkrankungen werden durch verschiedene virale und bakterielle Erreger ausgelöst, wenn die Tiere durch ungünstige Umwelt- und Haltungsbedingungen besonders empfänglich sind. Bovine respiratorische Erkrankungen stellen ein großes Problem für die Viehwirtschaft im Bereich der Fleischrindproduktion dar. Sie reduzieren die Trockenmasseaufnahme, die durchschnittlichen Tageszunahmen und die Fütterungseffizienz, vermindern die Wachstumsrate und steigern die Futtertage bei Kälbern. Des Weiteren entstehen Kosten für die medizinische Versorgung, das Schlachtgewicht und die Schlachtkörperqualität sind vermindert und es kommt vermehrt zu Todesfällen<sup>87</sup>.

### 1.3 Bildgebung von Entzündungsprozessen

Für die Darstellung von Entzündungsprozessen im Gewebe sind Methoden notwendig, die eine frühzeitige Detektion und Beurteilung der lokalen Entzündungsreaktion ermöglichen. Dies ist erforderlich, um eine adäquate Therapie einleiten und verlässliche Aussagen über die Prognose treffen zu können, ohne Biopsien zu entnehmen<sup>88</sup> oder ohne in der präklinischen Forschung die postmortale Gewebeanalyse mittels Histologie abwarten zu müssen<sup>89</sup>. Zu den nicht-invasiven Bildgebungstechniken, die sich zur Darstellung von Entzündungsprozessen eignen, gehören z. B. PET, CT, SPECT, MRT, Ultraschall, Röntgen und optische Methoden<sup>90</sup>. Im Folgenden wird näher auf die MRT eingegangen, da dies die Bildgebungstechnik ist, mit der in der vorliegenden Studie gearbeitet wurde.

#### 1.3.1 Entzündungsbildgebung mittels <sup>1</sup>H-basierter Magnetresonanztomografie

Bereits anhand einfacher anatomischer <sup>1</sup>H-Bilder ist es möglich, Hinweise auf Entzündungsprozesse zu erhalten<sup>91–94</sup>. Jedoch ist hier eine genaue Diagnose des Entzündungsprozesses schwierig, da die <sup>1</sup>H-MRT Bilder nur die mit der Entzündung einhergehenden Gewebeveränderungen wiedergeben, jedoch keine Veränderungen auf zellulärer Ebene dargestellt werden können. Um Entzündungsprozesse dennoch zuverlässig und frühzeitig detektieren zu können, wurden verschiedene MRT-Kontrastmittel entwickelt.

Ein klassisches in der MRT eingesetztes Kontrastmittel für die Entzündungsbildgebung basiert auf dem paramagnetischen Element Gadolinium<sup>95</sup>. Dieses wird in Form von niedermolekularen Chelaten als gadoliniumhaltiges Kontrastmittel (GHK) eingesetzt<sup>96</sup>. GHKs werden zu den positiven Kontrastmitteln gezählt, da sie zu einer lokalen Steigerung der Signalintensität führen<sup>96</sup>. Sie verlassen an Stellen mit erhöhter Gefäßpermeabilität, wie sie in Entzündungsherden vorliegt, das Blutgefäßsystem und machen



das entzündliche Areal in der Folge über eine Reduktion der T1- und T2-Relaxationszeiten sichtbar<sup>95,97,98</sup>. Nachdem gadoliniumbasierte Kontrastmittel zunächst als sicher betrachtet wurden, zeigte sich inzwischen ein Zusammenhang mit dem Auftreten systemischer nephrogener Fibrose<sup>99,100</sup>. Diese tritt jedoch nur bei der Verwendung der weniger stabilen linearen Komplexbildner sowie bei Patienten mit bereits fortgeschrittener Nierenerkrankung auf<sup>101</sup>. Zudem fand sich in den letzten Jahren bei wiederholtem Einsatz von GHKs eine vermehrte, dosisabhängige Ablagerung von Gadolinium in tiefen Hirnstrukturen auch von nierengesunden Patienten. Diese kann jedoch aktuell in keinen Zusammenhang zu adversen Effekten gebracht werden<sup>102–104</sup>.

Eine weitere Art von MRT-Kontrastmitteln, die der indirekten Darstellung von Entzündungsprozessen dienen stellen metallbasierter Kontrastmittel dar, wie z. B. superparamagnetische Eisenoxidpartikel (SPIOs)<sup>105</sup>. Nach ihrer i. v. Verabreichung werden SPIOs von Monozyten / Makrophagen phagozytiert und können in der Folge an den Orten mit Makrophagenakkumulation nachgewiesen werden. Eisenoxidkristalle besitzen starke magnetische Momente, die zu einer lokalen Inhomogenität des Magnetfeldes an Orten mit Makrophagenakkumulation führen, wodurch es zu einer Reduktion des Signals in T2-gewichteten <sup>1</sup>H-Bildern kommt (negatives Kontrastmittel)<sup>106–109</sup>. Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass sich Areale mit Kontrastmittelanreicherung nicht von Inhomogenitäten anderer Ursache, wie Gewebereinblutungen unterscheiden lassen, wodurch es zu Fehlinterpretationen bei Beurteilung der Bilder kommen kann. Um Fehlinterpretationen zu vermeiden, sind zeitaufwändige vorher-nachher Aufnahmen erforderlich. Ein weiterer Nachteil dieser Art von Kontrastmitteln ist die fehlende Quantifizierbarkeit des erzeugten Signals<sup>97,110,111</sup>.

### 1.3.2 Grundlagen der <sup>19</sup>F-MRT

Neben <sup>1</sup>H lässt sich jedoch eine Reihe weiterer Kerne mittels MRT detektieren (**Tabelle 1.1**). Einer dieser Kerne ist <sup>19</sup>F<sup>112 113</sup>, welches als einziges stabiles Isotop des Fluors eine natürliche Häufigkeit von 100 % besitzt. Im Körper ist es jedoch nur in sehr geringer Menge vorhanden (<1 nmol/g Gewebe<sup>114</sup>). Lediglich in den Knochen und Zähnen sind Spuren von <sup>19</sup>F zu finden. Da die T2-Werte von <sup>19</sup>F in diesen Geweben jedoch sehr kurz sind, erzeugt das vorhandene <sup>19</sup>F kein nennenswertes Hintergrundsignal<sup>115</sup>.

<sup>19</sup>F weist eine dem <sup>1</sup>H vergleichbare Signalintensität in der MRT auf (gyromagnetisches Verhältnis: <sup>19</sup>F: 40.08 MHz/T, <sup>1</sup>H: 42.58 MHz/T; 0,83 der Sensitivität von <sup>1</sup>H), womit es der zweitsensitivste Kern nach dem Wasserstoff ist<sup>116</sup>. Da zudem die Resonanzfrequenzen der beiden Kerne sehr ähnlich sind, ist es möglich, die gleiche Geräteausrüstung für beide Kerne zu verwenden<sup>112</sup>.

Anders als die indirekten MRT-Kontrastmittel, welche aufgrund ihres Effekts auf die umgebenden Protonen nachgewiesen werden können, werden <sup>19</sup>F-Kerne direkt detektiert<sup>96</sup>. Das <sup>19</sup>F-Signal ist dabei

## Einleitung

hochspezifisch und hintergrundfrei<sup>96,115,117</sup>. Überlagert man die <sup>19</sup>F-Bilder mit ortsgleich aufgenommenen Protonenbildern, erhält man den anatomischen Kontext des <sup>19</sup>F-Signals<sup>118</sup>. Dieses ist zudem direkt proportional zur Zahl der Fluoratome bzw. zur Zahl der <sup>19</sup>F-Spins pro Voxel<sup>96,110,119,120</sup>, so dass es einfach über die Bestimmung der Signalintensität quantifiziert werden kann.

**Tabelle 1.1: Überblick über verschiedene MR-sensitive Kerne.**

Isotop	Spin <i>I</i>	Natürliche	Gyromagnetisches	MR Frequenz	Physiologische
		Häufigkeit Isotop [%]	Verhältnis $\gamma$ [ $10^7 \cdot \text{rad} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{T}^{-1}$ ]	bei 9,4 Tesla [MHz]	Häufigkeit Element [rel.mol]
<sup>1</sup> H	½	99,98	26,75	400,13	100
<sup>13</sup> C	½	1,07	6,73	100,61	19,184
<sup>14</sup> N	1	99,64	1,94	28,9	1,8501
<sup>17</sup> O	2 ½	0,04	-3,63	54,24	38,7
<sup>19</sup> F	½	100	25,16	376,5	0,0001
<sup>23</sup> Na	1 ½	100	7,08	105,84	0,0626
<sup>31</sup> P	½	100	0,84	161,98	0,3627

*I* = Kernspin,  $\gamma$  = gyromagnetisches Verhältnis, rad = Winkelmaß, s = Sekunde, T = Tesla, MHz = Megahertz, rel. mol = relative Molekülmasse<sup>121</sup>.

### 1.3.3 Perfluorkarbone, PFCs und PLGA-Nanopartikel

Zur <sup>19</sup>F-basierten MRT-Bildgebung werden spezielle Kontrastmittel benötigt, wofür zumeist Perfluorkarbone eingesetzt werden. Dies sind synthetische Komponenten aus mit Fluor gesättigten Kohlenstoff-basierten Molekülen<sup>122,123</sup>. Die hohe <sup>19</sup>F-Dichte der Perfluorkarbonmoleküle ist für die MRT-Bildgebung vorteilhaft, da sie eine starke Akkumulation der <sup>19</sup>F-Atome pro Voxel ermöglicht<sup>115</sup>. Perfluorkarbone müssen aufgrund ihrer Hydrophobie, Lipophobie bzw. Fluorophilie<sup>117,124,125</sup> zum Einsatz in biologischen Systemen entweder mit Lipiden emulgiert werden<sup>126,127</sup>, wodurch Perfluorkarbon-Nanoe-mulsionen entstehen (PFC-NEs, PFCs)<sup>128,129</sup>, oder in PLGA-Nanopartikeln (PLGA = „poly(lactic-co-glycolic acid)“); PLGA-NPs) eingekapselt werden<sup>123,130</sup> (**Tabelle 1.2**). Zudem können für die Umhüllung der Perfluorkarbone Pluronic (Poloxamer F68)<sup>131</sup> verwendet werden, die jedoch unter anderem das Komplementsystem aktivieren und chemosensibilisierende Eigenschaften besitzen, wodurch sie weniger geeignet sind<sup>132</sup>. Als Alternative zur Verwendung von Perfluorkarbonen existieren noch fluorierte Block-Copolymere, welche aber bisher weniger für die <sup>19</sup>F-Bildgebung verwendet werden<sup>115</sup>.

PFCs werden bereits seit längerem in anderer Indikation in der Klinik eingesetzt. Erstmals genutzt wurden sie in den 1960er Jahren für die Sauerstoffanlieferung in Form von Blutersatzstoffen<sup>122</sup> sowie

für die flüssige Beatmung<sup>133</sup>. Erst später erfolgte ihr Einsatz als Bildgebungsagenzien<sup>115,122,123</sup>. Abgesehen von ihrer Verwendung in der <sup>19</sup>F-MRT werden Perfluorkarbone zudem als Kontrastmittel für andere Bildgebungsmodalitäten, wie CT<sup>134</sup>, als *gastrointestinale* Röntgenkontrastmittel<sup>135</sup> oder als *gastrointestinale* Kontrastmittel in der MRT eingesetzt<sup>136</sup>. Im Ultraschall können sie in Form von Mikrobläschen verwendet werden<sup>137</sup>, sowie als Vehikel für die gezielte Anlieferung von Arzneimitteln<sup>138</sup>.

Eine Quelle der als Emulgator für die Herstellung von PFCs verwendeten Phospholipide ist z. B. Lipoid E80S, ein aus Hühnereigelb gewonnenes, nicht-aufgereinigtes Lecithin, also eine Surfactantmischung, die sich aus Lipiden und anderen Substanzen zusammensetzt und deren Hauptbestandteil mit einem Anteil von 80 % Phosphatidylcholin ist<sup>88,139</sup>. Lecithin ist aktuell bereits von der FDA („united states food and drug administration“) für die Herstellung *intravenöser* Emulsionen für die *parenterale* Ernährung zugelassen<sup>140</sup>. Ein Vorteil von Lecithinen ist ihre günstige Beschaffung<sup>141</sup>, ein Nachteil ihre Anfälligkeit für Hydrolyse und Oxidation, die bei längerer Lagerung vor allem unter Lichteinfluss zu einer gelben bis bräunlichen Verfärbung führen. Diese Reaktionen können durch Zusatz von Stabilisatoren, Antioxidanzien wie Vitamin E und Lagerung bei <10 °C jedoch minimiert werden<sup>123,128,140,141</sup>. Mit Hilfe von Lecithinen hergestellte PFCs werden in der <sup>19</sup>F-MRT vorrangig zur Darstellung von Entzündungsprozessen verwendet<sup>110</sup>. Eine Zusammenstellung der wichtigsten Eigenschaften von PFCs findet sich in **Tabelle 1.2**.

Wie oben erwähnt, können Perfluorkarbone auch in Biopolymere eingekapselt werden<sup>142,143</sup>. Unter den Biopolymeren ist „poly(lactic-co-glycolic acid)“ (PLGA), welches als Basismaterial für verschiedene biomedizinische Anwendungen dient, aktuell das am weitesten im medizinischen Bereich eingesetzte Biopolymer<sup>144</sup>. PLGA ist ein lineares Copolymer mit Milch- und Glykolsäure-Wiederholungseinheiten, welches als Block-Co-Polymer oder statistisches Polymer organisiert sein kann<sup>145,146</sup>. Natürlichen Polymeren ist PLGA unter anderem aufgrund seines geringeren Preises sowie Problemen mit der Reinheit natürlicher Produkte überlegen<sup>147</sup>. Die erste Anwendung von PLGA als Biomaterial in der Medizin erfolgte in den 1970er Jahren in Form biodegradierbaren Nahtmaterials (Vicryl/Polyglactin 910, seit 1974)<sup>148</sup>. 1970 wurde es erstmals zur Arzneimittelanlieferung verwendet<sup>149</sup>. In dieser Indikation ist es heute durch die FDA und die „european medicines agency“ (EMA) zugelassen<sup>150</sup>. Zudem wird PLGA in der <sup>19</sup>F-MRT für die Ummantelung von Perfluorkarbonen eingesetzt<sup>123,127,151,152</sup> und zumeist für das „tracking“ *ex vivo* markierter Zellen verwendet<sup>153–156</sup>. Für den Einsatz in der <sup>19</sup>F-MRT wurden vor einigen Jahren bereits auf Guter Herstellungspraxis (GMP)-Niveau produzierte kommerziell erhältliche Emulsionen entwickelt, die sich jedoch noch in der Testphase befinden. Auch für die PLGA-ummantelten Nanopartikel findet sich eine detaillierte Aufstellung der Eigenschaften in **Tabelle 1.2**.

Im Sinne multimodaler Bildgebung können Fluorochrome an die Oberfläche der PFCs<sup>110,157,158</sup> oder der PLGA-Nanopartikel<sup>123,151,159</sup> gebunden werden. Darüber ist es dann möglich, die genaue Lokalisation

## Einleitung

der Nanopartikel bis auf die subzelluläre Ebene mittels Mikroskopie und Durchflusszytometrie nachzuverfolgen. Ebenso wurden Nah-Infrarotfarbstoffe, die eine *in vivo* Bildgebung in moderater Gewebetiefe erlauben, in PFCs inkorporiert<sup>96,160–162</sup>.

**Tabelle 1.2: Gegenüberstellung von PFCs und PLGA-Nanopartikeln.**

	<b>PFCs</b>	<b>PLGA-Nanopartikel</b>
<i>Umhüllung</i>	Phospholipide (z. B. aus Lecithinmischungen), Pluronic	Biopolymer: lineares Copolymer aus Milch- und Glykolsäure-Wiederholungseinheiten
<i>Verwendung</i>	Entzündungsbildgebung, Zell-„targeting“, „tracking“ <i>in vitro</i> markierter Zellen, Messung der Gewebeoxygenierung, Theranostik	„tracking“ <i>in vitro</i> markierter Zellen; multimodale Bildgebung; Theranostik
<i>Herstellung</i>	Ultraschall, Extrusion und Hochdruckhomogenisierung (z. B. Mikrofluidics)	Konventionelle Batchtechniken (Einfach- und Doppelmulsions-techniken, Nanopräzipitation, Sprühtrocknung, Aussalzen); neue Designmethoden (Hochdruckhomogenisierung, PRINT, Membranextrusion)
<i>Modifizierbarkeit</i>	Einbringen von Fluorophoren, NIR-Farbstoffen, PEG und „targeting“-Liganden in die Oberflächenmembran möglich	Oberfläche modifizierbar; modifizierbare Eigenschaften (Partikeldurchmesser, Typ und Menge der eingekapselten Perfluorkarbone, Mechanik, Hydrolysekapazität, Degradationsgeschwindigkeit, variierbare Beschichtung); hohe Beladungskapazität
<i>Abbau der Hüllsubstanzen</i>	Phospholipide werden im Körper vollständig degradiert	Esterhydrolyse zu Milch- und Glykolsäure, über den Zitratzyklus vollständig zu CO <sub>2</sub> und Wasser abgebaut
<i>Haltbarkeit</i>	Bei 4-8 °C über Monate bis Jahre stabil; Sedimentation; Größenzunahme durch Ostwald-Reifung; bei Inkubation bei 37 °C geringe kolloidale Stabilität	Lyophilisierte Partikel bei -80 °C Monate bis mehrere Jahre stabil; bei Inkubation bei 37 °C kein Größenzunahme über drei Wochen feststellbar

PFCs = Perfluorkarbon-Nanoemulsionen, PLGA = „poly(lactic-co-glycolic acid)“, PRINT = „particle replication in nonwetting templates“, NIR = Nahinfrarot, PEG = Polyethylenglycol, CO<sub>2</sub> = Kohlenstoffdioxid

### *Herstellung von PFCs und PLGA-Nanopartikeln*

Übliche Herstellungstechniken für PFCs sind Ultraschall, Extrusion und Hochdruckhomogenisierung<sup>124,128,163,164</sup>. Bei all diesen Techniken wird zunächst durch Mischen mit hoher Scherkraft eine grobe Emulsion ( $\mu\text{m}$ -Größe der Tröpfchen) hergestellt. Bei der Ultraschallhomogenisierung wird zur Herstellung der Nanoemulsionen niederfrequenter Ultraschall eingesetzt (16 bis 400 kHz), dem die Zubereitungen direkt oder indirekt ausgesetzt werden<sup>124,157</sup>. Bei der Extrusion werden die Zubereitungen

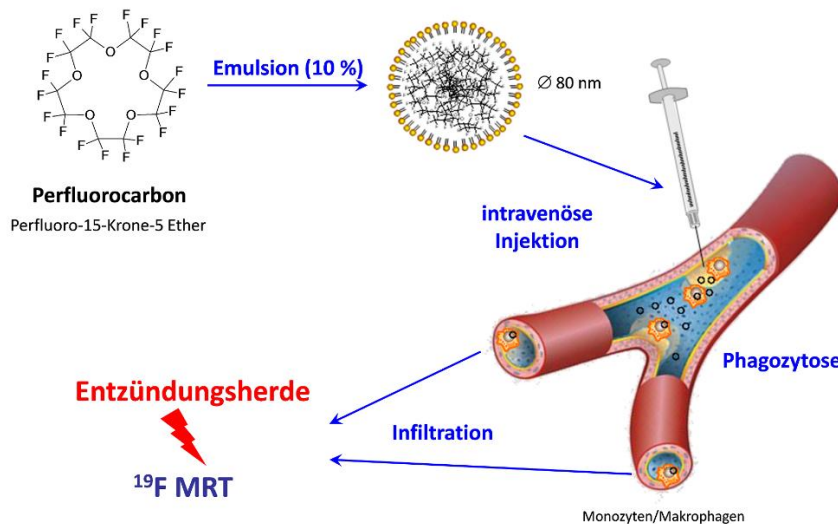
durch Polycarbonatmembranen definierter Porengröße gepresst, durch wiederholtes Passieren der Membran werden die Zubereitungen dabei zunehmend homogenisiert<sup>124</sup>. Bei der Hochdruckhomogenisierung wird die Zubereitung durch einen engen Spalt gepumpt, in dem ein Unterdruck herrscht. Nach Durchfließen des Spaltes kommt es zu einer abrupten Kompression, welche zu einem Aufbruch der Tropfen und deren Neubildung führt<sup>124</sup>. Dies resultiert in submikrometergroßen PFCs, welche sich einheitlich in der Flüssigkeit verteilen<sup>129</sup>.

Die ersten Methoden zur Verkapselung von Arzneimitteln in PLGA wurden 1989 entwickelt. Zunächst wurden z. B. Einfach- und Doppemulsionstechniken, Nanopräzipitation, Sprühtrocknung und Aussalzen verwendet<sup>165,166</sup>. Jedoch ergaben sich bei diesen älteren Herstellungsmethoden verschiedene Probleme bei der Formulierung, wie eine weite Größenverteilung der Nanopartikel, geringe Modulierbarkeit von Freisetzungskinetiken sowie Probleme bei der Mischung zweier Arzneimittel mit verschiedenen Löslichkeitseigenschaften. Entsprechend fand eine Weiterentwicklung der Verkapselungstechniken statt. Heutzutage werden PLGA-NPs vor allem durch Hochdruckhomogenisierung, PRINT („particle replication in nonwetting templates“) und Membranextrusion hergestellt<sup>167–169</sup>.

### 1.3.4 Darstellung von Entzündungsprozessen mittels <sup>19</sup>F-MRT

Um Entzündungsprozesse darzustellen, werden zumeist PFCs *intravenös* verabreicht, die dann im Körper von den Zellen des retikuloendothelialen Systems (Monozyten und Makrophagen) sowie von Neutrophilen Granulozyten phagozytiert werden (**Abbildung 1.2**)<sup>118,120,170</sup>. Ebenso werden PLGA-Nanopartikel nach *intravenöser* Applikation aktiv von Zellen des mononukleären Systems aufgenommen<sup>123,171</sup>. Eine Akkumulation dieser markierten Zellen, wie sie z. B. in Entzündungsherden auftritt, kann dann in Form sogenannter „hot spots“ mit hoher Spezifität ohne jeglichen natürlichen <sup>19</sup>F-Hintergrund dargestellt werden<sup>97,123</sup>. Durch ortsgleiche Aufnahme von <sup>1</sup>H- und <sup>19</sup>F-Bildern ist eine genaue Lokalisierung sowie durch die Quantifizierbarkeit des Signales eine Beurteilung des Ausmaßes der Entzündung möglich (**Abbildung 1.2**)<sup>110,172</sup>. Die Quantifizierbarkeit beruht darauf, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der Schwere der Entzündung und der Stärke des <sup>19</sup>F-Signals besteht: Da der größte Teil der PFCs von Makrophagen internalisiert wird, ist das <sup>19</sup>F-Signal ein Indikator für die Makrophagenlast, den „inflammatorischen Index/IFI“, zu der es linear proportional ist<sup>96,118,173</sup>. Unterstützt wird diese Beobachtung durch Studien, in denen eine selektive Ablation von Makrophagen zu einer Reduktion des <sup>19</sup>F-Signals führte<sup>97,119,120</sup>.

## Einleitung



**Abbildung 1.2: Darstellung von Entzündungsprozessen mittels <sup>19</sup>F-MRT.** Um Biokompatibilität der fluorophilen Perfluorkarbone zu erzielen, werden diese mit Phospholipiden emulgiert. Die hierbei entstehenden PFC-Nanoemulsionen (PFCs) werden nach i. v. Applikation von phagozytotischen Zellen aufgenommen. Diese wandern in den Entzündungsherd ein, wo sie mittels <sup>19</sup>F-MRT mit hoher Sensitivität und Spezifität ohne natürlichen Hintergrund dargestellt werden können. Grafik modifiziert nach<sup>110</sup>.

Der erstmalige Einsatz von <sup>19</sup>F-MRT für die Entzündungsbildgebung erfolgte im Jahr 1985. In einer initialen Studie wurde ein <sup>19</sup>F-Signal in Leber, Tumor und einem *intra*peritonealen Abszess bei Ratten nachgewiesen<sup>174</sup>. In einer weiteren Studie aus dem Jahr 1993 wurde ein <sup>19</sup>F-Signal in räumlicher Nähe zu einem geschädigten Auge in der Kopfregion einer Maus gefunden<sup>175</sup>. Weitere fünf Jahre später wurden die ersten zellulären <sup>19</sup>F-MRT Messungen durchgeführt, in welchen passiv markierte Makrophagen in einem Rattenmodell der Multiplen Sklerose, d. h. experimenteller allergischer Enzephalomyelitis (EAE) nachgewiesen wurden<sup>176</sup>. In diesen frühen Studien fehlt allerdings die histologische Kontrolle, so dass das Vorliegen inflammatorischer Prozesse als Ursprung des <sup>19</sup>F-Signals hypothetisch blieb<sup>88</sup>. Erst 2008 führten Flögel et al. eine Studie durch, in der, gestützt durch entsprechende histologische Untersuchungen, anhand des murinen Myokardinfarktes und ischämischen Schlaganfalls die Eignung der <sup>19</sup>F-MRT als sensitive Methode für die *in vivo* Untersuchung von Entzündungsprozessen belegt wurde<sup>110</sup>. Weiterführende histologische Untersuchungen bestätigten für verschiedene Entzündungsmodelle (MI<sup>177,178</sup>, Pneumonie<sup>120</sup>, *subkutane* Entzündung<sup>179</sup>, IBD<sup>180</sup>, Tumore<sup>161,181</sup>) die Kolo-kalisation der infiltrierten Makrophagen mit dem *in vivo* gemessenen <sup>19</sup>F-Signal.

In der Zwischenzeit wurde die <sup>19</sup>F-MRT in Kombination mit *intravenös* verabreichten PFCs für zahlreiche Entzündungsmodelle eingesetzt: *Myokardinfarkt*<sup>110,177,178,182,183</sup>, *Myokarditis*<sup>184,185</sup>, *Atherosklerose*<sup>186,187</sup>, *Pneumonie*<sup>120</sup>, IBD<sup>119,180</sup>, *Zerebrale Ischämie*<sup>110</sup>, *Neuroinflammation*<sup>188-190</sup>, experimentelle allergische *Enzephalomyelitis* (EAE, Rattenmodell der Multiplen Sklerose)<sup>89,176</sup>, *Glomerulonephritis*<sup>191</sup>, *Ohrlochung*<sup>192</sup>, *Subkutane Entzündung*<sup>158,170,191</sup>, *Transplantatabstoßung*<sup>193,194</sup>, *Arthritis*<sup>97,186,195</sup>, *Pfotenentzündung*<sup>179</sup>, *Abszesse*<sup>174,196</sup>, *Wunden*<sup>197</sup>, Entzündungen in humanen pankreatischen Zellen<sup>137</sup>;

## Einleitung

ebenso erfolgte ein Nachweis von Tumoren<sup>174,181,198,199</sup>. Die bisher durchgeführten *präklinischen* Versuche nutzen vorrangig Mausmodelle, aber auch *ex vivo* und *in vivo* Versuche am Großtiermodell Schwein sind, im Sinne eines *translationalen* Ansatzes, bereits erfolgt<sup>177,178</sup>.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass <sup>19</sup>F-MRT in einer Vielzahl an akuten und chronischen Entzündungsmodellen erfolgreich eingesetzt werden kann. Der große Vorteil dieser Bildgebungstechnik ist eine schnelle und zuverlässige, nicht-invasive Beurteilung der Makrophagenakkumulationes im lebenden Tier<sup>96,97,118</sup>. In zahlreichen Studien wurde eine Überlegenheit der Entzündungsbildgebung mittels <sup>19</sup>F-MRT gegenüber anderen Techniken gezeigt, wie dem Einsatz von konventioneller <sup>1</sup>H-MRT<sup>118,120,193</sup>, der Verwendung von <sup>1</sup>H-Kontrastmitteln<sup>118,193,194,196,200</sup>, physiologischen Methoden oder simpler klinischer Beurteilung<sup>118,120,193</sup>, z. T. sogar gegenüber der Histologie<sup>97</sup>.

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Entzündungsprozesse gehören zu den größten Bedrohungen der menschlichen Gesundheit und spielen ebenso eine wichtige Rolle in der Tiermedizin. Eine nicht-invasive Bildgebungstechnik, welche die frühzeitige Erkennung und Beurteilung von Entzündungsprozessen ermöglicht, ist daher von großer Bedeutung. Eine neuartige Technik zur Darstellung entzündlicher Prozesse beruht auf der Markierung von *phagozytotischen* Zellen durch sogenannte Perfluorkarbon-Nanoemulsionen (PFCs) und deren Darstellung mittels  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT. Nach der *intravenösen* Injektion von PFCs werden diese von zirkulierenden oder lokalen Immunzellen aufgenommen, welche in Entzündungsherden akkumulieren. Aufgrund der natürlichen Abwesenheit von  $^{19}\text{F}$  im Körper erlaubt dies den Nachweis von entzündlichen „hot spots“ mit hoher Sensitivität und Spezifität. Außer lipidummantelten PFCs gibt es jedoch auch eine alternative Verkapselung von Perfluorkarbonen in das Biopolymer „poly(lactic-co-glycolic acid)“ (PLGA). PLGA-Nanopartikel eignen sich ebenfalls für die Markierung von Phagozyten im Körper, wurden bisher jedoch vor allem für das *in vivo* „tracking“ *in vitro* markierter Immunzellen verwendet<sup>153-156</sup>.

Als  $^{19}\text{F}$ - „tracer“ für die  $^{19}\text{F}$ -MRT werden zumeist Perfluorkarbonate eingesetzt, deren  $^{19}\text{F}$ -Atome magnetisch identisch sind. Diese besitzen ein NMR-Spektrum, welches nur eine einzige Resonanzlinie aufweist. Dies resultiert zum einen in einer hohen Signalempfindlichkeit. Zum anderen wird das Auftreten von sogenannten „chemical-shift“ Artefakten verhindert. Ein Perfluorkarbon mit diesen Eigenschaften ist z. B. der Perfluor-15-kronen-5-ether (PFCE). PFCE besitzt zwar 20 Fluoratome, jedoch auch eine biologische Halbwertszeit von über 250 Tagen, was mit einer klinischen Anwendung nicht kompatibel ist<sup>192</sup>. Andere Perfluorkarbonate, wie z.B. Perfluoroktylbromid weisen zwar akzeptable Gewebehalbwertszeiten<sup>192</sup>, jedoch auch komplexere Spektren auf, was bei konventioneller  $^{19}\text{F}$ -Bildgebung zu Artefakten führen kann<sup>177,178</sup>. Aufgrund der Existenz verschiedener Formulierungen von Perfluorkarbonen stellt sich die Frage, ob diese einen Einfluss auf die Gewebeverteilung und möglicherweise sogar die Halbwertszeit von Perfluorkarbonen im Körper haben.

Ziel des ersten Teils der vorliegenden Arbeit war es daher:

- (i) Die biologischen Eigenschaften von PFCE-haltigen Nanopartikeln in verschiedenen Formulierungen (PFCs und PLGA-Nanopartikel) zu charakterisieren. Hierbei wurden neben der Gewebeverteilung und -halbwertszeit in einem Mausmodell zudem
- (ii) die zelluläre Aufnahme der verschiedenen Nanopartikel, ebenso wie ihre toxikologischen Eigenschaften *in vitro* untersucht.



## Einleitung

Auch wenn es bereits zahlreiche Studien gibt, in denen das  $^{19}\text{F}$ -Signal in Entzündungsherden mittels  $^{19}\text{F}$ -MRT untersucht wurde, ist bisher jedoch noch keine systematische vergleichende Charakterisierung der PFC-Aufnahme unter entzündlichen bzw. nicht-entzündlichen Bedingungen durch Organe des retikuloendothelialen Systems oder Immunzellen des Blutes erfolgt.

Ziel des zweiten Teils der vorliegenden Arbeit war es daher:

- (iii) Systematisch das  $^{19}\text{F}$ -Signal in Blut, Leber, Milz, Knochenmark und Lymphknoten, unter entzündlichen (steril/nicht steril) und nicht-entzündlichen Bedingungen zu untersuchen,
- (iv) die zelluläre Aufnahme von PFCs unter entzündlichen sowie nicht-entzündlichen Bedingungen *in vivo* sowie *in vitro* zu charakterisieren sowie
- (v) Faktoren, die zur zellulären PFC-Aufnahme unter entzündlichen Bedingungen beitragen mittels *in vitro* Versuchen zu identifizieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Technische Geräte

Bezeichnung	Typ	Hersteller	Stadt	Land
Akkubetriebene Pipettierhilfen	Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH und Co. KG	Eberstadt	Deutschland
	Accu jet pro	Brand GmbH und Co. KG	Wertheim	Deutschland
Chemie-Pumpstand	PC 3004 VARIO®	VACUUBRAND GmbH und Co. KG	Wertheim	Deutschland
Digitalkamera	AxioCam ICm1	Carl Zeiss AG	Oberkochen	Deutschland
Durchflusszytometer	FACSCanto II	BD Bioscience	Heidelberg	Deutschland
Eismaschine		ZIEGRA Eismaschinen GmbH	Isernhagen	Deutschland
Gasmischelement		FMI Föhr Medical Instruments GmbH	Seeheim-Jugenheim	Deutschland
Infrarotlampe				
Inkubator	Hera Cell TM 150i	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham	USA
Isoflurangelocke				
Klasse N-Sterilisator	HMT 232 N	HMC Europe GmbH	Tüßling	Deutschland
Kühlschrank	Premium	Liebherr	Bulle	Schweiz
Kühltruhe -20 °C	Premium NoFrost	Liebherr	Bulle	Schweiz
Kühltruhe -80 °C	Forma™ -86 °C-Ultra-tiefkühlschrank 900 Serie	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham	USA
Liquiport® Membran-Flüssigkeitspumpe		Carl Roth GmbH und Co. KG	Karlsruhe	Deutschland
Magnetrührer mit Heizung	IKA RCT basic	IKA-Werke GmbH & Co. KG	Staufen	Deutschland
Microfluidizer	M-110P	Microfluidics Inc.	Westerwood	USA
Mikroskope	Inverses Mikroskop CKX31	Olympus Deutschland GmbH	Hamburg	Deutschland
	Inverses Mikroskop Axio Vert A1	Carl Zeiss AG	Oberkochen	Deutschland
	Inverses Kofokalmikroskop LSM 710	Carl Zeiss AG	Oberkochen	Deutschland
MR-Spektrometer	Bruker AVANCE™ 9.4 T Wide Bore NMR Spektrometer	Bruker BioSpin GmbH	Rheinstetten	Deutschland

Material und Methoden

Nasenmaske				
Schaukelplattform	rocking platform 100	VWR	Radnor	USA
Schermaschine	Contura	Wella professionals	Darmstadt	Deutschland
Schüttelgerät Heidolph Rotamax 120		Heidolph Instruments GmbH und Co. KG	Schwabach	Deutschland
Sicherheitswerkbank Klasse 2	Scanlaf Mars Pro Cytosafe Class 2	Labogene	Allerød	Dänemark
Timer		TFA Dostmann	Wertheim-Reichholzheim	Deutschland
Trockenschrank		Memmert GmbH und Co. KG	Schwabach	Deutschland
Ultra Turrax	TP 18/10	IKA-Werke GmbH & Co. KG	Staufen	Deutschland
Vakuumregler	CVC 3000	VACUUBRAND GmbH und Co. KG	Wertheim	Deutschland
Verdampfer	DRÄGER Vapor 19.3 für Isofluran	Drägerwerk AG & Co. KGaA	Lübeck	Deutschland
Vortex Mixer	Reax top	Heidolph Instruments GmbH und Co. KG	Schwabach	Deutschland
Wärmeplatte für Tiere	Temp Control I	TSE Systems GmbH	Bad Homburg	Deutschland
Tierhaltungsschrank	HPP750life	Memmert GmbH und Co. KG	Schwabach	Deutschland
Waagen	Analysenwaage, EW4200-2NM	KERN & SOHN GmbH	Balingen-Frommern	Deutschland
	Feinwaage, Pioneer® Precision	Ohaus Corporation	Parsippany	USA
	Präzisionswaage, Science Education SE 1202 *	VWR	Radnor	USA
Wasseraufbereitungssystem	MilliQ® Reference	Merck KGaA	Darmstadt	Deutschland
Zentrifugen	Centrifuge 5424	Eppendorf	Wesseling	Deutschland
	Centrifuge 5424 R	Eppendorf	Wesseling	Deutschland
	Heraeus Megafuge 16	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham	USA
	Rotanta 460R	Andreas Hettich GmbH und Co. KG	Tuttlingen	Deutschland
	Universal 320R	Andreas Hettich GmbH und Co. KG	Tuttlingen	Deutschland
Zwangsröhre	Restrainer mittel 34 mm	LabArt UG & Co. KG	Waldbüttelbrunn	Deutschland
„ζ-sizer“		Microtrac GmbH	Krefeld	Deutschland

2.1.2 Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Typ	Hersteller	Stadt	Land
Aluminiumfolie		Carl Roth GmbH und Co. KG	Karlsruhe	Deutschland
Butterflykanüle mit Zuleitung	Microflex, 23 G	Vygon	Ecouen	Frankreich
Deckgläser	Stärke 1, rund, Durchmesser 12 mm	Carl Roth GmbH und Co. KG	Karlsruhe	Deutschland
Durchstechflaschen mit PTFE/Silikon Deckel	10 ml	VWR	Radnor	USA
Einmal-Glaspasteurpipetten	1,5 ml, 145 mm und 225 mm	Brand GmbH und Co. KG	Wertenheim	Deutschland
FACS Röhrchen	Falcon™ Rundboden-Polystyrolröhrchen	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham	USA
Glasgefäß	100 ml	Duran	Wertheim	Deutschland
Insulinspritze	U-100 und U-40	BD Bioscience	Heidelberg	Deutschland
Klebeband	Leukofix, 1,25 cm x 9,2 m bzw. 2,5 cm x 9,2 m	BSN medical	Hamburg	Deutschland
Kryoröhrchen	Cryo.S™	Greiner Bio-One	Kremsmünster	Österreich
Microvette	CB300	Sarstedt	Nümbrecht	Deutschland
Multiwellplatten	6-, 24-, 96- „well“	Greiner Bio-One	Kremsmünster	Österreich
Nahtmaterial	Prolene 6-0	Ethicon, Inc.	Somerville	USA
Objektträger	Histobond, 76x26x1 mm	Paul Marienfeld GmbH und Co. KG	Lauda-Königshofen	Deutschland
Parafilm		Bemis Company, Inc.	Oshkosh	USA
Pinzetten	Kleine gebogene Pinzette, BD312R	Aesculap	Tuttlingen	Deutschland
	Splitterpinzette, BD311R	Aesculap	Tuttlingen	Deutschland
Pipettenspitzen	10/20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	STARLAB GmbH	Hamburg	Deutschland
Plastik-Pasteurpipette	1 ml	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham	USA
Polypropylen-Röhrchen	15 und 50 ml	Greiner Bio-One	Kremsmünster	Österreich
Präparationsschere	Feine Schere, BC060R	Aesculap	Tuttlingen	Deutschland
Reagiergefäße „safe-lock tube“	0,5, 1,5 und 2 ml	Eppendorf	Wesseling	Deutschland
Rollrandflasche mit Deckel		Welabo GmbH	Nettetal	Deutschland
Rührfische		Carl Roth GmbH und Co. KG	Karlsruhe	Deutschland

## Material und Methoden

Serologische Pipetten	Corning® Costar® Stripette®, 2, 5, 10, 25, 50 ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München	Deutschland
Sicherheitsinjektionskanüle	BD Eclipse, 21 G und 23 G	BD Bioscience	Heidelberg	Deutschland
Ständer	Kombi-Rack 4 in 1, aus PP	A. Hartenstein GmbH	Würzburg	Deutschland
Verschließzange	20 mm	VWR	Radnor	USA
Zellkulturflaschen mit Filter-Schraubverschluss rot	75 und 175 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One	Kremsmünster	Österreich
Zellkulturschalen	100/20 mm	Greiner Bio-One	Kremsmünster	Österreich
Zellschaber	28 mm	Greiner Bio-One	Kremsmünster	Österreich
Zellsieb „cell strainer“	40 µm Nylon	Corning	New York	USA

2.1.3 Substanzen und Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Stadt	Land
Bacillol AF	Paul Hartmann AG	Heidenheim	Deutschland
„BD comp beads“	BD Bioscience	Heidelberg	Deutschland
Bepanthen® Wund- und Heilsalbe	Bayer	Leverkusen	Deutschland
BSA Fraktion V	Carl Roth GmbH und Co. KG	Karlsruhe	Deutschland
Chlorpromazin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München	Deutschland
Collagenase II	SERVA Electrophoresis GmbH	Heidelberg	Deutschland
Cy5-PE	Avanti Polar Lipids Inc.	Alabaster	USA
Cytochalasin D	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München	Deutschland
DABCO	Carl Roth GmbH und Co. KG	Karlsruhe	Deutschland
DAPI	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München	Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Carl Roth GmbH und Co. KG	Karlsruhe	Deutschland
DMEM high glucose	Merck KGaA	Darmstadt	Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München	Deutschland
DNAse	Merck KGaA	Darmstadt	Deutschland
EDTA	Carl Roth GmbH und Co. KG	Karlsruhe	Deutschland
Ethanol	VWR	Radnor	USA
„FcR blocking reagent“	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach	Deutschland
FCS	Biochrom	Berlin	Deutschland
Flüssigstickstoff	Linde Gas	Düsseldorf	Deutschland
Formaldehyd-Lösung 4 % phosphatgepuffert	Labochem international	Heidelberg	Deutschland
Gadovist® 1,0 mmol/ml Injektionslösung	Bayer	Leverkusen	Deutschland
Glycerin	Carl Roth GmbH und Co. KG	Karlsruhe	Deutschland
Glycerol	Carl Roth GmbH und Co. KG	Karlsruhe	Deutschland
Heparin-Natrium-25.000-ratiopharm Lösung	Ratiopharm	Ulm	Deutschland
HEPES	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham	USA
Isofluran	Piramal Critical Care Deutschland GmbH	Gallbergmoos	Deutschland
isotonische Kochsalzlösung	Fresenius Kabi	Bad Homburg vor der Höhe	Deutschland
Kodan Tinktur forte	Schülke & Mayr GmbH	Norderstedt	Deutschland
Lipoid E80S	Lipoid GmbH	Ludwigshafen	Deutschland
„Lipopolysaccharide, <i>Salmonella typhimurium</i> “, aus <i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> ser. Typhimurium, Chargen-Nr. 3238474	Merck KGaA	Darmstadt	Deutschland
Matrigel	Corning	New York	USA
Mowiol® 4-88	Carl Roth GmbH und Co. KG	Karlsruhe	Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat	Carl Roth GmbH und Co. KG	Karlsruhe	Deutschland

## Material und Methoden

Natrium-Pyruvat	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham	USA
PBS	Carl Roth GmbH und Co. KG	Karlsruhe	Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham	USA
Release 300 mg/ml®- Pentobarbital-Natrium	WDT	Garbsen	Deutschland
Perfluor-15-kronen-5-ether	Fluorochem Ltd.	Hadfield	GB
Sauerstoff	Linde Gas	Düsseldorf	Deutschland
Stickstoff	Linde Gas	Düsseldorf	Deutschland
TEMGESIC® Ampullen, 0,3 mg - Buprenorphinhydrochlorid	Schering-Plough	Kenilworth	USA
TRIS	Carl Roth GmbH und Co. KG	Karlsruhe	Deutschland
Trypsin-EDTA	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham	USA
VEET Haarentfernungscreme Sensitive	Reckitt Benckiser Deutschland GmbH	Heidelberg	Deutschland
“wheat germ agglutinin, Alexa Fluor™ 488 conjugate”	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham	USA

2.1.4 Puffer

Name	Zusätze	Menge bzw. Konzentration
<b>Collagenase-Lösung</b>	PBS	4,98 ml
	Collagenase II	6 mg
	DNase (Stammlösung 100 µg/µl in PBS)	20 µl
<b>Erythrozytenlysepuffer</b> Ammoniumchlorid "Lyse Puffer pH 7,4, isotone Ammoniumchloridlösung" (hergestellt durch Universitätsklinikum Düsseldorf, Düsseldorf, Deutschland)	Ammoniumchlorid	8,29 mg/ml
	Kaliumhydrogencarbonat	1 mg/ml
	Natrium-EDTA	0,0375 mg/ml
<b>Medium für Zellkulturen</b>	DMEM high glucose	500 ml
	FCS	10 %
	HEPES	1 %
	Natrium-Pyruvat	1 %
	Penicillin/Streptomycin	1 %
<b>MACS-Puffer</b>	PBS (pH 7,4)	500 ml
	BSA Fraktion V	0,5 %
	EDTA	5 mM
<b>Mowiol</b>	Glycerin	6 g
	Mowiol	2,4 g
	ddH <sub>2</sub> O	6 ml
	0,2 M TRIS, pH 8,5	12 ml
	DABCO	0,1 %
<b>PFCs</b>	10 mM Phosphat-Glycerol-Puffer	50 ml
	Phospholipid	2,4 bzw. 0,24 %
	Perfluor-15-kronen-5-ether	10 % (w/w)
	Cy5-PE	0,025 bzw. 0,0025 mol%
<b>Phosphat-Glycerol Puffer (pH 7,4)</b>	ddH <sub>2</sub> O	
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7 mM
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 mM
	Glycerol	2,5 % (w/w)



### 2.1.5 Antikörper

Spezifität	Fluorochrom	Klon	Spezies, Typ	Reaktivität	Verdünnung in Blocklsg.	Katnr.	Herst.
CD3	PE/Cy7	145-2C11	Armenian hamster monoclonal IgG	Maus	1:200	100320	2.
CD11b	APC/Fire 750	M1/70	Rat monoclonal IgG	Maus/ Human	1:1000	101262	2.
CD19	PE	1D3	Rat monoclonal IgG	Maus	1:400	557399	1.
CD31	PerCP	390	Rat monoclonal IgG	Maus	1:200	102419	2.
CD45	PE/Cy7	30-F11	Rat monoclonal IgG	Maus	1:400	552848	1.
CD45	PerCP	30-F11	Rat monoclonal IgG	Maus	1:100	557235	1.
F4/80	PE	BM8	Rat monoclonal IgG	Maus	1:100	123110	2.

1. BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
2. BioLegend, San Diego, USA

### 2.1.6 Zelllinien

Zelllinie	ATCC Nummer
CHO	ECACC 85050302
J774.2	ECACC 85011428
RAW264.7	ECACC 91062702
THP-1	ECACC 88081201

### 2.1.7 Tiere

Linie	Züchter	Stadt	Land
C57BL/6	Janvier Labs	Le Genest-Saint-Isle	Frankreich

### 2.1.8 Software

Software	Version	Hersteller	Stadt	Land
FACSDiva Software	v 8.0.3	BD Bioscience	Heidelberg	Deutschland
Fiji	win64	Phi Gamma Delta Fraternity	Madison	USA
FlowJo Software	7.6	FlowJo, LLC	Ashland	USA
GraphPad Prism	5	Graph Pad Software	San Diego	USA
Microtrac FLEX 10.5.0 Software	10.5.0	Microtrac GmbH	Krefeld	Deutschland
ParaVision	5.1	Bruker BioSpin GmbH	Rheinstetten	Deutschland
PC-SAM Software		PC-Sam	Reichshof	Deutschland
ZEN Blue edition Software	2012	Carl Zeiss AG	Oberkochen	Deutschland

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Herstellung und Charakterisierung von PFCs

#### *Herstellung von PFCs*

Zur Herstellung der sNEs (kleine Nanoemulsionen) und bNEs (große Nanoemulsionen) wurden 2,4 oder 0,24 % (w/w) Lipoid E80S in 10 mM Phosphat-Glycerol-Puffer gelöst und durch 30 min Rühren auf dem Rührmischer präemulgiert. Die Präemulgierung wurde als abgeschlossen betrachtet, wenn sich keine groben Stücke mehr in der Voremulsion befanden. Danach wurden 10 % (w/w) Perfluor-15-kronen-5-ether und 0,025 mol % bzw. 0,0025 mol % Cy5-PE zur Voremulsion hinzugegeben, gefolgt von weiteren 30 min Präemulgierung. Um während dieses Schrittes das Ausbleichen des Fluorochroms zu verhindern, wurde die Flasche nach Zugabe des Cy5-PE mit Aluminiumfolie umwickelt. Nach der Präemulgierung wurde unter Verwendung eines Ultra Turrax TP 18/10 eine grobe Emulsion hergestellt (ein Vorgang, der als „Mischen mit hoher Scherkraft“ bezeichnet wird). Die finale Nanoemulsion wurde durch Homogenisierung mit hoher Scherkraft in einem M-110P Microfluidizer hergestellt (10 Zyklen bei 1000 bar). Anschließend wurden die so gewonnenen PFCs in 10 ml Durchstechflaschen mit PTFE/Silikon Deckel abgefüllt, welche mit Hilfe einer 20 mm Verschleißzange verschlossen wurden, um dann unter Standardbedingungen (121 °C, 1 bar, 22 min) in einem Autoklaven hitzesterilisiert zu werden.

#### *Partikelcharakterisierung mittels Photonenkorrelationsspektroskopie*

Die Charakterisierung der Partikel erfolgte zum einen mittels Photonenkorrelationsspektroskopie („photon correlation spectroscopy“; PCS) in einem „ζ-sizer“, der mit Microtrac FLEX Software betrieben wurde. Die Messungen umfassten 10 Zyklen à 90 Sekunden. Es wurden jeweils 20 µl der Substanzen in 1 ml ddH<sub>2</sub>O gemessen.

Mittels Photonenkorrelationsspektroskopie können der hydrodynamische Durchmesser sowie die Größenverteilung in kolloiddispersen Systemen, des Weiteren die Oberflächenladung von Partikeln (das ζ-Potential) bestimmt werden. Erstere beiden Parameter werden ermittelt, indem *monochromatisches* Licht spezifischer Wellenlänge in die Probenkammer, in der sich die Suspension befindet, eingestrahlt wird. Das auf die Partikel treffende Licht wird gestreut und in der Folge von einem *Photomultiplier* erfasst, welcher im 90 °-Winkel zum einfallenden Laserlicht positioniert ist. Aufgrund der *invers* mit der Größe korrelierten Brownschen Molekularbewegung der Partikel kann durch den Zusammenhang zwischen Diffusionskoeffizienten und Partikelgröße auf die Größenverteilung der Partikel geschlossen werden (Stokes-Einstein-Gleichung). Die Messung des ζ-Potentials beruht auf der Tatsache, dass sich in kolloiddispersen Systemen eine als Helmholtz-Doppelschicht bezeichnete, fest an die Partikeloberfläche gebundene Ionenschicht findet, um die sich wiederum lose gebundene Ionen anlagern, so dass die Netto-Oberflächenladung der Partikel gleich Null ist. Bei der Bewegung der Partikel durch

ein elektrisches Feld geht ein Teil der lose gebundenen Ionen verloren, so dass eine Ladung messbar wird.

### *Bestimmung des $^{19}\text{F}$ -Gehaltes mittels $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT*

Eine detaillierte Beschreibung der  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT Messungen findet sich im Kapitel 2.2.6 „Kombinierte  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$  Magnetresonanztomografie (MRT)“.

## 2.2.2 Arbeiten mit Zellen

### 2.2.2.1 Arbeiten mit kultivierten Zelllinien

- Allgemeines zur Zellkultur

Vor jeder Verwendung wurden die bei den Zellkulturarbeiten benutzten Flüssigkeiten in einem Trockenschrank auf 37 °C erwärmt. Alle Arbeiten erfolgten unter einer Klasse 2 Sterilwerkbank. Sämtliche Arbeitsflächen, die behandschuhten Hände sowie Mediumflaschen wurden vor dem Einbringen unter die Bank gründlich mit Bacillol AF benetzt. Für das Absaugen von Flüssigkeiten wurden eine Membran-Flüssigkeitspumpe und Einmal-Glaspasteurpipetten verwendet, zum Aufnehmen von sterilem Medium sowie zum Herstellen des Mediums Einmal-Plastikpipetten, wobei eine akkubetriebene Pipettierhilfe verwendet wurde. Für das Pipettieren kleiner Flüssigkeitsmengen wurden Pipettenspitzen und Eppendorf Research® plus Pipetten verwendet. Die gleichen Pipetten und Pipettenspitzen wurden auch für sämtliche unsterilen Arbeiten außerhalb der Sterilwerkbank verwendet.

- Kultivierungsbedingungen und Passagieren der Zellen

„Chinese hamster ovarian cells“ (CHO), Zellen der murinen Makrophagenzelllinien RAW264.7 bzw. J774.2 sowie der humanen Monozytenzelllinie THP-1 wurden in einer Dichte von  $5 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$  auf 10 cm Zellkulturschalen (10-15 ml Medium; CHO) oder in T75 bzw. T175 Zellkulturflaschen (15-20 ml bzw. 20-25 ml Medium in T75 bzw. T175 Zellkulturflaschen; RAW und J774 bzw. THP-1) ausplattiert. Hierfür wurde ein selbst angesetztes Medium für Zellkulturen verwendet. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  in einem Brutschrank inkubiert. Alle drei Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Bei einer Konfluenz von 80 % wurden die Zellen passagiert. Dabei wurde im Falle der adhärennten Zelllinien das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann für ca. 2 min bzw. bis zum Ablösen der Zellen bei 37 °C in 1 ml 0,05 % Trypsin-EDTA inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden resuspendiert und in ein 15 ml Polypropylen-Röhrchen überführt, in welches zum Abstoppen der Trypsinreaktion durch das enthaltene Serum 5 ml Medium für Zellkulturen vorgelegt worden waren. Im Falle der Suspensionszelllinie THP-1 entfielen Waschen und Ablösen der Zellen mit Trypsin. Diese Zellen wurden direkt in ihrem Medium in ein 50 ml Polypropylen-Röhrchen überführt. In beiden Fällen wurden die Zellen im Röhrchen für 5 min bei 350 x g abzentrifugiert, der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen

in 1 ml Medium resuspendiert und in oben genannter Dichte in einer bereits mit Medium befüllten 10 cm Zellkulturschale oder T75 bzw. T175 Zellkulturflasche ausplattiert.

### • Einfrieren und Auftauen von Zellen

Nach ca. 10 Passagen wurden die Zellen eingefroren. Hierzu wurden sie nach dem Ablösen, Abzentrifugieren und Abnehmen des Überstandes statt in Medium in 900 µl hitzeinaktiviertem FCS aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen, in welches bereits 100 µl DMSO vorgelegt worden waren überführt und umgehend bei -80 °C eingefroren. Beim Auftauen wurden die Zellen in den Kryoröhrchen bei 37 °C im Trockenschrank angetaut, bis sich nur noch ein kleiner Rest Eis in der Zellsuspension fand. Die bereits flüssige Suspension wurde in ein 15 ml Röhrchen überführt, in welches bereits 5 ml Medium für Zellkulturen vorgelegt worden waren, der Rest Eis im Kryoröhrchen wurde in 1 ml dieses Mediums aufgetaut und ebenfalls in das 15 ml Röhrchen transferiert. Die Suspension wurde abzentrifugiert, der Überstand abgenommen, das Pellet in 1 ml Medium resuspendiert und das gesamte Volumen in eine Zellkulturschale bzw. -flasche überführt. Am folgenden Tag erfolgte ein Mediumwechsel, in der darauffolgenden Woche waren die Zellen bereit für Versuche.

### • Inkubation von Zellen mit PFCs und PLGA-Nanopartikeln

Um zu untersuchen, wie die verschiedenen Zelllinien PFCs und PLGA-Nanopartikel aufnehmen wurden Zellen vorangehenden Studien entsprechend<sup>7,158</sup> über einen Zeitraum von 80 min mit den Partikeln inkubiert. Während der Inkubation erfolgten serielle Probenahmen für durchflusszytometrische Analysen (siehe Kapitel 2.2.4). Hierfür wurden die nach dem Abnehmen von der Zellkulturschale pellettierten Zellen in der Menge Medium aufgenommen, die erforderlich war, um für jede der im Folgenden angesetzten Proben 200 µl pro Probenahmezeitpunkt an Suspension zu erhalten. Die entsprechenden Mengen an Zellsuspension wurden jeweils in ein 15 ml Röhrchen pro Ansatz überführt. Für jede abzunehmende Probe wurde vor dem Versuch ein FACS Röhrchen mit 2 ml MACS-Puffer vorbereitet. Die FACS-Röhrchen wurden auf Eis, mit einer Alufolie abgedeckt gelagert. Der erste Zeitpunkt, an dem eine Probe entnommen wurde, war der Zeitpunkt 0, an dem den Suspensionen noch keine Partikel zugegeben worden waren. Dieser Zeitpunkt diente als Referenz für die folgenden Messungen. Nach Abnahme der Zeitpunkt 0 Probe wurden die gewünschten Mengen an Partikeln (2,5 und 5 µl sNEs und bNEs, 0,3, 1 und 5 µl PLGA-NPs (PLGA-Nanopartikel)), 1, 2,5 und 5 µl PLGA-NCs (PLGA-Nanokapseln)) zu den Zellsuspensionen in den 15 ml Röhrchen pipettiert, die Röhrchen waagrecht in einem Ständer befestigt und auf einer Schaukelplattform (ca. 40 rpm) im Dunkeln in einem auf 37 °C geheizten Trockenschrank inkubiert. Bei der Inkubation bei 4 °C wurden die 15 ml Röhrchen stattdessen abgedeckt auf einem Schüttler in einem Kühlraum inkubiert. Für die durchflusszytometrischen Messungen wurden zu den Zeitpunkten 5, 10, 20, 40 und 80 min jeweils 200 µl aus den Ansätzen entnommen und in die FACS-Röhrchen überführt. Nachdem alle Proben abgenommen worden waren, wurden die FACS-Röhrchen

für 5 min bei 500 x g und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, es erfolgte ein Waschschritt, in dem 200 µl MACS-Puffer auf die Zellpellets pipettiert und diese erneut abzentrifugiert wurden.

Als weitere Technik zur Bestimmung der Aufnahme der PFCs und PLGA-Nanopartikel durch die Zellen wurde der <sup>19</sup>F-Gehalt in Zellpellets mittels <sup>1</sup>H/<sup>19</sup>F-MRT gemessen (siehe Kapitel 2.2.6). Zu diesem Zweck wurden die Zellen für 2 h oder 24 h mit den Partikeln inkubiert. Für die 2 h Inkubation wurden die Zellen in 1 ml Medium aufgenommen und in einem 15 ml Röhrchen im Dunkeln bei 37 °C auf einer Schaukelplattform (ca. 40 rpm) in einem Trockenschrank mit 2,5 und 5 µl sNEs und bNEs bzw. 0,3, 1 und 5 µl PLGA-NPs inkubiert. Nach 2 h wurde die gesamte Suspension in ein 1,5 ml Reagiergefäß überführt. Für <sup>19</sup>F-MRT-Analysen nach 24 h Inkubation wurden die Zellen in einer Dichte von  $5 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  pro „well“ in jeweils 1,5 ml Medium auf „6-well plates“ ausplattiert und unmittelbar die gewünschte Menge an Partikeln (2,5 und 5 µl sNEs und bNEs, 0,3, 1 und 5 µl PLGA-NPs) hinzugegeben. Für jeden Ansatz wurde zusätzlich eine Negativkontrolle angesetzt, der keine Partikel zugegeben wurden. Die Zellen wurden dann für 24 h in einem Brutschrank inkubiert. Nach 24 h wurde der Zellkulturüberstand abgesaugt, die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst, es wurde 1 ml eiskaltes PBS in die „wells“ gegeben und die so entstandenen Zellsuspensionen in 1,5 ml Reagiergefäße überführt. Das weitere Vorgehen war identisch für 2 h und 24 h Inkubation. Die Zellsuspensionen in den 1,5 ml Reagiergefäßen wurden bei 500 x g und 4 °C für 5 min abzentrifugiert, 1x mit 1 ml eiskaltem PBS gewaschen und danach für 10 min auf Eis in 200 µl 4 % PFA fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Pellets in 100 µl PBS resuspendiert und die so entstandenen Zellsuspensionen in 0,2 ml PCR Reaktionsgefäße überführt. Es ist möglich, auf diese Art fixierte Zellen für mehrere Monate bei 4 °C zu lagern. Vor den MRT-Messungen wurden die PCR Reaktionsgefäße in 15 ml Röhrchen für 5 min bei 500 x g abzentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Der <sup>19</sup>F-Gehalt der Pellets wurde dann mittels <sup>19</sup>F-MRT ermittelt (siehe Kapitel 2.2.6).

### • Analyse der Zellviabilität

Um mögliche zytotoxische Eigenschaften der PFCs und PLGA-Nanopartikel zu ermitteln, wurde zum einen die Vitalität von kultivierten Zellen untersucht. Hierfür wurde die Zahl der lebenden Zellen mittels Durchflusszytometrie ermittelt (siehe Kapitel 2.2.4). Zudem wurde mikroskopisch die Morphologie der Zellkulturen beurteilt, nachdem diese für 24 h mit Partikeln inkubiert worden waren (siehe Kapitel 2.2.5). Für beide Versuche wurden CHO, RAW264.7, J774 und THP-1 Zellen verwendet. Für die durchflusszytometrischen Messungen wurden die Zellen für 0, 5, 10, 20, 40 und 80 min, für die mikroskopische Beurteilung der Zellmorphologie für 24 h mit Partikeln in den Konzentrationen 2,5 µl für sNEs/bNEs bzw. 5 µl für PLGA-NPs/PLGA-NCs inkubiert.

### • *In vitro* Stimulation mit LPS oder CRP

Zur Untersuchung der zellulären Aufnahme von PFCs bei einer Kurzzeitstimulation der Zellen mit Lipopolysaccharid (LPS) wurden RAW264.7 Makrophagen über 80 min mit 1 µg/ml LPS stimuliert. Diese Konzentration wurde entsprechend vorangehender Arbeiten von Temme et al. und Bouvain gewählt<sup>7,170</sup>. Zeitgleich wurden die Zellen mit 15 µl PFCs (PFCs mit einem Durchmesser von 83 nm, die Cy5 in ihrer Lipidhülle enthielten) inkubiert. Es erfolgten Probenentnahmen nach 0, 5, 10, 20, 40 und 80 min. Verglichen wurden diese stimulierten Proben mit einer unstimulierten Kontrolle, der kein LPS zugesetzt worden war. Zudem wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, der weder LPS noch PFCs zugesetzt wurden. Inkubation und Probenabnahme erfolgten wie oben beschrieben, durchflusszytometrische Analysen wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben.

Des Weiteren wurde untersucht, ob auch eine Vorstimulation der Zellen mit LPS/CRP für 24 h, vor einer Partikelinkubation über 180 min eine vermehrte PFC-Aufnahme bewirkte. Für diesen Versuch wurden RAW264.7 Makrophagen in einer Dichte von  $5 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  auf „6-well plates“ ausplattiert. In jedes „well“ wurde 1 ml Medium gegeben, welches mit 1 µg/ml LPS bzw. 50 µg/ml CRP versetzt wurde. Die Konzentration des CRP wurde dabei entsprechend der Arbeit von Jones et al. gewählt<sup>201</sup>. Des Weiteren wurde eine unstimulierte Kontrolle angesetzt, der kein LPS/CRP zugesetzt wurde. Nach 24 h Stimulation wurden die Zellen mithilfe eines Zellschabers von den Platten abgelöst, 1x in DMEM gewaschen, die Zellen vereinzelt und, wie oben beschrieben, über 180 min mit 15 µl PFCs in 15 ml Röhrchen, mit Probenentnahmen nach 0, 5, 10, 20, 40, 80, 120 und 180 min in einem Ständer auf einer Schaukelplattform (ca. 40 rpm) im Dunkeln in einem auf 37 °C geheizten Trockenschrank inkubiert. Nach Vorstimulation mit CRP wurden einem Ansatz während der Partikelinkubation 50 µg/ml CRP zugesetzt, ein weiterer Ansatz wurde nach der Partikelzugabe ohne CRP inkubiert. Nach der Vorstimulation mit LPS erfolgte die Partikelinkubation ausschließlich ohne LPS-Zusatz. Für beide Entzündungsmediatoren wurde zusätzlich eine Negativkontrolle mitgeführt, der weder LPS/CRP noch PFCs zugesetzt wurden. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben.

Um die zellstimulatorischen Effekte der Entzündungsmediatoren von Effekten zu trennen, welche von der unmittelbaren Gegenwart von LPS/CRP abhängig sind, wie z. B. eine Opsonierung der PFCs, erfolgte zudem eine 24 h Inkubation der Zellen mit PFCs bei gleichzeitiger Stimulation mit LPS/CRP. Hierfür wurden RAW264.7 Makrophagen in einer Dichte von  $5 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  auf „6-well plates“ ausplattiert. In jedes „well“ wurde 1 ml Medium gegeben, dem 1 µg/ml LPS bzw. 50 µg/ml CRP zugesetzt wurden. Als unstimulierte Kontrolle wurde eine Probe ohne Zusatz von LPS/CRP angesetzt. Allen Proben wurden 15 µl PFCs zugesetzt, zudem wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, der weder LPS/CRP noch PFCs zugegeben worden waren. Die Inkubation der Zellkulturen erfolgte über 24 h. Nach 24 h wurde der Zellkulturüberstand abgesaugt, die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst, es wurde 1 ml eiskaltes PBS

in die „wells“ gegeben und die so entstandenen Zellsuspensionen in FACS-Röhrchen mit 2 ml MACS-Puffer überführt. Diese wurden bei 500 x g und 4 °C für 5 min abzentrifugiert und 1x mit 200 µl MACS-Puffer gewaschen. Die durchflusszytometrischen Messungen erfolgten wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben.

### 2.2.2.2 Arbeiten mit primären Zellen

#### • Isolation von Zellen aus Blut, Milz und Leber

Für weitere Experimente wurden primäre Zellen aus murinem Blut, Milz und Leber eingesetzt. In diesen Experimenten wurden zur Bestimmung der zellulären Aufnahme und möglicher zytotoxischer Effekte von PFCs und PLGA-Nanopartikeln durchflusszytometrische Messungen durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.4). Blut sowie Organe wurden wie im Kapitel 2.2.3 „Tierexperimentelle Arbeiten“ beschrieben entnommen. Nach der Entnahme wurden die Organe zunächst in kaltem PBS gespült, um sie von Blutresten zu befreien. Dann wurde die Milz in vier und die Leber in mehrere kleine Teile zerschnitten. Die Organe wurden in 15 ml Röhrchen mit 1 ml (Milz) bzw. 4 ml (Leber) Collagenase II Lösung gegeben. Die Röhrchen wurden für eine Inkubationsdauer (Verdau) von 15 min in einem auf 37 °C erwärmten Trockenschrank auf einer Schaukelplattform (ca. 40 rpm) festgeklebt. Nach der Inkubation wurden die Organreste mit den Stempeln von U-40 Einmal-Insulinspritzen durch 40 µm Zellsiebe passiert, die auf 50 ml Röhrchen gesetzt worden waren. Hierdurch konnten die Zellen vereinzelt werden. Während und nach dem Zerreiben mit den Spritzenstempeln wurden die Siebe mit PBS gespült (Milz: 10 ml, Leber: 40 ml PBS gesamt). Die auf diese Weise gewonnenen Zellsuspensionen wurden für 5 min bei 500 x g abzentrifugiert, der Überstand wurde mit einer Einmal-Glaspasteurpipette abgesaugt, welche an einen mittels eines CVC 3000 Vakuumreglers gesteuerten Chemiepumpstand angeschlossenen war.

Ab diesem Punkt war das weitere Vorgehen für Blut und aus Milz und Leber gewonnene Zellen identisch. Zu frisch gewonnenem Blut und der Milzzellsuspension wurde zunächst je 1 ml Erythrozytenlyse-Puffer hinzugegeben, zur Leberzellsuspension 3 ml. Aus den 3 ml mit Erythrozytenlyse-Puffer versetzter Leberzellsuspension wurden in diesem Schritt 30 µl in ein 1,5 ml Reagiergefäß überführt und nur diese geringe Menge weiterverwendet. Die Zellsuspensionen wurden nach gründlichem Resuspendieren der Pellets für 10 min auf Eis in Lysepuffer inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt für 5 min bei 500 x g und Abpipettieren des Überstandes wurde die Farbe des Zellpellets beurteilt: War dieses weiß, also frei von Erythrozyten, wurde mit dem nächsten Schritt fortgefahren. Fanden sich hingegen noch Erythrozyten (rote Farbe), wurde die Erythrozytenlyse bis zu 5-mal wiederholt. Nach der Erythrozytenlyse wurde zur Verhinderung unspezifischer Antikörperbindungen an die Zellen ein „Fc-block“ durchgeführt. Hierfür wurden 50 µl verdünntes „FcR blocking reagent“ (1:20 in MACS Puffer) auf die Zellpellets gegeben, die gründlich resuspendiert und dann für 10 min auf Eis inkubiert wurden. Danach erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt.

### • Isolation von Zellen aus Entzündungsherden

Für die Untersuchung der zellulären Partikelaufnahme unter entzündlichen Bedingungen wurden Zellen direkt aus den Entzündungsherden (Matrigel- „plug“ bzw. infarziertes Herz) gewonnen. Die Matrigel- „plugs“ wurden entnommen wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben. Wenn noch Reste von Gewebe am Matrigel- „plug“ hafteten, wurden diese während der folgenden Aufarbeitung – anders als die Zellen aus den weichen Matrigel- „plugs“ - entweder in den Zellsieben zurückgehalten oder durch die Antikörperfärbung während der durchflusszytometrischen Messungen ausgeschlossen, da in dieser nur Immunzellen angefärbt wurden. Für die Vereinzelung der Zellen wurden die Matrigel- „plugs“ mit Hilfe eines Spritzenkolbens durch ein 40 µm Zellsieb in ein 50 ml Röhrchen passiert, wobei wiederholt mit PBS gespült wurde (10 ml gesamt). Die Zellen wurden für 5 min bei 500 x g abzentrifugiert und der Überstand mit Hilfe einer an einen Chemiepumpstand angeschlossenen Glaspasteurpipette abgesaugt. Dann wurden die Pellets im verbleibenden Rest Überstand resuspendiert und in 1,5 ml Reagiergefäße überführt.

Die Herzen wurden entnommen wie im Kapitel 2.2.3 „Tierexperimentelle Arbeiten“ beschrieben. Um die Immunzellen aus den Herzen zu gewinnen, wurden diese mit Collagenase verdaut, wie oben für die Gewinnung von Zellen aus Milz und Leber beschrieben. Die verdauten Herzen wurden dann mit einem Spritzenkolben durch ein 40 µm Sieb in ein 50 ml Röhrchen gerieben, wobei regelmäßig mit PBS gespült wurde (10 ml gesamt). Die Zellen wurden für 5 min bei 500 x g abzentrifugiert und der Überstand mit Hilfe einer an einen Chemiepumpstand angeschlossenen Glaspasteurpipette abgesaugt. Dann wurden die Pellets im verbleibenden Rest Überstand resuspendiert und in ein 1,5 ml Reagiergefäß überführt. Alle Zellen, die keine Immunzellen waren wurden durch die folgende Antikörperfärbung in der durchflusszytometrischen Messungen ausgeschlossen.

### • Antikörperfärbung der primären Zellen

Um anhand von durchflusszytometrischen Messungen eine Aussage darüber treffen zu können, durch welche Immunzellsubtypen die Nanopartikel in welchem Ausmaß aufgenommen werden, wurden die primären Zellen mit Antikörpern angefärbt. Dieser Schritt erfolgte nach der unten beschriebenen Inkubation der Zellen mit den PFCs und PLGA-Nanopartikeln. Die verwendeten Antikörper waren bereits mit Fluorophoren gekoppelt. Für die Färbungen wurden folgende Antikörper verwendet: Blutimmunzellen, direkt aus Entzündungsherden gewonnene Immunzellen sowie Milzzellen: CD45-PerCP, 1:100; CD11b-APC/Fire 750, 1:1000; CD3-PE/Cy7, 1:200; CD19-PE, 1: 400. Leberzellen: CD45-PE/Cy7, 1:400; CD11b-APC/Fire 750, 1:1000; F4/80-PE, 1:100; CD31-PerCP Cy5.5, 1:200. Eine genaue Beschreibung des Vorgehens bei der Identifizierung der einzelnen Zellsubpopulationen anhand dieser Antikörperfärbungen findet sich in Kapitel 2.2.4 „Durchflusszytometrie“.



## Material und Methoden

Die Antikörper wurden in den genannten Konzentrationen in Form eines „mastermixes“ in MACS-Puffer angesetzt. Im Falle der Leberzellen wurde statt des üblichen MACS-Puffers mit 0,5 % BSA MACS-Puffer mit 30 % BSA verwendet, da die Leberzellen eine starke interzelluläre Adhärenz aufweisen, die durch einen höheren Gehalt an Serum im Puffer vermindert werden sollte. Vor der Zugabe der Antikörper wurden die Zellpellets durch vorsichtiges Klopfen mit der Handkante an den Rand der „96-well plate“ im nach dem letzten Waschschrift in den „wells“ verbliebenen Rest des Überstandes resuspendiert. Nur so konnte sichergestellt werden, dass sich die Zellen homogen in Suspension befanden und dadurch alle Zellen den Antikörpern exponiert waren. Auf jedes Zellpellet wurden dann 50 µl des „mastermixes“ gegeben. Die Antikörperinkubation erfolgte für 30 min auf Eis im Dunkeln.

### • Inkubation mit PFCs und PLGA-Nanopartikeln

Um zu untersuchen, wie die isolierten Blutleukozyten oder die aus den Organen gewonnenen Zellen die PFCs und PLGA-Nanopartikel aufnehmen, wurden sie nach der Isolation aus Blut bzw. Geweben über 40 bzw. 180 min<sup>202</sup> mit den Partikeln inkubiert, wobei serielle Probennahmen erfolgten. Für die Partikelinkubation wurde das bei der Zellisolation gewonnene Zellpellet in DMEM aufgenommen, sorgfältig resuspendiert und auf die der Zahl an Behandlungen entsprechende Anzahl an 1,5 ml Reagiergefäßen aufgeteilt. Das Medium wurde in jedem dieser Gefäße auf 1,1 ml aufgefüllt. Die aus der Schwanzvene gewonnenen 40 µl Blut reichten bei einer Zeitserie mit fünf Probennahmen à 100 µl pro Probe jeweils für drei Ansätze.

Die Blutimmunzellen wurden unter folgenden Bedingungen inkubiert: Negativkontrolle (Inkubation ohne Partikel), 2,5 und 5 µl sNEs und bNEs, 0,3, 1, und 5 µl PLGA-NPs, 2,5 µl PLGA-NCs. Die Milz- und Leberzellen wurden mit 2,5 µl sNEs bzw. bNEs, 5 µl PLGA-NPs und 2,5 µl PLGA-NCs inkubiert. Um die Aufnahme von PFCs durch Blutimmunzellen, die aus Tieren mit Entzündungsherd (Matrigel/LPS- und MI-Modell), sowie diejenige durch Immunzellen, die direkt aus Entzündungsherden gewonnen worden waren zu untersuchen, wurden die entsprechenden Zellen mit 2,5 µl PFCs (PFCs mit einem Durchmesser von 83 nm, die Cy5 in ihrer Lipidhülle enthielten) inkubiert. Vor der Zugabe der Partikel wurden 100 µl der Zellsuspension als Zeitpunkt 0 Probe abgenommen. Die Proben wurden in eine „96-well plate“ überführt, in deren „wells“ bereits je 100 µl MACS-Puffer vorgelegt worden waren. Die Platte mit den bereits abgenommenen Proben wurde auf Eis im Dunkeln gelagert. Die Inkubation der Zellen mit den PFCs und PLGA-Nanopartikeln erfolgte in einem Ständer auf einer Schaukelplattform (ca. 40 rpm) im Dunkeln in einem auf 37 °C geheizten Trockenschrank. Darüber hinaus wurde im Falle der Blutimmunzellen eine Untergruppe (Negativkontrolle, 2,5 µl sNEs, 2,5 µl bNEs, 5 µl PLGA-NPs, 2,5 µl PLGA-NCs) bei 4 °C inkubiert. Hierfür wurden die Reagiergefäße abgedeckt auf einem Schüttler in einem Kühlraum inkubiert. Zu den Zeitpunkten 5, 10, 20 und 40 min, im Falle der Entzündungszellen aus Blut und Entzündungsherden zudem nach 80 min, sowie für Milz und Leber zusätzlich nach 80 und 180

min wurden jeweils 100 µl der Zellsuspension abgenommen und in die „96-well plate“ überführt. Die „96-well plate“ wurde nach Abnahme aller Proben für 5 min bei 500 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurden die Pellets einmal in 200 µl MACS Puffer gewaschen. Hierauf wurde eine Antikörperfärbung durchgeführt (s. o.), die Analyse der Partikelaufnahme in die einzelnen Zellsubpopulationen erfolgte mittels Durchflusszytometrie (siehe Kapitel 2.2.4).

- **Einflussfaktoren für die Aufnahme von PFCs und PLGA-NPs durch Blutimmunzellen**

Um zu untersuchen, ob verschiedene Partikelkonzentrationen, die Inkubation bei verschiedenen Temperaturen oder ohne Blutplasma, eine Blockade der Fc-Rezeptoren sowie der Clathrin-medierte Endozytose oder der Phagozytose einen Einfluss auf die Partikelaufnahme durch murine Blutimmunzellen hat, wurden folgende Abänderungen des oben beschriebenen Protokolls der Aufarbeitung und Inkubation murinen Blutes durchgeführt. Die Partikelinkubation erfolgte mit 2,5 µl sNEs bzw. 5 µl PLGA-NPs. Anders als im Vorhergehenden beschrieben, wurden nach der Blutentnahme keine Erythrozytenlyse und kein „Fc-block“ durchgeführt, sondern es wurden 20 µl Vollblut ohne Zusatz von DMEM mit den oben genannten Volumina an Partikeln für 0, 5, 10, 20, 40, 80, 120 und 180 min senkrecht in einem Ständer auf einer Schaukelplattform (ca. 40 rpm) im Dunkeln in einem auf 37 °C geheizten Trockenschrank inkubiert. Zu den genannten Zeitpunkten wurden 2 µl Proben entnommen und, wie für die oben beschriebenen Versuche in eine „96-well plate“ überführt, in deren „wells“ bereits jeweils 100 µl MACS-Puffer vorgelegt worden waren. Nach Abzentrifugieren der Platte und einmaligem Waschen der Zellpellets in 200 µl MACS-Puffer erfolgten eine Erythrozytenlyse in 200 µl Lysepuffer je „well“, ein weiterer Waschschriff und ein „Fc-block“. Dann wurde verfahren wie zuvor beschrieben, d. h., es erfolgte eine Antikörperfärbung mit anschließender durchflusszytometrischer Analyse der Partikelaufnahme in die einzelnen Leukozytensubpopulationen (siehe Kapitel 2.2.4).

**Serumbestandteile:** Um zu untersuchen, ob Serumbestandteile einen Einfluss auf die Aufnahme von PFCs und PLGA-NPs durch Blutimmunzellen haben, wurden die 20 µl Vollblut in 1 ml PBS aufgenommen und 7 min mit 500 x g bei Raumtemperatur abzentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen. Dieser Waschschriff wurde 3x wiederholt. Da bei dem ursprünglichen Volumen von 20 µl davon auszugehen ist, dass 10 µl Serum und 10 µl Zellen vorliegen, wurden im Anschluss an die Waschschriffe zu den Blutzellen 10 µl PBS gegeben und das Pellet vorsichtig auf einem Vortexer in dem Puffer resuspendiert. Dann wurden die Partikel zu der Zellsuspension pipettiert und erneut gevortext, um eine gleichmäßige Verteilung der Partikel im Blut sicherzustellen. Als Negativkontrolle wurde eine Probe mitgeführt, bei der das Serum nicht durch PBS ersetzt worden war.

**Fc-Rezeptoren:** Zur Untersuchung der Bedeutung von Fc-Rezeptoren für die zelluläre Aufnahme von PFCs und PLGA-NPs wurden zu 20 µl Vollblut 2 µl „FcR-blocking reagent“ hinzupipettiert (Verdünnung

von 1:10). Dem Blut wurden die PFCs bzw. PLGA-NPs zugesetzt und vorsichtig gevortext. Als Negativkontrolle diente eine Probe, der kein „Fc-block“ zugesetzt worden war.

**Clathrin-medierte Endozytose:** Da diese als möglicher Aufnahmemechanismus von Nanopartikeln durch Zellen beschrieben ist<sup>7</sup>, wurde untersucht, ob die Clathrin-medierte Endozytose eine entscheidende Rolle bei der zellulären Aufnahme der PFCs und PLGA-NPs spielt. Zu diesem Zweck wurden zu 20 µl Vollblut 10 µg Chlorpromazin (100 µg/ml in PBS) pipettiert, unmittelbar gefolgt von Zugabe der Partikel sowie vorsichtigem Vortexen. Als Negativkontrolle diente eine Probe, der kein Chlorpromazin zugesetzt worden war.

**Phagozytose:** Um eine Aussage darüber treffen zu können, welche Rolle die Phagozytose bei der zellulären Aufnahme von PFCs und PLGA-NPs spielt, wurden zu 20 µl Vollblut 10 µM Cytochalasin D (1 µl 10 mM Cytochalasin in DMSO Vorratslösung, aufgenommen in 99 µl PBS ergeben eine 100 µM Arbeitslösung) hinzupipettiert, unmittelbar gefolgt von Zugabe der Partikel sowie vorsichtigem Vortexen. Als Negativkontrolle diente eine Lösungsmittelkontrolle, der statt des Cytochalasin D 2 µl einer Lösung 1:100 DMSO in PBS zugegeben worden waren.

### • Bestimmung der Zellviabilität

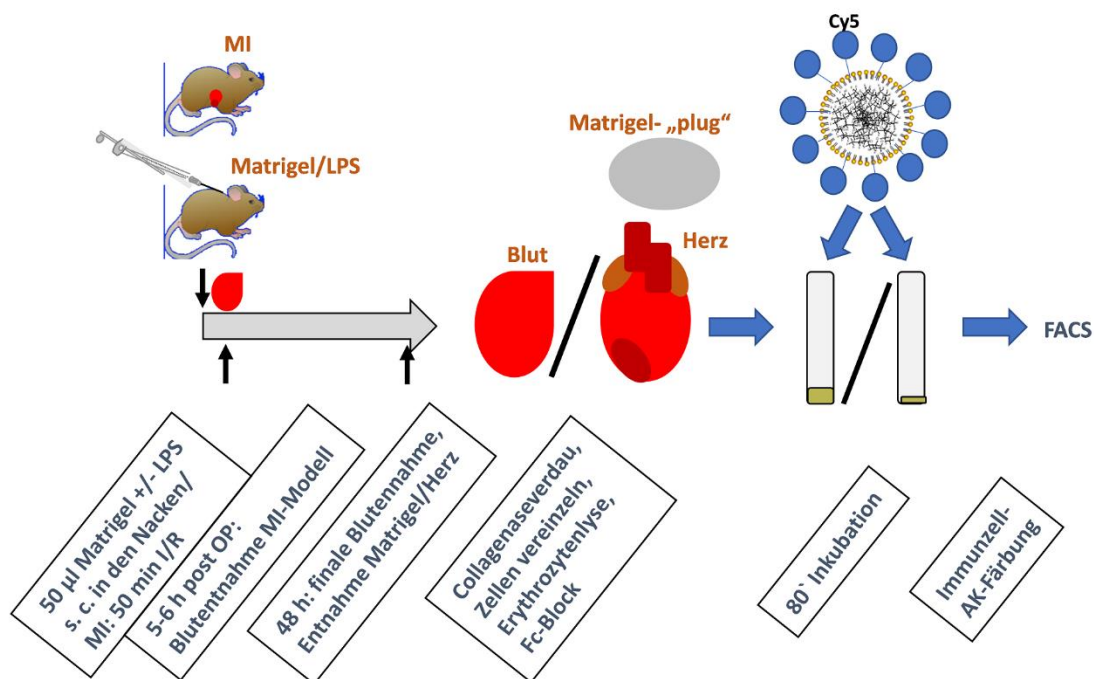
Zur Untersuchung möglicher zytotoxischer Eigenschaften der PFCs und PLGA-Nanopartikel wurde die Vitalität von primären Zellen während einer Partikelinkubation untersucht. Als Messgröße wurde die Zahl der lebenden Zellen, die zu verschiedenen Zeitpunkten mittels Durchflusszytometrie ermittelt wurde, verwendet. Hierfür erfolgte nach der Gewinnung der primären Zellen aus Blut, Milz und Leber, wie sie oben beschrieben wird eine Inkubation mit 2,5 µl sNEs/bNEs bzw. 5 µl PLGA-NPs/PLGA-NCs über 0, 5, 10, 20, 40 und 80 min, eine Antikörperfärbung der Zellsubpopulationen und schließlich eine durchflusszytometrische Untersuchung (siehe Kapitel 2.2.4) zur Quantifizierung der Zahl der lebenden Zellen.

### • PFC-Aufnahme unter entzündlichen Bedingungen

Um zu untersuchen, ob die zelluläre PFC-Aufnahme unter den Bedingungen einer sterilen oder nicht-sterilen Entzündung verändert ist, wurden aus dem Blut von Tieren mit Entzündungsherd sowie aus den Entzündungsherden selber Immunzellen isoliert wie oben beschrieben. Das Blut wurde im Falle des Myokardinfarkt (MI)-Modells 5-6 h nach der Operation aus der Schwanzvene gewonnen, sowie in beiden Modellen 48 h nach Induktion der Entzündung durch finales Entbluten. Ebenfalls 48 h nach Induktion der Entzündung wurden die Entzündungsherde entnommen. Die isolierten Immunzellen wurden für 80 min in DMEM in einem Ständer auf einer Schaukelplattform (ca. 40 rpm) im Dunkeln in einem auf 37 °C geheizten Trockenschrank mit den Partikeln inkubiert (PFCs mit einem Durchmesser

von 83 nm, die Cy5 in ihrer Lipidhülle enthielten), mit Probenahmen nach 0, 5, 10, 20, 40 und 80 min. Eine Übersicht über den Versuchsaufbau findet sich in **Abbildung 2.1**.

Da sich in explantierten Matrigel- „plugs“ ohne LPS keine Zellen nachweisen ließen, wurden als Negativkontrolle aus peripherem Blut von unbehandelten Kontrolltieren gewonnene Immunzellen verwendet. Für die Matrigel- „plugs“ ohne LPS wurden jedoch die gleichen Schritte wie für die Isolation von Immunzellen aus den Matrigel- „plugs“ mit LPS durchgeführt, ebenso wie eine Antikörperfärbung und anschließende durchflusszytometrische Analyse (siehe Kapitel 2.2.4), um die Abwesenheit von Zellen und somit einer Entzündung zu verifizieren. Für die Untersuchung der *in vitro* Partikelaufnahme durch aus Matrigel- „plugs“ gewonnene Immunzellen wurden nur Tiere verwendet, denen zuvor keine PFCs injiziert worden waren, da die injizierten PFCs ebenfalls Cy5 in ihrer Lipidhülle enthielten und durch *in vivo* Partikelaufnahme so möglicherweise die Ergebnisse verfälscht worden wären. In den Experimenten zur PFC-Aufnahme durch aus den MI-Herzen isolierte Immunzellen wurden als Negativkontrolle aus unbehandelten Kontrollherzen gewonnene Leukozyten verwendet.



**Abbildung 2.1:** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Untersuchung der Aufnahme von PFCs in primäre entzündliche Immunzellen *in vitro*. 5-6 h (Myokardinfarkt/MI) sowie 48 h (Matrigel, MI) nach Induktion der Entzündung wurde Blut entnommen und die Immunzellen aus dem Vollblut isoliert. Ebenso wurden 48 h nach Induktion der Entzündung die Matrigel- „plugs“ bzw. Herzen entnommen und die Immunzellen aus diesen isoliert. Die Immunzellen wurden dann *in vitro* über 80 min unter seriellen Probenentnahmen mit PFCs inkubiert, die einzelnen Immunzellsubpopulationen mit spezifischen Antikörpern angefärbt und durchflusszytometrische Untersuchungen zur Bestimmung der PFC-Aufnahme in die einzelnen Leukozytensubpopulationen durchgeführt.

### • *In vitro* Stimulation von primären Zellen mit LPS, CRP oder Zellkulturüberstand

Um zu untersuchen, ob eine Stimulation von primären Zellen aus dem peripheren Blut oder der Milz mit LPS/CRP eine vermehrte zelluläre Partikelaufnahme bewirkt, erfolgte eine 24 h Stimulation der Zellen mit LPS/CRP bei gleichzeitiger Inkubation mit Cy5-PFCs (PFCs mit einem Durchmesser von 83 nm). Für die 24 h Koinkubation wurden aus frischem Blut isolierte Leukozyten bzw. aus frisch entnommenen Milzen isolierte Milzzellen in 1,5 ml Reagiergefäßen für 24 h in einem Ständer auf einer Schaukelplattform (ca. 40 rpm) im Dunkeln in einem auf 37 °C geheizten Trockenschrank inkubiert, wobei den Proben 1 µg/ml LPS oder 50 µg/ml CRP zugesetzt wurden. Im Falle der murinen Milzzellen wurde zudem eine Probe mit 0,1 µg/ml LPS inkubiert. Als unstimulierte Kontrolle wurde eine Probe ohne Zusatz von LPS/CRP angesetzt. Allen Proben wurden 15 µl PFCs zugesetzt, zudem wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, der weder LPS/CRP noch PFCs zugegeben worden waren. Nach 1 h, 2 h und 24 h (0,1 µg/ml LPS: nur 24 h) wurden Proben entnommen und für durchflusszytometrische Analysen aufgearbeitet (siehe Kapitel 2.2.4).

Da bekannt ist, dass die Aktivierung von Neutrophilen durch LPS von der Gegenwart von Monozyten abhängig sein kann<sup>203,204</sup>, wurde zudem untersucht, ob Blutimmunzellen, die mit dem Zellkulturüberstand von für 24 h mit LPS stimulierten kultivierten Makrophagen inkubiert wurden eine vermehrte PFC-Aufnahme aufwiesen. Zur Gewinnung des Zellkulturüberstands stimulierter Makrophagen wurden RAW264.7 Makrophagen in einer Dichte von  $5 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  auf „6-well plates“ ausplattiert. In jedes „well“ wurde 1 ml Medium gegeben und diesem 1 µg/ml LPS zugesetzt. Zudem wurde eine unstimulierte Kontrolle angesetzt, der kein LPS zugesetzt wurde. Nach 24 h Inkubation wurde der Zellkulturüberstand abgenommen. In den Zellkulturüberständen sowohl der stimulierten als auch der unstimulierten Zellen wurden dann frisch isolierte Blutimmunzellen inkubiert, eine Positivkontrolle zudem in frischem DMEM, welches mit 1 µg/ml LPS versetzt wurde. Die Inkubation der Leukozyten erfolgte in 1,5 ml Reagiergefäßen in einem Ständer auf einer Schaukelplattform (ca. 40 rpm) im Dunkeln in einem auf 37 °C geheizten Trockenschrank, wobei den Zellsuspensionen 15 µl PFCs zugesetzt wurden. Zudem wurde pro Inkubationsbedingung eine Negativkontrolle mitgeführt, der keine PFCs zugesetzt wurden. Probennahmen mit Überführung der Proben in eine „96-well plate“, in deren „wells“ bereits 100 µl MACS Puffer vorgelegt worden waren erfolgten nach 0, 5, 10, 20, 40 und 80 min. Die Proben wurden dann für weitere durchflusszytometrische Analysen (siehe Kapitel 2.2.4) mit Antikörpern angefärbt wie oben beschrieben.

## 2.2.3 Tierexperimentelle Arbeiten

### 2.2.3.1 *Verwendete Tiere, Haltung und Handling*

Bei den für die Versuche verwendeten Tieren handelte es sich um männliche C57BL/6 Mäuse im Alter von 12-14 Wochen mit einem Gewicht von 20-30 g. Die Tiere wurden von Janvier bezogen und in der

Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter Standardbedingungen (Eurostandard Typ I SL Käfig, Standarddeinstreu, Standarddiät und Wasser ad libitum) gehalten. Für die Versuche wurden die Tiere in einer speziell dafür vorgesehenen Transportbox in das Institut für Molekulare Kardiologie gebracht. Zwischen den Messungen an einem Tag wurde den Tieren, um ein Auskühlen beim Aufwachen aus der Narkose zu verhindern eine Infrarotlampe als Wärmequelle zur Verfügung gestellt. Zwischen Messungen an verschiedenen Tagen wurden die Versuchstiere in einem Tierhaltungsschrank des Institutes für Herz-Kreislauf-Physiologie bei 22 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 48 % gehalten oder zurück in die Räumlichkeiten der ZETT transportiert. Nach der letzten MRT-Messung wurden die Tiere in den Räumlichkeiten des Instituts für Molekulare Kardiologie schmerzfrei getötet. Die tierexperimentellen Tätigkeiten waren unter dem Aktenzeichen 81-02.04.2018.A007 vom Landesamt für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz (LANUV) genehmigt.

### 2.2.3.2 Intravenöse Injektion von PFCs bzw. PLGA-NPs

Um *in vivo* die Akkumulation von PFCs und PLGA-NPs in Geweben sowie die Aufnahme in Immunzellen untersuchen zu können, wurde den Tieren zum Zeitpunkt 0 h ein Volumen von insgesamt 50 µl körperlwarmer PFCs oder PLGA-NPs in die seitliche Schwanzvene injiziert. Es wurden identische Volumina mit gleichem <sup>19</sup>F-Gehalt für beide Arten von Substanzen verwendet. Hierfür mussten die PFCs zunächst verdünnt werden, indem 100 µl sNEs bzw. bNEs in 300 µl Phosphatpuffer aufgenommen wurden. Dies erfolgte für die Versuche, in denen das <sup>19</sup>F-Signal in Blut, Milz und Leber untersucht wurde. Für die Messung des <sup>19</sup>F-Signals in Knochenmark und Lymphknoten wurde die Emulsion hingegen unverdünnt eingesetzt. Die PLGA-NPs, welche in lyophilisiertem Zustand geliefert und in diesem Zustand bei -20 °C gelagert wurden (Bezug von der AG Srinivas, RadboudUMC, Nijmegen, Niederlande), wurden für alle Versuche unmittelbar vor der Injektion in einer Menge von 20 mg in 400 µl Phosphatpuffer resuspendiert.

Die PFCs bzw. die PLGA-NP Suspension wurden den Mäusen über die seitliche Schwanzvene verabreicht. Hierfür wurden die Tiere in Narkose gelegt. Die Einleitung der Narkose erfolgte mit 2-3 % Isofluran in 60 % N<sub>2</sub> und 25 % O<sub>2</sub> in einer luftgefluteten Narkosekammer, die Aufrechterhaltung über eine Nasenmaske (1-2 % Isofluran in 0,05 l/min Druckluft). Um ein Auskühlen der Tiere zu verhindern, wurden diese während der Narkose auf einer Wärmeplatte (39 °C) gelagert.

Vor der i. v. Injektion wurde zunächst der Schwanz erwärmt, um eine Weitstellung der Gefäße zu erzielen. Hierfür wurde der Schwanz für mehrere Minuten auf der Wärmeplatte fixiert. Das Tier wurde in Seitenlage verbracht und so positioniert, dass die Schwanzwurzel an der dem Experimentator zugewandten Kante der Wärmeplatte zu liegen kam. Die Hinterbeine und die Schwanzwurzel wurden mit

Klebeband an der Wärmeplatte festgeklebt, um ein Verrutschen des Tieres zu verhindern und die Applikation eines leichten Zuges auf den Schwanz zu ermöglichen. Die U-100 Insulinspritze wurde kurz oberhalb der Kanüle zwischen Daumen und Zeigefinger gefasst, da so ein geschicktes Manipulieren der Kanüle möglich war. Sie wurde vorsichtig parallel zum über den Zeigefinger der anderen Hand gebogenen Schwanz in die seitliche Schwanzvene eingestochen und leicht vorgeschoben, dann wurde umgegriffen, die Kanüle mit der den Schwanz haltenden Hand fixiert und langsam die Substanz i. v. appliziert. Die korrekte Positionierung der Kanüle im Gefäß ließ sich an der leichten Applizierbarkeit der Substanz erkennen. Bei fehlerhafter Positionierung der Kanüle, möglicherweise im *subkutanen* Gewebe war hingegen ein Widerstand zu spüren und das Areal um die Einstichstelle färbte sich gegebenenfalls weiß und schwellt leicht an.

### 2.2.3.3 Blutentnahme aus der Schwanzvene und Vena cava caudalis sowie Organentnahmen

Für die Entnahme geringer Blutmengen wurden die Mäuse in einer Zwangsröhre fixiert. Mit einer Präparierschere wurde die unterste Spitze des Schwanzes gekappt. Durch wiederholtes vorsichtiges Ausstreichen des Schwanzes von der Wurzel bis zur Spitze wurden 40 µl Blut in eine mit EDTA beschichtete Microvette entnommen. Die Tiere wurden danach wieder in ihren Käfig gesetzt. Das Blut wurde durch Ausblasen der Microvette mittels einer 1 ml Plastik-Pasteurpipette in ein 1,5 ml Reagiergefäß überführt.

Wenn größere Mengen Blut benötigt wurden, wurde dieses aus der *V. cava caudalis* der frisch euthanasierten, antikoagulierten Maus gewonnen. Für die Euthanasie wurde das Tier in einer mit 5 % Isofluran gefluteten Narkosekammer narkotisiert, dann wurden ihm in Narkose je 400 µl verdünntes Heparin-Natrium (1:50 in PBS, d. h. 100 U/ml) sowie verdünntes Pentobarbital-Natrium (1:30 in PBS, d. h. 10 mg/ml) unter Verwendung von U-100 Insulinspritzen i. p. injiziert. Wenn das Tier tot war – Aussetzen der Atmung, fehlende Zwischenzehenreaktion, fehlender Cornealreflex – wurde es in Rückenlage mit Kanülen (21 G) auf einer mit Aluminiumfolie überzogenen Styroporplatte fixiert. Die Haare am Bauch wurden mit 70 % Ethanol befeuchtet und die Bauchhöhle mit einer Präparierschere und gebogenen Pinzette von *caudal* nach *cranial* in der *Medianen*, unter Durchtrennung von Haut, Muskelschicht und Peritoneum eröffnet. Um einen leichteren Zugang zum Inneren des Bauchraums zu erhalten, wurden *cranial* und *caudal* Entlastungsschnitte in Richtung der Vorder- und Hinterbeine durchgeführt, die freie Bauchdecke wurde zur Seite gelagert. Nach Eröffnen der Bauchdecke wurden mit Hilfe eines Wattestäbchens die Eingeweide nach links verlagert, so dass die *V. cava caudalis* frei lag. Diese wurde mit einer zuvor mehrfach mit Heparin-Natrium durchgespülten Butterflykanüle mit Zuleitung, auf die eine U-40 Einmal-Insulinspritze aufgesetzt worden war, punktiert. Durch vorsichtige Aspiration wurden ca. 400 µl Blut gewonnen, welche nach der Entnahme zunächst auf Eis gelagert wurden. Nach dem Entbluten der Tiere wurden gegebenenfalls weitere Organe (Milz, Leber) entnommen.

### 2.2.3.4 Entzündungsmodelle

Zur Untersuchung des Einflusses steriler und nicht-steriler Entzündungsprozesse auf die zelluläre Aufnahme und Gewebeverteilung von PFCs wurde den Tieren entweder mit LPS versetztes Matrigel™ s. c. in den Nacken implantiert, oder operativ eine kardiale Ischämie mit anschließender Reperfusion induziert. Die Eingriffe werden im Folgenden beschrieben.

#### • Subkutane Implantation von Matrigel™

Um eine bakterielle Entzündung zu imitieren, wurde mit LPS vermisches Matrigel *subkutan* in den Nacken von Mäusen implantiert. Bei Matrigel handelt es sich um eine Lösung von Basalmembranbestandteilen, welche aus dem murinen Engelbret-Holm-Swarm (EHS) Sarkom gewonnen wird. Diese Lösung ist reich an Proteinen der extrazellulären Matrix, wie Laminin, Kollagen IV, Heparansulfat, Proteoglykanen und einer Reihe von Wachstumsfaktoren<sup>205</sup>. Die Lösung ist bei 4 °C flüssig, wird bei Körpertemperatur jedoch gelartig. Die Implantation des Matrigels erfolgte an Tag -1 des Versuchs. Während der Implantation befanden sich die Tiere in Narkose, welche mit 2-3 % Isofluran in 60 % N<sub>2</sub> und 25 % O<sub>2</sub> in einer luftgefluteten Narkosekammer eingeleitet und dann mit 1-2 % Isofluran in 0,05 l/min Druckluft, appliziert über eine Nasenmaske aufrechterhalten wurde. Um ein Auskühlen zu verhindern, wurden die Tiere während des Eingriffs in Bauchlage auf einer auf 39 °C erwärmten Wärmeplatte gelagert.

Für die Implantation wurde das Fell im Nacken der Tiere geschoren, wobei die Tiere vorsichtig gestreckt und die Vorderbeine seitlich neben dem Körper positioniert wurden. Im Anschluss wurde die geschorene Haut desinfiziert. 100 µl des Matrigels, welches vor der Implantation auf Eis gelagert wurde, um ein vorzeitiges Aushärten zu verhindern, wurden vorsichtig, unter Vermeidung von Luftblasen in einem PCR-Reagiergefäß mit 1 µg/µl LPS von *Salmonella typhimurium* vermischt. Die verwendete Konzentration des LPS wurde entsprechend vorangegangener Arbeiten von Temme et al. gewählt<sup>170</sup>. Für die Implantation wurden die 100 µl Matrigel – mit oder, im Falle der Kontrollgruppe ohne LPS, in eine U-100 Insulinspritze aufgenommen, die, um eine leichte Erwärmung des Gels vor der Implantation zu erzielen, mehrfach zwischen den Fingerspitzen gerollt wurde. Für die Implantation wurde die Haut im Nacken mit einer gebogenen Pinzette gefasst und angehoben, dann wurde die Kanüle der mit Matrigel befüllten U-100 Insulinspritzen vorsichtig *subkutan*, parallel zum Körper von *caudal* nach *cranial* bis kurz hinter den Schädelknochen vorgeschoben. War die Kanüle korrekt positioniert, wurde sie unmittelbar *cranial* der Einstichstelle mitsamt der Haut mit der Pinzette umfasst, um während der Injektion ein Austreten des Matrigels durch den Stichkanal zu verhindern. Es wurden langsam 50 µl des Matrigels appliziert, so dass sich die Substanz bereits während der Injektion verfestigen konnte, ohne zu verlaufen und sich schließlich im Nacken eine Kugel aus Matrigel bildete (Matrigel- „plug“). Kanüle und Pinzette wurden noch einige Sekunden über die Injektion hinaus in Position belassen, um ein weiteres *subkutanes* Verteilen der Substanz zu verhindern.



Es wurden zwei Versuchsgruppen gebildet. Einer Gruppe wurden 24 h nach Implantation des Matrigel-„plugs“ Cy5-PFCs injiziert (PFCs mit einem Durchmesser von 83 nm), diese Gruppe wurde für die <sup>19</sup>F-MRT Bildgebung verwendet. Die zweite Gruppe wurde für die *in vitro* Partikel Aufnahmeversuche verwendet, hier wurden lediglich an Tag 2 Blut und Matrigel-„plug“ entnommen, ohne zuvor PFCs zu injizieren.

### • Ischämie-Reperfusion des Herzens

Als Modell für eine sterile Entzündung wurde das Myokardinfarkt (MI)-Modell verwendet. Hier erfolgte an Tag -1 eine Ischämie/Reperfusion-Operation. Die Eingriffe wurden von Herrn Dr. Zhaoping Ding, Institut für Molekulare Kardiologie durchgeführt. Für die Operation wurden die Mäuse mittels Isofluran anästhesiert, die Einleitung der Narkose erfolgte in einer luftgefluteten Narkosekammer mit 5 % Isofluran, die Aufrechterhaltung der Narkose mittels einer Atemmaske mit 1,5 % Isofluran in 50 ml/min O<sub>2</sub>. Während der Narkose wurden die Tiere auf einer Wärmeplatte gelagert, um ein Auskühlen zu verhindern. Die Körpertemperatur der Tiere wurde hierbei kontinuierlich über ein Rektalthermometer kontrolliert. Zum Schutz der *Cornea* wurde den Tieren Augensalbe appliziert. Der Thoraxbereich wurde enthaart (Enthaarungscreme, ca. 5 min), gesäubert und desinfiziert. Dann wurde der *Thorax* mittels eines *medialen* Schnitts entlang der linken Seite des *Sternums* eröffnet und die LAD (engl.: *left anterior descending artery*) mittels 6/0 Polypropylen-Nahtmaterial ligiert. Nach 50 min wurde die Okklusion wieder gelöst. „Sham“-Tiere wurden identisch operiert, nur dass bei diesen der Faden um die LAD nicht verschlossen wurde. Der Thorax wurde abschließend mit zweischichtiger Wundnaht wieder verschlossen. Zur Analgesie wurde Buprenorphin eine halbe Stunde vor OP (0,3 mg/kg; 50 µl: 24,9 µl Buprenorphin - 0,3 mg/ml - und 25,1 µl NaCl) und postoperativ (bis Tag 2, 3x täglich 0,1 mg/kg Buprenorphin; 50 µl: 8,3 µl Buprenorphin und 41,7 µl NaCl) s. c. injiziert.

### Entnahme der Entzündungsherde

Für die Untersuchung der zellulären Partikel Aufnahme unter entzündlichen Bedingungen wurden, neben Blutzellen Zellen direkt aus den Entzündungsherden gewonnen. Für die Explantation des Matrigel-„plugs“ wurde das getötete Tier in Bauchlage verbracht und die Nackenhaut nach Befeuchtung mit Alkohol in der *Medianen* eröffnet. Unter vorsichtigem *subkutanem* Vorpräparieren nach *cranial* wurde der Matrigel-„plug“ aufgesucht. Dieser befand sich als farblose, gelartige, scheibenförmige Struktur auf den Nackenmuskeln, zum Teil war er etwas verlaufen, in der Gruppe mit LPS war er häufig mit den darunter liegenden Muskeln und der darüber liegenden Haut verwachsen. Der Matrigel-„plug“ wurde vorsichtig von den umgebenden Gewebeschichten abgelöst, um für eine Gewinnung möglichst vieler Zellen aus dem „plug“ ein Maximum an Material zurückzugewinnen.

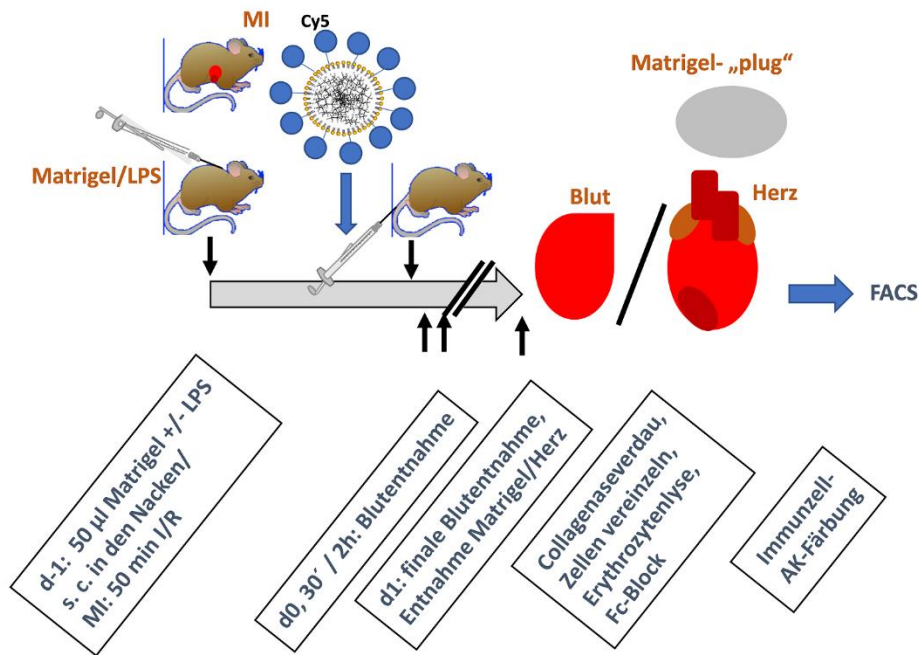
Für die Entnahme des Herzens verblieben die Tiere nach Entbluten in Rückenlage. Durch *craniale* Erweiterung des *medianen* Schnittes durch die Schichten der Bauchwand wurde unter Durchtrennung

des Zwerchfells der Brustkorb eröffnet. Mit einer Schere wurden die Rippenbögen abgesetzt, um Lunge und Herz zu exponieren, und diese dann vorsichtig, noch im Verband mit der Pinzette angehoben, an der Aorta abgesetzt und in eine Schale mit eisgekühltem PBS überführt. Hier erfolgte eine vorsichtige Trennung des Lungengewebes vom Herzen.

### • PFC-Aufnahme unter entzündlichen Bedingungen

Nach der Induktion der Entzündung wurde untersucht, ob das Vorliegen einer sterilen oder nicht-sterilen Entzündung die PFC-Aufnahme in Immunzellen verändert. Hierfür wurden die Tiere 48 h nach Induktion einer Entzündung, im Anschluss an die letzte MRT-Messung schmerzlos in Narkose getötet. Es erfolgte finales Entbluten, und im Matrigel/LPS-Modell wurden die Matrigel- „plugs“ bzw. im MI-Modell die Herzen entnommen (s. o.). Darüber hinaus wurden im MI-Modell 5-6 h nach der Ischämie/Reperfusion-OP 40 µl Blut aus der Schwanzspitze entnommen.

Da in der Phospholipid-Hülle der PFCs ein Fluorophor enthalten war, war es möglich, nach i. v. Injektion der Partikel die *in vivo* erfolgte zelluläre PFC-Aufnahme mittels Durchflusszytometrie (siehe Kapitel 2.2.4) zu untersuchen. Hierfür wurden den Tieren 30 min und 2 h nach der Partikelinjektion 40 µl Blut aus der Schwanzspitze entnommen sowie Blut untersucht, welches bei finalem Entbluten 24 h (für das Matrigel/LPS-Modell einmal stattdessen 48 h) nach der Injektion der PFCs gewonnen wurde. Darüber hinaus wurden auch in diesem Versuchsteil die Entzündungsherde (Matrigel- „plugs“ bzw. Herzen) entnommen. Als Negativkontrolle dienten Blutimmunzellen bzw. aus dem Matrigel- „plug“ oder Herzen gewonnene Zellen, welche 48 h nach Induktion der Entzündung aus Tieren gewonnen wurden, denen keine Partikel injiziert worden waren. Der Versuchsaufbau wird in **Abbildung 2.2** dargestellt.



**Abbildung 2.2:** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Untersuchung der Aufnahme von PFCs in primäre entzündliche Immunzellen *in vivo*. 24 h nach Induktion der Entzündung wurden den Tieren Cy5-PFCs in die seitliche Schwanzvene injiziert. 30 min, 2 h und 24 h nach Partikelinjektion wurde Blut entnommen; 24 h nach Partikelinjektion wurden zudem die Matrigel- „plugs“ bzw. Herzen entnommen und die Immunzellen aus diesen isoliert. Die Immunzellsubpopulationen wurden mit spezifischen Antikörpern angefärbt und durchflusszytometrische Untersuchungen zur Bestimmung der PFC-Aufnahme durch die einzelnen Immunzellsubpopulationen durchgeführt.

## 2.2.4 Durchflusszytometrie

In verschiedenen in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurde mittels Durchflusszytometrie die zelluläre Aufnahme von PFCs, die Fluorophore in ihrer Phospholipidhülle enthielten bestimmt. Mithilfe von Antikörpern wurden verschiedene Zellsubpopulationen primärer Zellen identifiziert und anhand einer Lebend/Tot-Färbung die Vitalität von mit Partikeln inkubierten Zellen untersucht. Die durchflusszytometrischen Messungen erfolgten an einem BD FACSCanto II Durchflusszytometer, welches drei Laser (blau: 488 nm, luftgekühlt, 20 mW solide state; rot: 633 nm, 17 mW HeNe; violett: 405 nm, 30 mW solid state) besaß und acht Kanäle unterscheiden konnte. Das Gerät wurde mit FACSDiva Software betrieben.

### 2.2.4.1 Kompensation

Vor der ersten Messung mit verschiedenen Antikörpern angefärbter Zellen muss eine Kompensation durchgeführt werden, um Überlappungen der Spektren der verschiedenen Fluorochrome rechnerisch korrigieren zu können. Hierfür wurden in der vorliegenden Studie „BD comp beads“ verwendet. Von diesen „beads“ gibt es negative („anti-rat / anti-hamster Ig, κ“) und positive „beads“ („anti-mouse Ig, κ“), die die Antikörper jeweils nicht binden bzw. binden. Es wurde ein Ansatz pro Antikörper vorbereitet: Zu 200 µl MACS-Puffer wurde je ein Tropfen negativer und positiver „comp beads“ gegeben, dazu der jeweilige Antikörper in 1:100 Verdünnung bzw. 1 µg/ml 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI).

Zunächst wurden Vorwärtsstreulicht („forward scatter“, FSC) und Seitenstreulicht („side scatter“, SSC) so eingestellt, dass die Punktwolke der „beads“ in einem FSC vs. SSC „dot plot“ jeweils ca. bei 100K zu liegen kam. Diese Population wurde manuell als Fenster 1 eingekreist. Durch die Verwendung von negativen und positiven „beads“ bildeten sich in den Fluorophor vs. SSC „dot plots“ zwei Populationen, eine negative und eine positive. Mit Hilfe des Histogramms für das jeweilige Fluorophor wurde die Laserstärke so eingestellt, dass sich zwei klar voneinander abgegrenzte Gipfel darstellten, von denen der negative unter  $10^2$  lag und der positive entsprechend über  $10^2$ . Hierbei musste beachtet werden, dass DAPI alle „beads“ anfärbt und zudem eine sehr starke Fluoreszenz aufweist, so dass hier nur ein Gipfel zu sehen war, der zudem deutlich über  $10^2$  lag. Die Einstellungen wurden für jedes verwendete Fluorophor sowie für DAPI einzeln durchgeführt. Nach Abschluss aller Lasereinstellungen wurden pro Fluorophor jeweils 5000 Ereignisse aufgezeichnet. Daraufhin wurde eine automatische Kompensation durchgeführt, bei der durch das Programm aus den aufgezeichneten Daten die spektrale Überlappung der einzelnen Kanäle berechnet wurde, so dass diese in der Folge automatisch rechnerisch kompensiert werden konnte. Die Aufzeichnungen selber werden von einer solchen Kompensation jedoch nicht beeinflusst, d. h., es ist nach Datenaufzeichnung immer möglich, die Werte noch einmal manuell zu verändern.

Die hier erfolgten Einstellungen der Laser, von denen für FSC und SSC abgesehen, wurden für alle in der Folge durchgeführten Messungen beibehalten. Die Einstellungen für FSC und SSC mussten für die Zellen noch einmal durchgeführt werden, da diese eine andere Größe besaßen als die „beads“. Die Kompensation wurde hingegen variiert, wenn sich in den einzelnen Messreihen durch die Färbung bedingte Unterschiede ergaben.

### **2.2.4.2 Vorbereitung der Messungen und Fenstersetzung**

Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellpellets in 200  $\mu$ l (kultivierte Zellen, primäre Zellen aus Milz und Leber) bzw. 100  $\mu$ l (Blutimmunzellen, Immunzellen aus Entzündungsherden) MACS-Puffer mit 1  $\mu$ g/ml DAPI aufgenommen. Die primären Zellen wurden unmittelbar vor den Messungen aus der „96-well plate“ in FACS-Röhrchen überführt, die bis zur Messung auf Eis im Dunkeln gelagert wurden. Vor den Messungen wurden die Röhrchen gründlich gevortext.

Die Einstellungen für FSC und SSC, das Setzen der Fenster für die Lebend-Tot Färbung sowie gegebenenfalls die für Zellsubpopulationen wurden jeweils an Zeitpunkt Null-Proben vorgenommen. Die Lasereinstellungen für FSC und SSC wurden für eine Zelllinie bzw. für primäre Zellen aus Blut, Milz oder Leber einmal durchgeführt und dann für alle folgenden Messungen beibehalten, während die Fenster einmal pro Messreihe gesetzt und dann innerhalb der jeweiligen Messreihe nicht mehr verändert wurden. Die Position der Fenster konnte sich zwischen den Messreihen aufgrund leichter Variationen zwischen den Zellen etwas unterscheiden. FSC und SSC wurden so eingestellt, dass die interessierende,

im Folgenden eingegrenzte Population bei jeweils ca. 100K zu liegen kam. Um den auf der linken Seite dieses Plots liegenden Zelldebris auszuschließen, wurde der Schwellenwert auf 35K gesetzt. Mithilfe der DAPI-Färbung, die nur tote Zellen anfärbt, wurden anschließend die toten Zellen (DAPI+ Zellen) ausgegrenzt, so dass sämtliche weitere Untersuchungen nur noch an den lebenden Zellen erfolgten.

Zur Unterscheidung der einzelnen Leukozytensubpopulationen wurden die Streulichteigenschaften (insbesondere SSC) eingesetzt und die Zellen zudem mit spezifischen Antikörpern angefärbt. Die Population der CD45+ Zellen umfasst alle Leukozyten. Innerhalb dieser Population können mittels CD11b/SSC die CD11b+ Monozyten („SSC-low“) und Neutrophilen („SSC-high“) unterschieden werden. Darüber hinaus können CD11b-negative Lymphozyten, die zudem „SSC-low“ sind, identifiziert werden. Die Lymphozyten können anhand der Expression von CD3 (T-Zellen) und CD19 (B-Zellen) weiter spezifiziert werden. Für die aus der Milz gewonnenen Zellen wurde die gleiche Kombination von Antikörpern verwendet wie für die aus Blut gewonnenen Immunzellen. Bei den aus der Leber gewonnenen Zellen entfielen die spezifischen Färbungen der Lymphozytensubpopulationen. Stattdessen wurden zusätzlich zu den Leukozyten die Endothelzellen (CD31+) und die Kupferzellen (F4/80+) angefärbt. Die restlichen Zellen der Leber, die den Großteil ausmachten, aber für keinen der verwendeten Antikörper positiv waren, wurden den *Hepatozyten* zugeordnet.

### 2.2.4.3 Analyse der zellulären Partikelaufnahme

Um die zelluläre Partikelaufnahme bestimmen zu können, wurden zunächst die Laser in der Kompensation oder in der ersten Messung an kultivierten Zelllinien so eingestellt, dass im APC-Kanal, in dem sowohl Cy5 als auch Atto647 gemessen werden, die Fluoreszenz der negativen Zellen im Fluorophor vs. SSC „plot“ unter  $10^2$  AU zu liegen kam. Für die mit Antikörpern angefärbten primären Zellen wurde für jede der Zellsubpopulationen ein entsprechender „dot plot“ mit APC vs. SSC angelegt, um die Partikelaufnahme für jede einzelne Zellsubpopulationen bestimmen zu können. Mithilfe des Freihand-Werkzeugs wurden dann für jede Messreihe im APC-Kanal anhand einer nicht mit Partikeln inkubierten Negativkontrolle alle rechts der negativen Population liegenden Zellen selektiert. Für die mit den Partikeln inkubierten Proben wurde der Prozentsatz der für das Fluorochrom positiven Zellen sowie die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) aller in der jeweiligen Probe gemessenen Zellen in diesem Kanal bestimmt. Dies erfolgte für jede Zellsubpopulation separat. Für die Auswertung wurde der jeweilige Wert der Zeitpunkt Null-Probe von den Werten der Proben zu den einzelnen Messzeitpunkten subtrahiert. Während für die Messungen und einen ersten Überblick die Fenster bereits in der FACSDiva Software gesetzt wurden, erfolgte die endgültige Analyse der Daten mit FlowJo Software.

### 2.2.4.4 *Untersuchung zytotoxischer Effekte mittels Durchflusszytometrie*

Um Hinweise auf mögliche akute zytotoxische Effekte der verwendeten PFCs und PLGA-Nanopartikel zu erhalten, wurde in den über 80 min mit den Partikeln inkubierten Zellen (kultivierte Zelllinien, Bluttimmuszellen, primäre Zellen aus Milz und Leber) in jeder gemessenen Probe der Prozentsatz an lebenden Zellen (DAPI-) bestimmt. Für jede der Behandlungen wurde aus sämtlichen erfolgten Messreihen für jeden Messzeitpunkt der Mittelwert gebildet und dieser auf den auf 100 % gesetzten Zeitpunkt Null der entsprechenden Behandlung normiert. Die einzelnen Messzeitpunkte für jede Behandlung wurden in Relation zu einer unbehandelten Negativkontrolle betrachtet.

### 2.2.4.5 *Durchflusszytometrische Analyse der PFC-Aufnahme unter entzündlichen Bedingungen*

Um die Zusammensetzung der direkt aus den Entzündungsherden (Matrigel- „plug“, Herz) stammenden Zellpopulationen zu bestimmen, wurde der prozentuale Anteil der verschiedenen Leukozytensubpopulationen ermittelt. Des Weiteren wurde untersucht, ob das Vorliegen einer sterilen oder nicht-sterilen Entzündung die PFC-Aufnahme in Immunzellen verändert. Hierfür wurde die MFI der einzelnen Leukozytensubpopulationen im APC-Kanal bestimmt. Dies erfolgte sowohl für die *in vitro* mit PFCs inkubierten Zellen als auch für die Immunzellen, welche *in vivo* durch i. v. Injektion Cy5 enthaltender PFCs markiert worden waren.

## 2.2.5 Mikroskopische Techniken

### 2.2.5.1 *Phasenkontrastmikroskopie*

Die Konfluenz der Zellkulturen wurde mittels Phasenkontrastmikroskopie an einem inversen Mikroskop beurteilt. Das gleiche Mikroskop wurde für die Beurteilung möglicher zytotoxischer Effekte einer Partikelinkubation der Zellkulturen für eine Dauer von 24 h verwendet, wobei hier die Morphologie der Zellen und die Zellzahl untersucht wurden. Zudem wurden mittels eines inversen Zeiss Axio Vert A1 Mikroskops und einer Zeiss AxioCam ICm1 Digitalkamera über die ZEN Blue edition Software Fotos der für 24 h mit Partikeln inkubierten Zellkulturen in 40x Vergrößerung angefertigt, um die Beobachtungen zu dokumentieren.

### 2.2.5.2 *Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Nanopartikeln mittels Konfokalmikroskopie*

Um beurteilen zu können, ob PFCs und PLGA-NPs von Zellen aufgenommen werden oder nur deren Oberfläche anhaften, wurde mittels konfokalmikroskopischer Untersuchungen die subzelluläre Lokalisation der Partikel in CHO Zellen untersucht. Zu diesem Zweck wurden CHO Zellen in „24-well plates“, in deren „wells“ zuvor autoklavierte runde Deckgläser gelegt wurden, in einer Dichte von  $5 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  in 1 ml Medium für Zellkulturen pro „well“ ausplattiert. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen und die Zellen für 90 min mit 200  $\mu$ l Medium für Zellkulturen mit 15  $\mu$ l/ml sNEs oder bNEs bzw. 30  $\mu$ l/ml PLGA-NPs bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde das Medium

abgesaugt, die Zellen 3x in eiskaltem PBS gewaschen, für 10 min bei 4 °C im Dunkeln mit PFA fixiert und erneut 3x mit PBS gewaschen. Anschließend wurden eine Zellmembran- und eine Kernfärbung durchgeführt. Für die Färbung wurde das PBS abgesaugt, dann wurden die Zellen in den „wells“ mit 1 µg/ml „wheat germ agglutinin (WGA), Alexa Fluor™ 488 conjugate“ in 200 µl PBS bedeckt, mit dem sie für 10 min auf Eis im Dunkeln inkubiert wurden. Bei WGA („wheat germ agglutinin“) handelt es sich um ein Lecithin, das an Glykokonjugate bindet und sich daher für die Darstellung der Zellmembran eignet. Die Zellen wurden daraufhin 3x mit eiskaltem PBS gewaschen, danach mit 1 µg/ml DAPI in 200 µl PBS angefärbt, mit dem sie für weitere 10 min auf Eis im Dunkeln inkubiert wurden. Nach erneutem 3x Waschen mit eiskaltem PBS wurden die Deckgläser mithilfe einer spitzen geraden Pinzette und einer Kanüle (23 G) mit umgebogener Spitze aus den „wells“ entnommen, auf den Rand eines Objektträgers gelegt, mit einem Tropfen Mowiol-Lösung bedeckt und dann umgedreht auf den Objektträger geklebt.

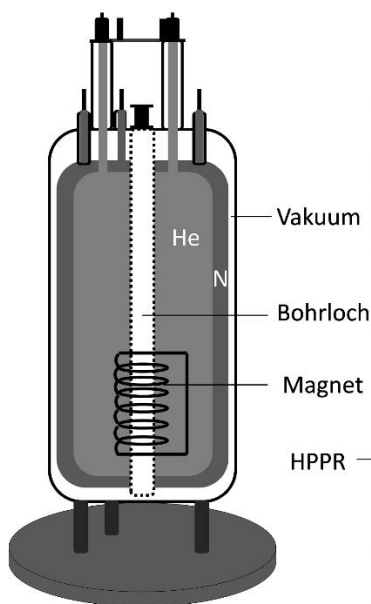
Die konfokalmikroskopischen Untersuchungen erfolgten an einem inversen Zeiss LSM 710 Konfokalmikroskop, welches vom Center for Advanced Imaging (Cai), einer „core facility“ der HHU zur Verfügung gestellt wurde. Die verwendeten Laser waren ein 458 nm, 488 nm, 514 nm „multi-line“ Argonlaser, ein 543 nm HeNe-Laser und ein 633 nm HeNe Laser. Am Konfokalmikroskop wurde mit einem 40x air / NA 0,95 Objektiv zunächst mittels Weitfeldmikroskopie auf die Zellkerne fokussiert, dann wurde, ausgehend von dieser Fokusebene mittels konfokalmikroskopischer Aufnahme in Echtzeit zunächst auf die Zellkerne, dann auf die mittels WGA angefärbten Zellmembranen fokussiert. Aufnahmen wurden an Stellen angefertigt, an denen die Zellen nicht zu dicht zusammen lagen, so dass Einzelzellen dargestellt werden konnten. Die Einstellungen der Laser wurden so gewählt, dass *Exzitation* und *Emission* der drei Laserlinien möglichst nicht überlappten. Es wurden ortsgleiche Aufnahmen aller drei Farben angefertigt, so dass man drei überlagerte Bilder erhielt, die die Zellmembran (WGA), den Zellkern (DAPI) und die Fluorochrome (Cy5 bzw. Atto647) darstellten. Als Falschfarben wurden für das WGA grün, für die DAPI Kernfärbung blau und für die Fluorophore rosa gewählt.

### 2.2.6 Kombinierte $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ Magnetresonanztomografie (MRT)

#### • Aufbau und Bestandteile des MRT-Gerätes

Die Bestandteile eines Kernspintomografen sind das Magnetsystem (A., **Abbildung 2.3**), die Konsole (B.) und der Prozessrechner (C.). **A.** Das Magnetsystem besteht zum einen aus einem Grundfeldmagnet, welcher sich aus einem System konzentrisch angeordneter Spulen aufbaut, die das Hauptmagnetfeld erzeugen. Ab einer Feldstärke von 0,3 T werden supraleitende Magnete eingesetzt, die durch flüssiges Helium und flüssigen Stickstoff gekühlt werden müssen. Die zentrale Säule des Magnetsystems, welche vom Helium- und Stickstofftank umgeben ist wird als magnetisches „bore“ (Bohrloch) bezeichnet<sup>8,10,11</sup>. Zum Magnetsystem gehören des Weiteren Vorverstärker, welche das Signal zur Probe übermitteln und die relativ schwachen Signale verstärken, welche von der Probe emittiert werden<sup>11</sup>. In das

untere Ende des Magneten ist ein „shim“-System eingelagert, welches der Optimierung der Feldhomogenität dient<sup>10</sup>.



**Abbildung 2.3: Aufbau des Grundfeldmagneten.** Links: Schematische Darstellung. Ein System konzentrisch angeordneter Spulen erzeugt das Hauptmagnetfeld. Die Kühlung des supraleitenden Magneten erfolgt mit flüssigem Helium und Stickstoff. Die zentrale Säule wird als magnetisches „bore“ (Bohrloch) bezeichnet. Modifiziert nach<sup>11</sup>. Rechts: Fotografie des Systems des Instituts für Molekulare Kardiologie, HHU Düsseldorf. Links neben dem Grundfeldmagneten sieht man den ebenfalls zum Magnetsystem gehörenden Vorverstärker (HPPR).

Das Hochfrequenzsystem wiederum besteht einerseits aus einem leistungsstarken Hochfrequenzsender, andererseits aus einem hochempfindlichen Empfänger. Die Hochfrequenzspule dient der Einstrahlung des Impulses und dem Empfang des erzeugten Signals. Die Spule sollte so nahe wie möglich an der zu untersuchenden Körperregion positioniert sein, da nur so ein ausreichend starkes Signal erzeugt und empfangen werden kann<sup>10</sup>.

Das Gradientensystem besteht aus einem System von Gradientenspulen für jede der drei Raumrichtungen (X, Y, Z). Das Ein- und Ausschalten der Gradientenspulen ist mit dem Auftreten elektrischer Wechselfelder verbunden und verursacht die typischen Geräusche während der Messungen. Das Isozentrum bzw. Zentrum des Magneten ist der Punkt, an dem keine der drei Gradientenspulen ein magnetisches Zusatzfeld erzeugt<sup>10</sup>.

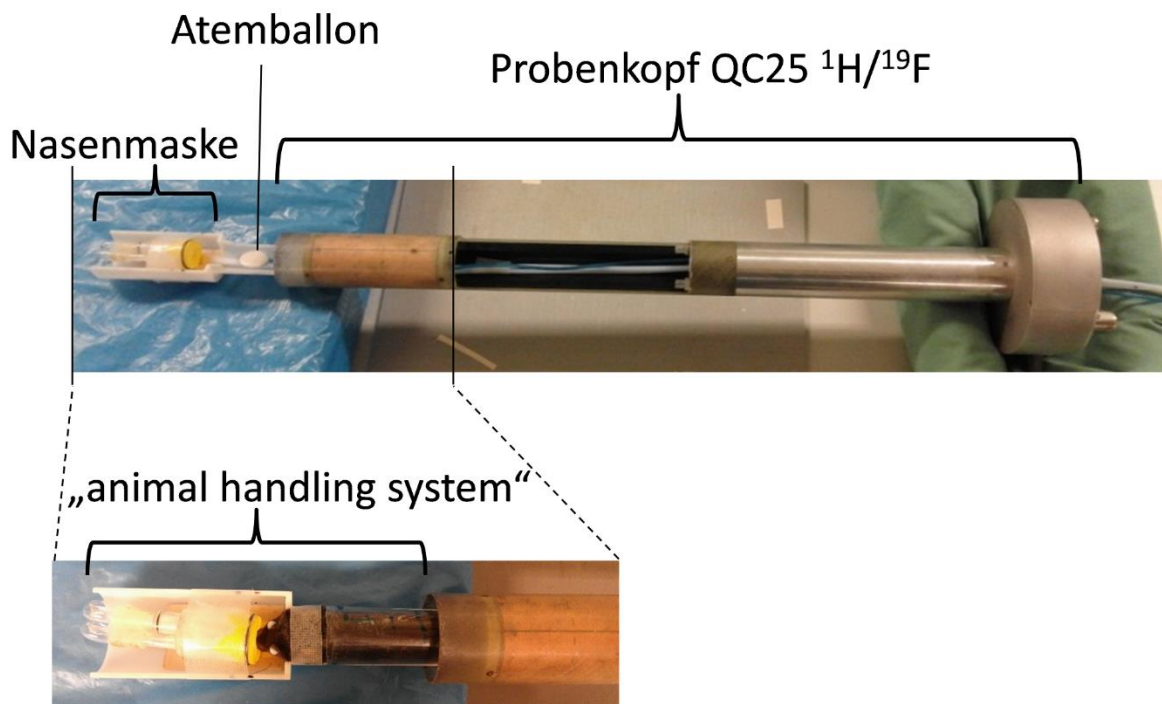
Auch der Probenkopf gehört zum Magnetsystem. Er vermittelt den Kontakt zwischen dem zu messenden Objekt und dem MR-Tomografen. Nachdem das Untersuchungsobjekt in ihm positioniert wurde, wird er selbst in den MR-Tomografen eingebracht. Der Probenkopf enthält die Hochfrequenz- und die Gradientenspulen. Die Größe der Probenköpfe ist für die Größe entscheidend, die das zu messende Objekt besitzen kann. 25-40 mm sind der übliche Durchmesser für Studien an Mäusen. Es existieren selektive Probenköpfe (Detektion spezifischer Kerne) und multinukleäre (X-BB oder Breitband) Probenköpfe<sup>8,11</sup>.



**B.** Die Konsole besitzt einen Frequenzgenerator, der die Radiofrequenzimpulse erzeugt, welche die Probe anregen und zum anderen die von der Probe emittierten Signale empfängt und an den Computer weiterleitet. Darüber hinaus besitzt die Konsole verschiedene Verstärker, die erforderlich sind, um Impulse zu erzeugen, die ausreichend stark sind, um die Probe anzuregen. Unterschieden wird in selektive Verstärker (z. B.  $^1\text{H}$  und  $^{19}\text{F}$ ) und Breitbandverstärker / X-Verstärker (große Bandbreite von Frequenzen). Zur Konsole gehört zudem eine Einheit, welche die Temperatur der Probe misst und eine konstante Proben temperatur sicherstellt<sup>8,10,11</sup>.

**C.** Der Prozessrechner dient der Ablaufsteuerung - Steuerung der Hochfrequenzimpulse, Schalten der Gradientenfelder -; sowie der Bildrekonstruktion - Auswerten des digitalen Kernspinresonanzsignals und dessen Umsetzen in Graustufen sowie Sichtbarmachung auf einem Bildschirm<sup>8,10,11</sup>.

Für die  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT Messungen wurden ein vertikales Bruker AVANCE<sup>III</sup> 9.4 T „wide bore“ NMR Spektrometer und ein [ $^1\text{H}$ - $^{19}\text{F}$  QTR] [25] Probenkopf verwendet. Bei diesem handelt es sich um einen Probenkopf mit einem inneren Durchmesser von 25 mm, der eine Kombination aus  $^1\text{H}$ -Spule und  $^{19}\text{F}$ -Quadraturspule enthielt, welche entweder auf Protonen (Kanal 1; 42,58 MHz/T) oder  $^{19}\text{F}$  (Kanal 1 und 2; 40,08 MHz/T) eingestellt werden konnten. Nach korrekter Positionierung des Objektes im Probenkopf wurde dieser für die Messungen von unten vertikal in das Spektrometer eingebracht und dort mithilfe dreier Schrauben sowie eines Brettes fixiert (**Abbildung 2.4**).



**Abbildung 2.4: Probenkopf.** Der Probenkopf besitzt einen inneren Durchmesser von 25 mm. Er enthält eine Kombination aus  $^1\text{H}$ -Spule und  $^{19}\text{F}$ -Quadraturspule. Ein Atemballon ermöglichte die Überwachung der Vitalität anhand der Atmung des Tieres,

## Material und Methoden

während sich dieses für die Messung ohne direkten Zugriff durch den Experimentator im Tomografen befand. Die Isofluran-Narkose wurde über eine Nasenmaske aufrechterhalten.

Für die korrekte Einstellung der Spule auf die jeweilige Frequenz (400.13 MHz für  $^1\text{H}$ - und 376.46 MHz für  $^{19}\text{F}$ -Messungen) wurde die sogenannte „wobble“ Routine durchgeführt, bei der manuell mithilfe des „tunings“ der Spulen-Stromkreis so eingestellt wurde, dass die relevante Transmissionsfrequenz der Frequenz entsprach, an welcher die Spule am sensitivsten war. Mithilfe des zeitgleich durchgeführten manuellen „matching“ wurde sichergestellt, dass ein Maximum des an der Basis des Probenkopfes ankommenden Stroms an die Spule übertragen wurde. Die manuelle Einstellung erfolgte für jede Spule des Probenkopfes separat. „Tuning“ und „matching“ waren erforderlich, sobald der Probenkopf oder der Kern gewechselt oder das Tier repositioniert wurde. Vor Beginn der Messungen wurde das „shim“-System auf den im System gespeicherten Grund- „shim“ zurückgesetzt. Alsdann erfolgte eine automatische Einstellung verschiedener Parameter durch das System. Nach erfolgreicher Einstellung dieser Parameter wurden automatisch drei *orthogonale* Aufnahmen angefertigt. Für die folgenden  $^1\text{H}$ -Aufnahmen wurde der „receiver gain“ manuell auf 20 dB gestellt, für die  $^{19}\text{F}$ -Aufnahmen auf 101 dB. Der „receiver gain“ ist ein wichtiger Parameter, welcher dazu dient, einen optimalen Bereich der möglichen 20-25 % der dynamischen Reichweite der Digitalisierung zu nutzen.

### 2.2.6.1 Bestimmung des $^{19}\text{F}$ -Gehaltes der Partikel mittels $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT

Um die PFCs und PLGA-Nanopartikel für die *in vivo* und *in vitro* Experimente in Verdünnungen bzw. Volumina mit identischem  $^{19}\text{F}$ -Gehalt einsetzen zu können, wurde im Rahmen der Partikelcharakterisierung (siehe Kapitel 2.2.1) der  $^{19}\text{F}$ -Gehalt jeder der eingesetzten Substanzen mittels  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT bestimmt. Für die Messungen wurden jeweils 10  $\mu\text{l}$  der PFCs bzw. PLGA-Nanopartikel in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße überführt, welche mit Hilfe von Klebeband rund um ein mit Wasser gefülltes 2 ml Reagiergefäß fixiert wurden. Dieses wurde dann in die Spule eingebracht und in dieser fixiert, wobei, um ein Herunterrutschen des Reagiergefäßes im Probenkopf zu verhindern, ein Stück Schaumstoff unter das Reagiergefäß gesteckt wurde. Für die korrekte Positionierung der Messung wurde zunächst eine  $^1\text{H}$  RARE-Aufnahme als Übersichtsaufnahme angefertigt, die die PCR-Gefäße quer (*axial*) schnitt (256 x 256 Matrix, FOV 25,6 x 25,6  $\text{cm}^2$ , TR 2500 ms, Schichtdicke 2 mm, 13 Schichten, 1 Mittelung, Akquisitionszeit 30 sec). Anhand dieser Übersichtsaufnahme wurden mit Hilfe einer weiteren RARE-Aufnahme zwei Längsschnitte (*koronal*) durch die Gefäße geplant (256 x 256 Matrix, FOV 25,6 x 25,6  $\text{cm}^2$ , TR 3500 ms, Schichtdicke 1 mm, 1 Schicht, 1 Mittelung, Akquisitionszeit 7 sec), die es wiederum ermöglichten, die korrekte Höhe und Position für einen weiteren *axialen* Schnitt, dieses Mal eine  $^{19}\text{F}$  RARE-Aufnahme, einzustellen (32 x 32 Matrix, FOV 25,6 x 25,6  $\text{cm}^2$ , TR 2500 ms, Schichtdicke 3 mm, 1 Schicht, 32 Mittelungen, Akquisitionszeit 1 min 20 sec).

Zur Analyse des  $^{19}\text{F}$ -Gehaltes wurden anhand der  $^{19}\text{F}$ -Aufnahme mithilfe des Bruker Fiji „plugins“ die Querschnitte der PCR-Gefäße umrandet und über eine Hintergrund-„region of interest / ROI“ in einer Ecke des Bildes der Gesamt- $^{19}\text{F}$  Gehalt der Substanzen [Summe der (mittleren  $^{19}\text{F}$ -Signale der ROI in der jeweiligen Schicht - mittleres  $^{19}\text{F}$ -Signal der Hintergrund-ROI) \* Fläche der ROI in der jeweiligen Schicht] berechnet.

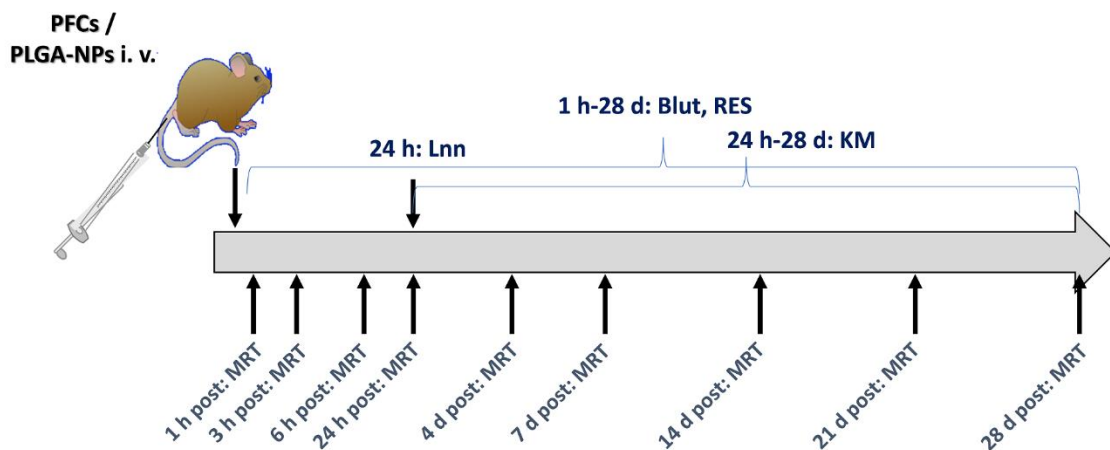
### 2.2.6.2 Untersuchung der Partikelaufnahme in Kulturzellen mittels $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT

Um, als Maß für die zelluläre Aufnahme von PFCs und PLGA-Nanopartikeln, die  $^{19}\text{F}$ -Konzentration in Zellpellets von CHO Zellen sowie RAW264.7 Makrophagen zu bestimmen, wurde der  $^{19}\text{F}$ -Gehalt der Zellen nach 2 h bzw. 24 h Partikelinkubation untersucht. Hierfür wurden die mit PFA fixierten Zellen in ihren 0,2 ml PCR-Gefäßen außen an einem mit Wasser gefüllten 2 ml Reagiergefäß befestigt, so dass sich auf der einen Seite des Reagiergefäßes die Negativkontrolle und auf der anderen die Proben befanden. Dann wurden die Proben samt Reagiergefäß in den Probenkopf eingebracht und in diesem fixiert, wobei, um ein Herunterrutschen des Reagiergefäßes im Probenkopf zu verhindern, ein Stück Schaumstoff unter dieses gesteckt wurde. Für die korrekte Positionierung der Messung wurde zunächst eine  $^1\text{H}$  RARE-Aufnahme als Übersichtsaufnahme angefertigt, die die PCR Gefäße quer (*axial*) schnitt (256 x 256 Matrix, FOV 2,56 x 2,56 cm<sup>2</sup>, TR 2500 ms, Schichtdicke 2mm, 13 Schichten, 1 Mittelung, Akquisitionszeit 30 sec). Anhand dieser Übersichtsaufnahme wurden mit Hilfe einer weiteren  $^1\text{H}$  RARE-Aufnahme zwei Längsschnitte (*koronal*) durch die PCR-Gefäße geplant, von denen ein Schnitt jeweils zwei Gefäße erfasste (256 x 256 Matrix, FOV 2,56 x 2,56 cm<sup>2</sup>, TR 3500ms, Schichtdicke 1mm, 1 Schicht, 1 Mittelung, Akquisitionszeit 7 sec). Anhand dieser Aufnahmen wurde eine  $^1\text{H}$ -RARE-Aufnahme angelegt, mit der die Pellets erfasst wurden. Diese fanden sich im unteren Bereich der PCR-Gefäße unter dem sich als helle Fläche darstellenden PBS (256 x 256 Matrix, FOV 2,56 x 2,56 cm<sup>2</sup>, TR 3500 ms, Schichtdicke 1 mm, 12 Schichten, 1 Mittelung, Akquisitionszeit 1 min, 24 sec). Mit gleicher Geometrie wurde eine  $^{19}\text{F}$  RARE-Aufnahme geplant, welche nach Umstellen der Spulen auf  $^{19}\text{F}$  in ortsgleicher Position aufgenommen wurde (32 x 32 Matrix, FOV 2,56 x 2,56 cm<sup>2</sup>, TR 2500 ms, Schichtdicke 1 mm, 12 Schichten, 1024 Mittelungen, Akquisitionszeit 42 min, 40 sec).

Zur Bestimmung des  $^{19}\text{F}$ -Gehaltes in den Zellpellets wurden anhand der  $^1\text{H}$ -Referenzaufnahme mithilfe des Bruker Fiji „plugins“ in jeder angefertigten Schicht die Querschnitte der PCR Gefäße umrandet und über eine Hintergrund-ROI in einer Ecke des Bildes das SNR - Summe der (mittleren  $^{19}\text{F}$ -Signale der ROI in der jeweiligen Schicht - mittleres  $^{19}\text{F}$ -Signal der Hintergrund-ROI) / mittlere Standardabweichung der Hintergrund-ROI) - der Pellets berechnet.

### 2.2.6.3 Kombinierte $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT des Blutes, der Milz und Leber, des Knochenmarkes und der Lymphknoten

Zur Bestimmung des  $^{19}\text{F}$ -Gehaltes in Blut, Milz, Leber, Knochenmark und Lymphknoten wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (1 h, 3 h, 6 h, 24 h, bzw. nach 4, 7, 14, 21, 28 d)  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT Messungen des Blutes (*V. cava*, *Aorta abdominalis* auf Höhe der Nieren) sowie der Leber und Milz durchgeführt. Eine Messung der Lymphknoten (*Lnn. subiliaci*) erfolgte nach 24 h, eine Messung des Knochenmarkes (*Femur*) nach 24 h, sowie für die bNEs und PLGA-NPs zusätzlich nach 4, 7, 14, 21 und 28 Tagen. Der Versuchsaufbau ist in **Abbildung 2.5** dargestellt.



**Abbildung 2.5: Schematische Darstellung des Ablaufs der in vivo Versuche zur Gewebeverteilung und -halbwertszeit mittels kombinierter  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT.** An Tag 0 wurden PFCs oder PLGA-NPs in identischen Volumina und auf den  $^{19}\text{F}$ -Gehalt normierten Konzentrationen über die seitliche Schwanzvene appliziert. Zu den Zeitpunkten 1 h, 3 h, 6 h, 24 h sowie 4, 7, 14, 21 und 28 Tage wurden  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Messungen durchgeführt, bei denen das  $^{19}\text{F}$ -Signal in Blut, Milz und Leber gemessen wurde. Ab 24 h wurde zusätzlich das Signal im Knochenmark gemessen, und zum Zeitpunkt 24 h zudem das in den Lymphknoten. PFCs = 83 nm und 299 nm PFC-Nanoemulsionen; PLGA-NPs = 226 nm PLGA-Nanopartikel; KM = Knochenmark; Lnn = Lymphknoten; RES = Retikuloendotheliales System (d. h. Milz und Leber).

Für die MRT-Messungen wurde die Narkose mit 2-3 % Isofluran in 60 %  $\text{N}_2$  und 25 %  $\text{O}_2$  in einer luftgefluteten Narkosekammer eingeleitet und mit 1-2 % Isofluran über eine Nasenmaske aufrechterhalten. Nach Einleitung der Narkose wurden die Tiere auf dem „animal handling system“ des MRT-Probenkopfes platziert. Ein Atemballon wurde unter der Brust der Tiere positioniert. Dieser ermöglichte es, während der Messung über die Atembewegungen Vitalität und Narkosetiefe zu überwachen. Um die Aufzeichnung der Atembewegung zu verbessern, wurde ein kleines Stückchen Schaumstoff unter den Atemballon gelegt. Den Tieren wurde Augensalbe appliziert, um ein Austrocknen der *Cornea* zu verhindern. Zuletzt erfolgte mithilfe von Klebeband im Nacken der Tiere eine Fixation am „animal handling system“, um ein Herunterrutschen der Maus innerhalb des Probenkopfes während der Messung im vertikalen Spektrometer zu verhindern. Um das Einbringen der Tiere in den Probenkopf zu erleichtern, wurden diese mit einer zurechtgeschnittenen Plastikröhre, die genau in das „animal handling system“

## Material und Methoden

passte bedeckt. Die Mäuse wurden so im Probenkopf positioniert, dass sich Leber und Milz im Isozentrum der Spule befanden. Für die Aufnahme des Knochenmarkes des *Femurs* wurden die Tiere, um wiederum den *Femur* im Isozentrum der Spule positionieren zu können, mit Nasenmaske und Atemballon ca. 1 cm weiter *rostral* platziert. Für die korrekte Ausrichtung der Hinterbeine während dieses Scans wurden diese mit Klebeband parallel zueinander unter dem Körper fixiert. Für die Aufnahme der *Lnn. subiliaci* wurden die Tiere nach der Knochenmarksaufnahme zusammen mit der Nasenmaske und dem Atemballon ca. 5 mm nach *caudal* verschoben. Um ein Auskühlen der Mäuse während der Messungen zu verhindern, wurde das Kühlsystem der Spule auf 32 °C erwärmt. Während der Messungen erfolgte eine kontinuierliche Kontrolle der Atmung, die mittels PC-SAM Software an einem separaten Computer verfolgt werden konnte.

Zur korrekten Positionierung der Leber- und Milz-Aufnahmen wurde zunächst eine  $^1\text{H}$  RARE-Aufnahme in *axialer* Orientierung als Übersichtsaufnahme durchgeführt (256 x 256 Matrix, FOV 2,56 x 2,56 cm<sup>2</sup>, TR 2500 ms, Schichtdicke 2 mm, 13 Schichten, 1 Mittelung, Akquisitionszeit 30 sec). Anhand dieser Aufnahme wurde wiederum eine  $^1\text{H}$  RARE-Aufnahme in *sagittaler* Orientierung geplant, die waagrecht durch die beiden Nieren auf Höhe des Nierenmarkes verlief (256 x 256 Matrix, FOV 2,56 x 4 cm<sup>2</sup>, TR 2500 ms, Schichtdicke 1 mm, 1 Schicht, 1 Mittelung, Akquisitionszeit 12 sec, 500 ms). Die  $^1\text{H}$  RARE-Übersichtsaufnahme wurde dupliziert, anhand der ersten Übersichtsaufnahme so positioniert, dass der Tierkörper senkrecht zu den seitlichen Bildkanten ausgerichtet war, sowie anhand der *sagittalen* Aufnahme so, dass der Messbereich unmittelbar *cranial* des Zwerchfells begann (256 x 192 Matrix, FOV 2,56 x 2,56 cm<sup>2</sup>, TR 2500 ms, Schichtdicke 2 mm, 13 Schichten, 13 Mittelungen, Akquisitionszeit 2 min, 30 sec). Anhand dieser  $^1\text{H}$ -Aufnahme wurde eine  $^{19}\text{F}$  RARE-Aufnahme mit gleicher geometrischer Orientierung geplant (64 x 64 Matrix, FOV 2,56 x 2,56 cm<sup>2</sup>, TR 2500 ms, Schichtdicke 2 mm, 13 Schichten, 128 Mittelungen, Akquisitionszeit 10 min, 40 sec).

Für die Messung des  $^{19}\text{F}$ -Gehaltes im Blut wurde als Referenzbild eine  $^1\text{H}$  FLASH-Aufnahme durchgeführt, welche anhand der für die Leber- und Milzaufnahmen angefertigten  $^1\text{H}$  RARE-Übersichtsaufnahme senkrecht zu den seitlichen Bildkanten ausgerichtet wurde. Anhand der *sagittalen*  $^1\text{H}$  RARE-Aufnahme, die im Rahmen der Leber- und Milzaufnahmen angefertigt worden war wurde der Messbereich so definiert, dass er unmittelbar *caudal* der rechten Niere endete (256 x 192 Matrix, FOV 2,56 x 2,56 cm<sup>2</sup>, TR 10 ms, Schichtdicke 1 mm, 5 Schichten, 4 Mittelungen, Akquisitionszeit 28 sec, 800 ms). Mit der FLASH-Aufnahme konnte das fließende Blut erfasst werden, wobei hier der Abschnitt der *V. cava caudalis* und der *Aorta abdominalis* auf Höhe der Nieren dargestellt wurde. Anhand dieser  $^1\text{H}$  FLASH-Aufnahme wurde eine  $^{19}\text{F}$  FLASH-Aufnahme mit gleicher geometrischer Orientierung geplant, welche dazu diente, den  $^{19}\text{F}$ -Gehalt des fließenden Blutes zu erfassen (32 x 32 Matrix, FOV 2,56 x 2,56

## Material und Methoden

cm<sup>2</sup>, TR 50 ms, Schichtdicke 2 mm, 5 Schichten, 188 Mittelungen, Akquisitionszeit 5 min, 0 sec, 800 ms).

Für die Bestimmung des <sup>19</sup>F-Gehaltes des Knochenmarkes wurden die Hinterbeine der Tiere für die Planung der Aufnahmen zunächst mithilfe einer *axialen* <sup>1</sup>H FLASH-Aufnahme in der Übersicht dargestellt (256 x 256 Matrix, FOV 2,56 x 2,56 cm<sup>2</sup>, TR 165,79 ms, Schichtdicke 1 mm, 20 Schichten, 2 Mittelungen, Akquisitionszeit 1 min, 3 sec, 663 ms). Diese Aufnahme wurde bereits anhand des *koronalen* Schnittes der initialen automatischen *orthogonalen* Aufnahmen so positioniert, dass sie den gesamten *Femur* abdeckte. Anhand dieser Aufnahme wurden in der Folge in einer weiteren <sup>1</sup>H FLASH-Aufnahme zwei *koronale* Schnitte so über dem *Femur* positioniert, dass der gesamte Knochen einer Körperseite jeweils in einer Schicht dargestellt werden konnte (256 x 256 Matrix, FOV 2,56 x 4 cm<sup>2</sup>, TR 100 ms, Schichtdicke 1 mm, 2 Schichten, 2 Mittelungen, Akquisitionszeit 38 sec, 400 ms). Um ein Bild mit höherer Auflösung zu erhalten, wurde nach dieser <sup>1</sup>H FLASH-Aufnahme noch eine <sup>1</sup>H RARE-Aufnahme mit gleicher Geometrie durchgeführt (256 x 256 Matrix, FOV 2,56 x 4 cm<sup>2</sup>, TR 2000, Schichtdicke 1 mm, 2 Schichten, 4 Mittelungen, Akquisitionszeit 1 min, 36 sec). In ortsgleicher Lage wurde anschließend eine <sup>19</sup>F RARE-Aufnahme mit einer abweichenden Schichtdicke von 3 mm angefertigt (64 x 64 Matrix, FOV 2,56 x 4 cm<sup>2</sup>, TR 2500 ms, Schichtdicke 3 mm, 2 Schichten, 256 Mittelungen, Akquisitionszeit 21 min, 20 sec).

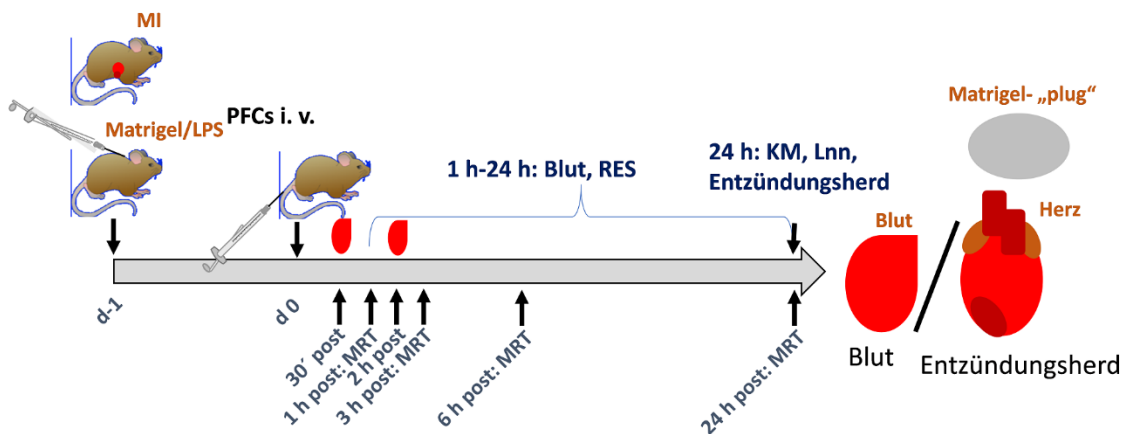
Zur Darstellung der *Lnn. subiliaci* wurde zunächst, um für die Planung der folgenden Aufnahmen eine Übersicht zu erhalten, eine *axiale* <sup>1</sup>H RARE-Aufnahme mit 13 Schichten von je 2 mm Dicke durchgeführt (256 x 256 Matrix, FOV 2,56 x 2,56 cm<sup>2</sup>, TR 2500 ms, Schichtdicke 2 mm, 13 Schichten, 1 Mittelung, Akquisitionszeit 30 sec), in der die Lymphknoten lokalisiert werden konnten. Anhand dieses Übersichtsbildes wurde in einer weiteren <sup>1</sup>H RARE-Aufnahme jeweils ein *koronaler* Schnitt von 0,5 mm Dicke durch die beiden Lymphknoten durchgeführt (256 x 256 Matrix, FOV 2,56 x 4 cm<sup>2</sup>, TR 2500 ms, Schichtdicke 0,5 mm, 2 Schichten, 1 Mittelung, Akquisitionszeit 12 sec, 500 ms). Anhand dieser Aufnahmen konnte wiederum für jede Seite eine *axiale* Aufnahme mit drei Schichten von 1 mm Dicke angelegt werden, die jeweils einen Lymphknoten erfasste (256 x 256 Matrix, FOV 2,56 x 2,56 cm<sup>2</sup>, TR 2500 ms, Schichtdicke 1 mm, 6 Schichten, 1 Mittelung, Akquisitionszeit 30 sec). Zuletzt wurde eine <sup>19</sup>F RARE-Aufnahme mit identischer Geometrie angefertigt (64 x 64 Matrix, FOV 2,56 x 2,56 cm<sup>2</sup>, TR 4000 ms, Schichtdicke 1 mm, 6 Schichten, 256 Mittelungen, Akquisitionszeit 34 min, 8 sec).

Im Falle der <sup>19</sup>F-Aufnahmen wurde die Matrix nach Aufnahme des Bildes auf 256 x 256 Pixel rekonstruiert, für die Milz- und Leberaufnahmen wurde zudem noch ein Sine<sup>2</sup> Fenster über die Aufnahmen gelegt, welches dazu diente, schwache <sup>19</sup>F-Signale hervorzuheben und so leichter detektierbar zu machen. Für die Auswertung der <sup>19</sup>F-Aufnahmen wurden anhand der <sup>1</sup>H-Aufnahmen mithilfe des Bruker

Für „plugins“ die Leber oder Milz bzw. die Blutgefäße, der gesamte *Femur* bzw. die *Lnn. subiliaci* umrandet und anhand einer Hintergrund-ROI (im Falle der Milz-/Leberaufnahmen, der Knochenmark- und Lymphknotenaufnahmen in einer Ecke des Bildes, im Falle der Aufnahmen des Blutes in Form einer rechteckigen ROI über Tierkörper und angrenzenden Hintergrund außerhalb der Blutgefäße) das jeweilige SNR der  $^{19}\text{F}$ -Signale in den Organen bzw. im Blut berechnet. Die Bluthalbwertszeit wurde mittels der Formel  $N(t) = N \cdot e^{-t \ln(2)/T_{1/2}}$  berechnet, wobei  $N$  = Anfangswert,  $t$  = Zeit,  $T_{1/2}$  = Halbwertszeit ist.

#### 2.2.6.4 Kombinierte $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT von Entzündungsprozessen

Um das  $^{19}\text{F}$ -Signal unter entzündlichen Bedingungen zum einen im Entzündungsherd, zum anderen in Blut und peripheren Organen (Leber, Milz, Knochenmark und Lymphknoten) zu bestimmen, wurden  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT Aufnahmen angefertigt. Die Injektion der PFCs erfolgte 24 h nach der Induktion der Entzündung, die MRT-Messungen 1 h, 3 h, 6 h und 24 h nach der PFC-Injektion (siehe **Abbildung 2.6**). Zur Anfertigung der Aufnahmen der Matrigel- „plugins“ mussten die Tiere so im „animal handling system“ positioniert werden, dass sich ihr Nacken im Isozentrum der Spule befand. Für die Aufnahmen des Herzens wurden die Mäuse etwas weiter *rostral* positioniert als für die Milz- und Leberaufnahmen – so, dass sich der Thorax mit dem Herzen im Isozentrum der Spule befand.



**Abbildung 2.6: Schema der Entzündungsbildgebung mittels  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT.** An Tag -1 wurde bei männlichen 12-14 Wochen alten C57BL/6 Mäusen eine Entzündung (steriles Entzündungsmodell: 50 min I/R Operation; bakterielles Entzündungsmodell: Implantation von Matrigel + LPS s. c. in den Nacken) induziert. An Tag 0 wurden den Tieren über die seitliche Schwanzvene PFCs injiziert, gefolgt von seriellen  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT Messungen nach 1 h, 3 h, 6 h und 24 h. 30 min und 2 h nach Partikelinjektion wurde Blut aus der Schwanzspitze gewonnen. Nach 24 h wurden die Tiere unter finaler Blutentnahme euthanasiert und Herzen bzw. Matrigel- „plugins“ entnommen, gefolgt von einer Isolation der Immunzellen aus Blut, Herzen bzw. Matrigel- „plugins“ für durchflusszytometrische Messungen.

#### Matrigel/LPS-Modell

Der Matrigel- „plug“ wurde zunächst in einer *axialen*  $^1\text{H}$  RARE-Übersichtsaufnahme durch den Nacken des Tieres lokalisiert (256 x 256 Matrix, FOV 2,56 x 2,56 cm<sup>2</sup>, TR 3500 ms, Schichtdicke 1 mm, 10 Schichten, 1 Mittelung, Akquisitionszeit 1 min 24 sec). Anhand dieser Aufnahme wurde eine *koronale* Aufnahme geplant, in der der Matrigel- „plug“ zentral eingestellt wurde (256 x 256 Matrix, FOV 2,56 x 2,56

## Material und Methoden

cm<sup>2</sup>, TR 3500 ms, Schichtdicke 1 mm, 1 Schicht, 2 Mittelungen, Akquisitionszeit 2 min 48 sec). Mithilfe der *koronalen* Aufnahme wurde eine weitere, detaillierte *axiale* Aufnahme geplant, mit der der gesamte Matrigel- „plug“ dargestellt werden konnte (256 x 256 Matrix, FOV 2,56 x 2,56 cm<sup>2</sup>, TR 2500 ms, Schichtdicke 1 mm, 9 Schichten, 4 Mittelungen, Akquisitionszeit 2 min). Mit gleicher Geometrie wurde als letztes eine <sup>19</sup>F RARE-Aufnahme angefertigt (64 x 64 Matrix, FOV 2,56 x 2,56 cm<sup>2</sup>, TR 2500 ms, Schichtdicke 1 mm, 9 Schichten, 256 Mittelungen, Akquisitionszeit 21 min, 20 sec). Für die Bestimmung des <sup>19</sup>F-Gehalts wurde anhand der <sup>1</sup>H-Aufnahmen mithilfe des Bruker Fiji „plugins“ der Matrigel- „plug“ umrandet und anhand einer Hintergrund-ROI in einer Ecke des Bildes das SNR des <sup>19</sup>F-Bildes in identischer Lokalisation berechnet.

### Myokardinfarkt

Beim Myokardinfarktmodell wurden zunächst <sup>1</sup>H-Aufnahmen des Herzens angefertigt, die mit LGE-Bildgebung („late gadolinium enhancement“) kombiniert wurden. Hierdurch war es möglich, das Ausmaß des Infarktes zu bestimmen. Das gadoliniumhaltige Kontrastmittel wurde in einer Konzentration von 200 mM in isotonischer Kochsalzlösung eingesetzt. Bereits vor der ersten MRT-Aufnahme wurden dem Tier 200 µl des Kontrastmittels i. p. injiziert (200 µl an einer Stelle oder 2 x 100 µl an zwei Stellen). Dieses Kontrastmittel ist bei der Maus nach wenigen Minuten bis ca. 30 min im Infarktareal sichtbar. Bereits anhand der zu Beginn der Messungen automatisch angefertigten drei *orthogonalen* Aufnahmen konnte die korrekte Positionierung des Herzens beurteilt werden, da dieses einen als „Schlier“ sichtbaren Bewegungsartefakt verursacht, der sich *orthogonal* zum Herzen über die gesamte Breite des Bildes erstreckt. Mithilfe der dritten - *sagittalen* - der *orthogonalen* Aufnahmen wurde als erstes eine <sup>1</sup>H FLASH cine-Aufnahme in Kurzachse angelegt, die mittig über dem Herzen positioniert wurde. Zudem wurde eine Navigatorschicht parallel zur eigentlichen Aufnahme durch den Aortenbogen gelegt, somit die Stelle der maximalen Bewegung. Eine Navigatorschicht erlaubt es, anhand der in dieser Schicht registrierten Bewegung die Herz- und Atemfrequenz zu bestimmen und mithilfe dieser Werte die einzelnen Aufnahmen der eigentlichen Messung zeitlich so durchzuführen, dass der gesamte Herzzyklus abgebildet werden kann. Die Parameter der Aufnahme waren: 256 x 256 Matrix, FOV 0,3 x 0,3 cm<sup>2</sup>, TR 5,82 ms, 1 mm Schichtdicke, 1 Schicht, 1 Mittelung, Akquisitionszeit 1 min, 53 sec, 738 ms. Als nächstes wurde eine <sup>1</sup>H FLASH cine-Aufnahme in Längsachse geplant, für welche die Geometrie der vorherigen Kurzachsenaufnahme importiert wurde, um die Aufnahme dann exakt *orthogonal* zu dieser auszurichten. Diese longitudinale Aufnahme verlief zwischen den Papillarmuskeln und durch die Herzspitze. Auch hier wurde wieder die Navigatorschicht anhand des *sagittalen* Schnitts der initial angefertigten *orthogonalen* Aufnahmen, nun im rechten Winkel zur eigentlichen Aufnahme durch den Aortenbogen gelegt. Die in der vorherigen Kurzachsenaufnahme berechnete Atem- und Herzfrequenz wurde für diese Aufnahme als Voreinstellung übernommen. Mithilfe eines „macros“ wurden automatisch verschiedene Messparameter eingestellt, die dazu dienten, das Signal des gadoliniumhaltigen



## Material und Methoden

Kontrastmittels optimal zu erfassen. Diese letzten beiden Schritte, also manuelle Übernahme von Herz- und Atemfrequenz der vorherigen Aufnahme und Aktivierung des „macros“ für das LGE wurden für alle weiteren  $^1\text{H}$ -Aufnahmen durchgeführt. Nach der Langachsenaufnahme wurde die zuvor angefertigte Kurzachsenaufnahme dupliziert, anhand der Langachsenaufnahme *orthogonal* zur Herzachse ausgerichtet und ungefähr in der Mitte des Herzens (mitventrikulärer Schnitt) positioniert. Von dem mitventrikulären Schnitt ausgehend wurden, immer in 1 mm Schritten in *basaler* und danach *apikaler* Richtung parallele Schnitte angefertigt, so dass schließlich das gesamte Herz abgebildet worden war. Anhand dieser Aufnahmen wurde das LGE-Signal lokalisiert. Im Anschluss an die  $^1\text{H}$ -Aufnahmen wurde als letztes eine  $^{19}\text{F}$  RARE-Aufnahme durchgeführt, für die die Geometrie der zuvor angefertigten mitventrikulären Aufnahme importiert wurde. In der  $^{19}\text{F}$ -Aufnahme wurden ebenso viele Schichten mit 1 mm Abstand aufgenommen, wie in den zuvor durchgeführten  $^1\text{H}$ -Aufnahmen parallele Querschnitte durch das Herz angefertigt worden waren (64 x 64 Matrix, FOV 0,3 x 0,3 cm<sup>2</sup>, TR 2500 ms, Schichtdicke 1 mm, 256 Mittelungen, Akquisitionszeit 21 min, 20 sec). Für die Quantifizierung des  $^{19}\text{F}$ -Gehaltes wurde anhand der  $^1\text{H}$ -Aufnahmen mithilfe des Bruker Fiji „plugins“ das mittels LGE identifizierte infarzierte Areal des Herzens umrandet, um dann anhand einer Hintergrund-ROI in einer Ecke des Bildes das SNR des ortsgleichen  $^{19}\text{F}$ - „hot spots“ zu berechnen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Zelluläre Aufnahme, Gewebeverteilung und Bioeliminierung von PFCs und PLGA-Nanopartikeln

##### 3.1.1 Charakterisierung von PFCs und PLGA-Nanopartikeln

In der vorliegenden Arbeit wurden Perfluorkarbon Nanoemulsionen (PFCs) und auch PLGA Nanopartikel verwendet, die als  $^{19}\text{F}$ -Quelle Perfluor-15-kronen-5-ether (PFCE) enthielten. Die PFCE Nanoemulsionen wurden im Institut für Molekulare Kardiologie mittels Mikrofluidisation hergestellt. Die PLGA-Nanopartikel wurden von der AG Srinivas (RadboudUMC, Nijmegen, Niederlande) zur Verfügung gestellt. Um durchflusszytometrische Messungen und mikroskopische Untersuchungen zu ermöglichen, enthielten die PLGA-Nanopartikel das Fluorophor Atto647 und PFCs das Fluorophor Cy5, welches ein dem Atto647 vergleichbares Fluoreszenzprofil aufweist.

Mittels Photonenkorrelationsspektroskopie und  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT wurden die für die folgenden Versuche verwendeten Partikel in einem ersten Schritt genauer charakterisiert. Hierzu wurde der hydrodynamische Durchmesser, der Polydispersitäts-Index (PDI), das  $\zeta$ -Potential sowie der Gesamt- $^{19}\text{F}$  Gehalt der Partikel ermittelt.

Es zeigte sich, dass die klassischen PFCs (sNEs) mit  $83,25 \pm 4,83$  nm den kleinsten hydrodynamischen Durchmesser aufwiesen. Die PLGA-NPs waren mit  $226,17 \pm 35,78$  nm deutlich größer. Da bekannt ist, dass die Partikelgröße einen Einfluss auf die Eigenschaften der Partikel, z. B. deren zelluläre Aufnahme besitzt<sup>123</sup>, musste für die weitergehenden Versuche die Größe der verwendeten Partikel angeglichen werden. Weil es herstellungsbedingt nicht möglich ist, kleinere PLGA-Nanopartikel zu produzieren, wurden durch Verringerung der Menge an Phospholipiden<sup>128</sup> größere PFCs hergestellt (bNEs), welche einen hydrodynamischen Durchmesser von  $298,7 \pm 15,81$  nm aufwiesen. Um Partikel mit einem größeren Durchmesser herzustellen, wurde bei der Herstellung der Phospholipid-Gehalt reduziert. Durch die geringere Menge an Emulgator, der die innere Perfluorkarbonphase stabilisieren kann, nimmt hierbei die Partikelgröße zu<sup>124,127,128,206</sup>.

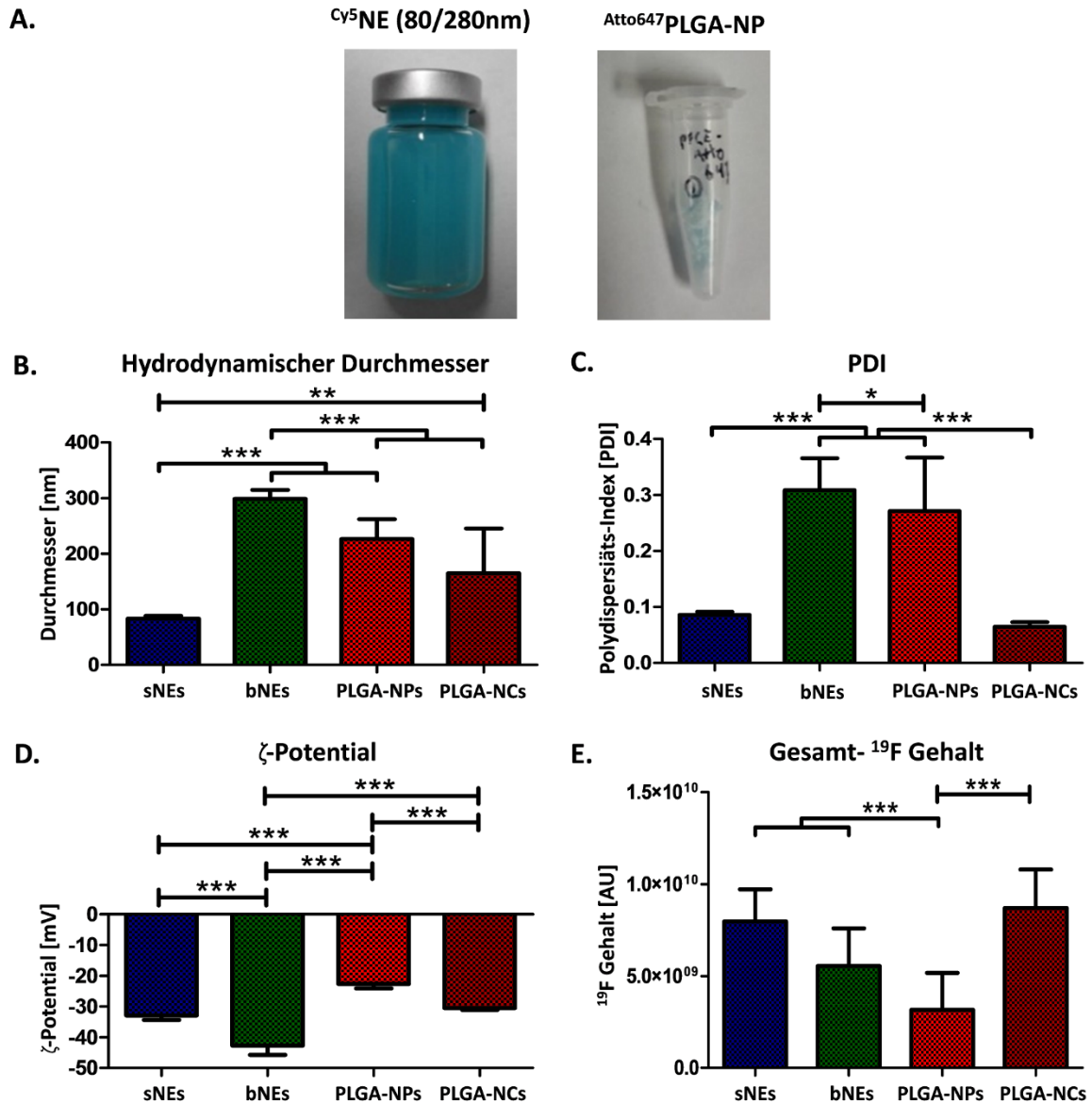
Von Mitarbeitern der AG Srinivas wurde die Beobachtung gemacht, dass die PLGA-NPs eine andere Ultrastruktur besitzen als die PFCs<sup>207</sup>. Statt eines großen PFCE Kerns wie die Nanoemulsionen, enthalten sie zahlreiche kleine PFCE Tröpfchen, welche in eine schwammartige PLGA-Struktur eingebettet sind. Um zu untersuchen, ob die Ultrastruktur einen Einfluss auf die Partikeleigenschaften hat, wurden

## Ergebnisse

zusätzlich zu den ursprünglichen PLGA-NPs noch sogenannte PLGA-Nanokapseln (PLGA-NCs) hergestellt, die wie die PFCs einen einzigen großen PFCE Kern in einer PLGA Hülle enthielten. Die PLGA-NCs besaßen mit  $165,04 \pm 80,18$  nm eine ähnliche Größe wie die PLGA-NPs.

Die Größenverteilung der Partikel wird über den Polydispersitätsindex (PDI) quantifiziert. Der PDI reicht von 0,0-1,0. Bei einem PDI  $<0,1$  spricht man von monodispers, bei einem PDI 0,1-0,2 von geringer Dispersität, zwischen 0,2-0,5 von breiter Dispersität und über 0,5 von sehr breiter Dispersität (polydispers)<sup>7</sup>. Der Polydispersitäts-Index für die in der vorliegenden Studie verwendeten Nanopartikel lag für die sNEs ( $0,086 \pm 0,01$  AU) und die PLGA-NCs ( $0,06 \pm 0,01$  AU) im Bereich der Monodispersität, wohingegen die bNEs ( $0,31 \pm 0,06$  AU) und die PLGA-NPs ( $0,27 \pm 0,1$  AU) eine breite Dispersität aufwiesen. Alle verwendeten Partikel besaßen ein negatives  $\zeta$ -Potential. Das  $\zeta$ -Potential der PLGA-NPs ( $-22,63 \pm 1,48$  mV) und PLGA-NCs ( $-30,53 \pm 0,55$  mV) war jedoch weniger negativ als das der gleich großen bNEs ( $-42,71 \pm 3,07$  mV), während die sNEs ein  $\zeta$ -Potential von  $-32,88 \pm 1,5$  mV aufwiesen. Schließlich wurde auch der Gesamt-<sup>19</sup>F Gehalt der Partikel ermittelt. Hierbei zeigte sich, dass dieser für die PLGA-NPs am geringsten war ( $3,15 \times 10^9 \pm 2,01 \times 10^9$  AU), während die Werte für die sNEs mit  $7,97 \times 10^9 \pm 1,75 \times 10^9$  AU bzw.  $5,55 \times 10^9 \pm 2,05 \times 10^9$  AU für die bNEs und  $8,71 \times 10^9 \pm 2,08 \times 10^9$  AU für die PLGA-NCs vergleichbar waren. Die Ergebnisse der Partikelcharakterisierung werden in **Abbildung 3.1** dargestellt.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.1: Partikelcharakterisierung von PFCs und PLGA-Nanopartikeln mittels Photonenkorrelationspektroskopie und <sup>1</sup>H/<sup>19</sup>F-MRT.** A.: Links: Cy5NEs. Rechts: Lyophilisierte PLGA-NPs. Diese wurden für die Versuche in Phosphat-Glycerol Puffer resuspendiert. B.-D. Mittels Photonenkorrelationspektroskopie wurden der hydrodynamische Durchmesser, der Polydispersitäts-Index (PDI) sowie das ζ-Potential der Partikel bestimmt. E. Über <sup>1</sup>H/<sup>19</sup>F-MRT wurde der Gesamt-<sup>19</sup>F-Gehalt der Partikel ermittelt. sNEs = 83 nm Cy5 PFC-Nanoemulsionen; bNEs = 299 nm Cy5 PFC-Nanoemulsionen; PLGA-NPs = 226 nm Atto647 PLGA-Nanopartikel; PLGA-NCs = 165 nm Atto647 Nanokapseln. Für die statistische Auswertung wurde eine Einweg-Varianzanalyse mit Bonferroni Post-Hoc-Test verwendet. Daten sind Mittelwert ± SD von n = 3-5 individuellen Experimenten. \* = p<0,05, \*\* = p<0,01, \*\*\* = p<0,001.

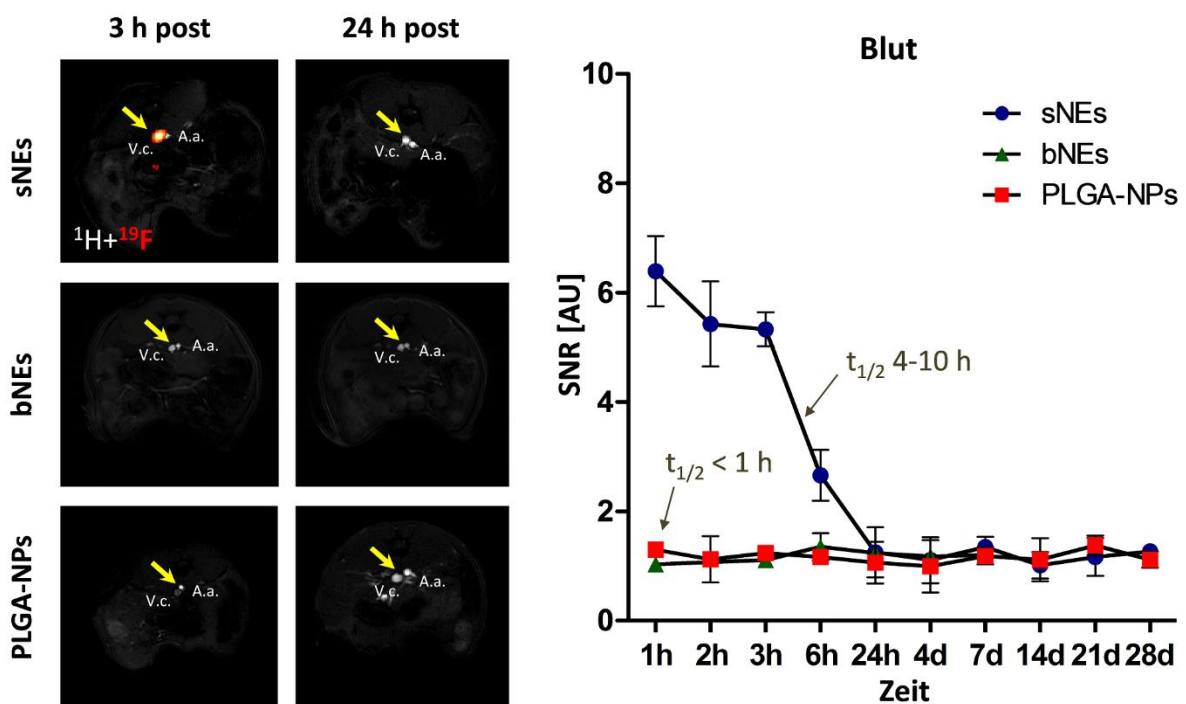
### 3.1.2 Gewebeverteilung und Gewebelbhalbwertszeit von PFCs und PLGA-Nanopartikeln

Im Gegensatz zu PFCs<sup>192</sup> wurden noch keine systematischen Versuche zur Gewebeverteilung PLGA-ummantelter Partikel durchgeführt. Daher war es das Ziel, die Gewebeverteilung, die Halbwertszeit im Blut, den Organen des retikuloendothelialen Systems sowie Knochenmark und Lymphknoten mittels kombinierter <sup>1</sup>H/<sup>19</sup>F-MRT für sNEs, bNEs und PLGA-NPs *in vivo* zu untersuchen. Hierzu wurden an Tag

## Ergebnisse

0 auf den  $^{19}\text{F}$ -Gehalt normierte Konzentrationen an Partikeln über die seitliche Schwanzvene appliziert. Anschließend folgten  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$  MRT-Aufnahmen nach 1 h, 3 h, 6 h, 24 h sowie 4, 7, 14, 21 und 28 Tagen. Zu jedem Messzeitpunkt wurde das  $^{19}\text{F}$ -Signal in Blut, Milz und Leber gemessen, ab 24 h zudem im Knochenmark. Für die Lymphknoten erfolgte die Messung nur 24 h nach Partikelinjektion.

Im Blut zeigten sich größenabhängige Unterschiede in der Elimination der Partikel. So waren die größeren bNEs und PLGA-NPs bereits zum ersten Messzeitpunkt, d. h. nach einer Stunde nicht mehr im Blut nachweisbar, während die sNEs nach einem konstanten Abfall des  $^{19}\text{F}$ -Signals von einem Maximum zum ersten Messzeitpunkt (SNR:  $6,39 \pm 0,64$  AU) erst 24 h nach Injektion nicht mehr im Blut detektiert werden konnten. Die für die sNEs berechnete Halbwertszeit lag dabei bei ca. 4-10 h.

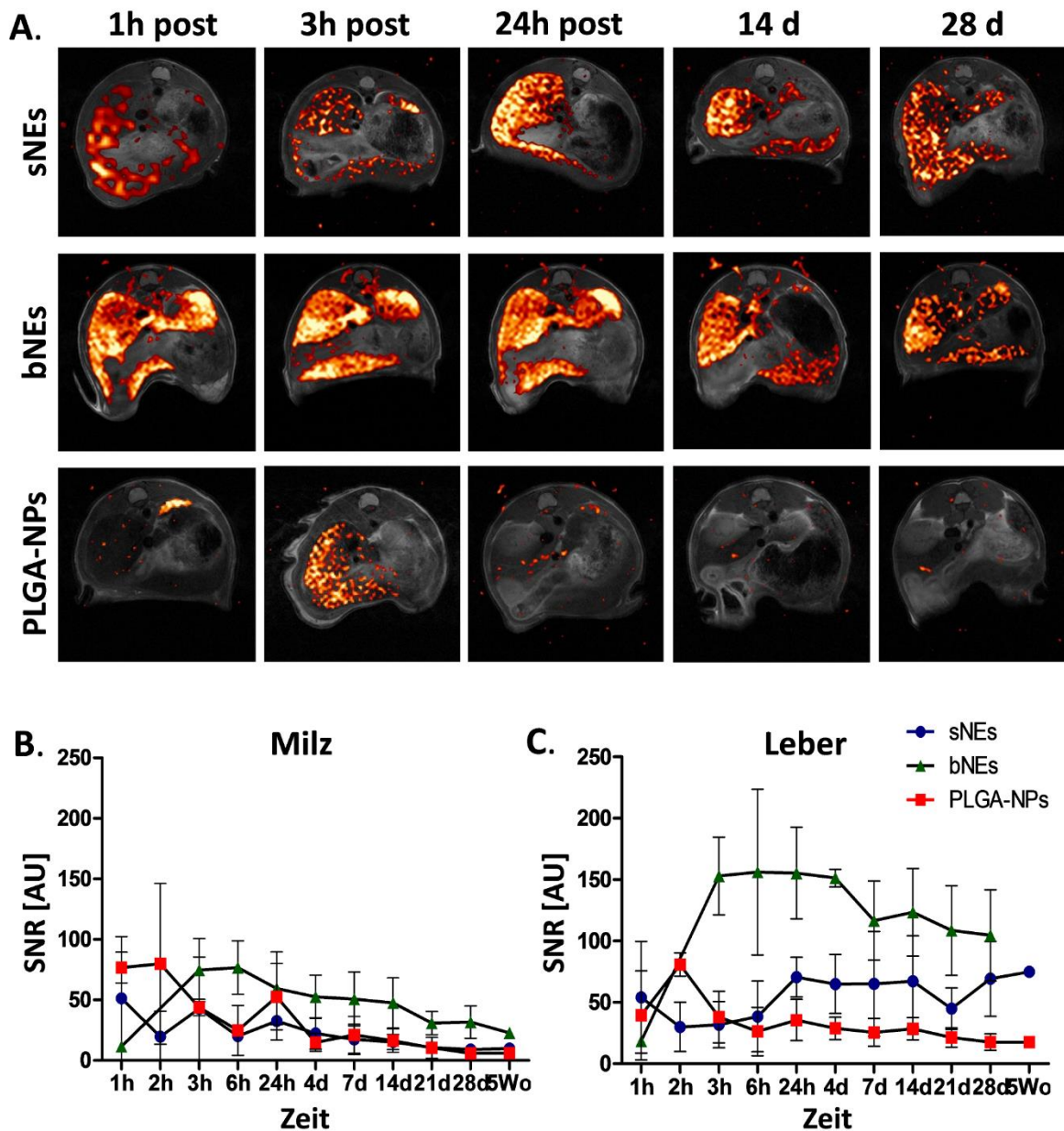


**Abbildung 3.2: Bluthalbwertszeit des  $^{19}\text{F}$ -Signals nach i. v. Applikation von PFCs und PLGA-NPs.** Links: Überlagerte  $^1\text{H}$ - und  $^{19}\text{F}$ -FLASH Aufnahmen in axialer Orientierung auf Höhe der Nieren zu den Zeitpunkten 3 h und 24 h nach Injektion. Rechts: Zeitlicher Verlauf des  $^{19}\text{F}$ -Signals im Blut nach i. v. Applikation über einen Zeitraum von 28 Tagen.  $t_{1/2}$  = Halbwertszeit; sNEs = 83 nm PFC-Nanoemulsionen; bNEs = 299 nm PFC-Nanoemulsionen; PLGA-NPs = 226 nm PLGA-Nanopartikel. Für die statistische Auswertung wurde eine Zweifweg-Varianzanalyse mit Bonferroni Post-Hoc-Test verwendet. Daten sind Mittelwert  $\pm$  SD von  $n = 6$  individuellen Experimenten.

Da bekannt ist, dass sich PFCs stark im retikuloendothelialen System anreichern<sup>171</sup>, wurde im nächsten Schritt untersucht, wie sich Anreicherung und Elimination der verwendeten Partikel in Milz und Leber als zum retikuloendothelialen System gehörende Organe verhalten. Hierfür wurde zu den bereits im vorherigen Absatz genannten Zeitpunkten mittels kombinierter  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT das SNR des  $^{19}\text{F}$  Signals in Leber und Milz gemessen. Die Anflutung in die und Ausscheidung der Partikel aus der Milz stellte sich wie folgt dar: Initial kam es zu einer schnelleren Anreicherung der sNEs (maximales SNR nach 1 h:  $51,3 \pm 51,08$  AU) und PLGA-NPs (maximales SNR nach 2 h:  $79,85 \pm 66,4$  AU), verglichen mit den bNEs, die

## Ergebnisse

erst nach 3 h ein Maximum erreichten ( $74,68 \pm 26,09$  AU). Danach fiel das  $^{19}\text{F}$ -Signal sowohl für die sNEs als auch für die PLGA-NPs innerhalb von 2 h bzw. 3 h auf Werte im Bereich des Hintergrundrauschens ab. Das  $^{19}\text{F}$ -Signal der bNEs sank hingegen langsamer ab, wobei die Werte während des Messzeitraums über 28 Tage konstant im detektierbaren Bereich blieben. In der Leber kam es initial zu einer schnelleren Anreicherung der größeren bNEs (maximales SNR nach 3 h) und PLGA-NPs (maximales SNR nach 2 h), während das Signal der sNEs erst nach 24 h ein Maximum erreichte. Hierbei lagen die Maximalwerte der bNEs deutlich über den Werten der anderen beiden Partikel (bNEs:  $153 \pm 31,73$  AU, PLGA-NPs:  $80,8 \pm 9,48$  AU, sNEs:  $70,58 \pm 16,19$  AU). Mit Erreichen des Maximums stellte sich bei den sNEs und bNEs ein Plateau ein, welches, abgesehen von einem leichten Abfall des Signals über die Zeit im Falle der bNEs, bis zum Ende der Messphase gehalten wurde. Das  $^{19}\text{F}$ -Signal der PLGA-NPs nahm hingegen bereits nach 3 h bis auf Werte im Bereich des Hintergrundrauschens ab.

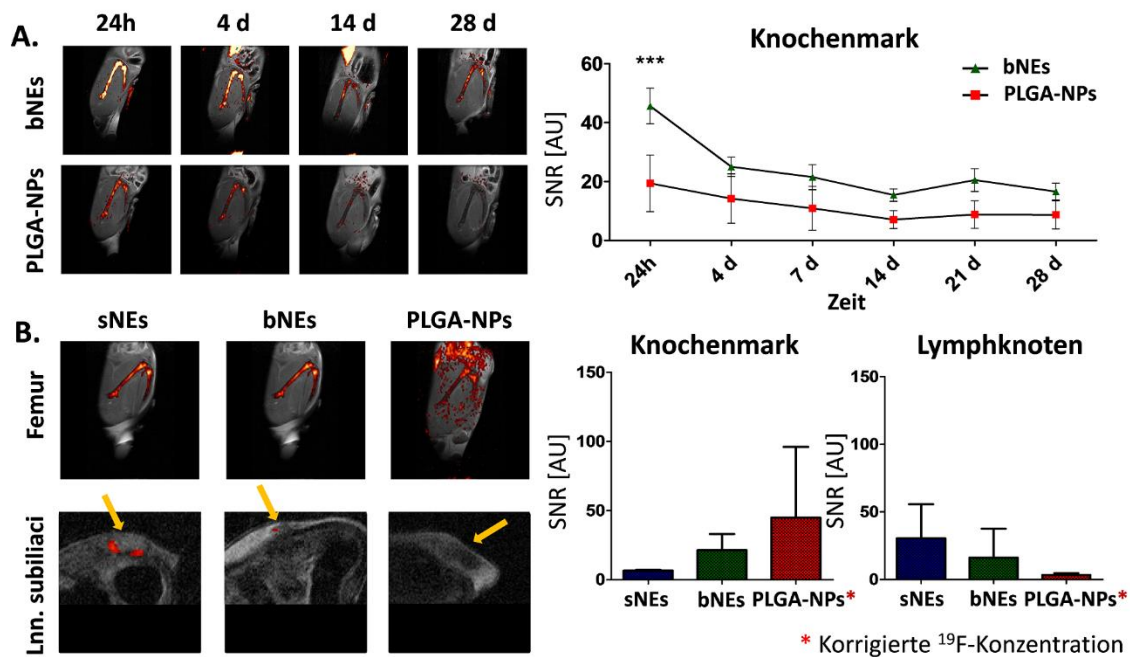


**Abbildung 3.3:** Verlauf des  $^{19}\text{F}$ -Signals von PFCs und PLGA-NPs im retikuloendothelialen System. A. Axiale  $^1\text{H}$ -RARE Aufnahmen von Mäusen in Höhe der Leber zu den Zeitpunkten 1 h, 3 h, 24 h sowie 14 und 28 d nach i. v. Injektion. Zeitlicher Verlauf des  $^{19}\text{F}$ -Signals in Milz (B.) und Leber (C.) nach i. v. Injektion über einen Zeitraum von 28 Tagen. Unten links: Zeitlicher Verlauf des  $^{19}\text{F}$ -Signals in der Milz. Unten rechts: Zeitlicher Verlauf des  $^{19}\text{F}$ -Signals in der Leber. sNEs = 83 nm PFC-Nanoemulsionen; bNEs = 299 nm PFC-Nanoemulsionen; PLGA-NPs = 226 nm PLGA-Nanopartikel. Daten sind Mittelwert  $\pm$  SD von  $n = 6$  individuellen Experimenten.

Bei den Versuchen zur Akkumulation der Partikel in Knochenmark und Lymphknoten wurde vom oben beschriebenen Protokoll insofern abgewichen, als den Tieren den Volumina der PLGA-NPs entsprechende Mengen unverdünnter PFCs injiziert wurden. Dies war erforderlich, da bei Vorversuchen bei der Injektion verdünnter PFCs kein Signal in Knochenmark und Lymphknoten detektiert werden konnte. Entsprechend muss bei den erhobenen Daten eine rechnerische Korrektur des  $^{19}\text{F}$ -Gehaltes

## Ergebnisse

erfolgen, um die Werte der PFCs und PLGA-NPs miteinander vergleichen zu können. Bei der Betrachtung der  $^{19}\text{F}$ -Signalstärke in Knochenmark und Lymphknoten 24 h nach Injektion fielen deutliche Unterschiede in der Aufnahme der verschiedenen Partikel zwischen den Organen auf. So reicherten sich im Knochenmark insbesondere die PLGA-NPs an (SNR  $45 \pm 51,1$  AU), gefolgt von bNEs ( $21,4 \pm 11,69$  AU), wohingegen für sNEs so gut wie kein  $^{19}\text{F}$ -Signal zu detektieren war ( $6,7 \pm 0,46$  AU). In den Lymphknoten war hingegen die Aufnahme der sNEs am stärksten ( $30,5 \pm 25,14$  AU), gefolgt von den bNEs ( $16,2 \pm 21,45$  AU), während hier für die PLGA-NPs nur ein sehr geringes  $^{19}\text{F}$ -Signal detektiert werden konnte ( $3,4 \pm 1,39$  AU). Für die Messung des  $^{19}\text{F}$ -Signals im Knochenmark über einen Zeitraum von insgesamt 28 Tagen wurden nur die beiden größeren Partikel bNEs und PLGA-NPs verwendet, da nur für diese nach 24 h ein deutliches Signal im Knochenmark detektierbar war. Hierbei konnte klar ein stärkeres  $^{19}\text{F}$ -Signal für die bNEs, verglichen mit den PLGA-NPs zu jedem Messzeitpunkt nachgewiesen werden. Das  $^{19}\text{F}$ -Signal nahm für beide Partikel bis 14 Tage nach Injektion kontinuierlich ab, blieb dann für den Rest des Versuches jedoch auf dem zu diesem Zeitpunkt erreichten Level. Für die bNEs lag das Niveau des Signals hierbei noch im detektierbaren Bereich ( $16,6 \pm 2,83$  AU), während für die PLGA-NPs das  $^{19}\text{F}$ -Signal an Tag 14 auf nicht mehr detektierbare Werte abfiel ( $8,7 \pm 4,75$  AU).



**Abbildung 3.4: Anreicherung der PFCs und PLGA-NPs in Knochenmark und Lymphknoten.** A. Verlauf des  $^{19}\text{F}$ -Signals von bNEs und PLGA-NPs im Knochenmark des Femurs über 28 Tage. B.  $^{19}\text{F}$ -Signal im Knochenmark des Femurs sowie in den Lnn. subiliaci 24 h nach Partikelinjektion. sNEs = 83 nm PFC-Nanoemulsionen; bNEs = 299 nm PFC-Nanoemulsionen; PLGA-NPs = 226 nm PLGA-Nanopartikel. Für die statistische Auswertung wurde eine Zweiweg-Varianzanalyse mit Bonferroni Post-Hoc Test (A.) bzw. eine Einweg-Varianzanalyse mit Bonferroni Post-Hoc-Test (B.) verwendet. Daten sind Mittelwert  $\pm$  SD von (A.)  $n = 3$  bzw. (B.)  $n = 6$  individuellen Experimenten. \*\*\* =  $p < 0,001$ .



### 3.1.3 Zelluläre Aufnahme von PFCs und PLGA-Nanopartikeln

Neben den *in vivo* Versuchen zur Langzeit-Gewebeverteilung wurden ergänzende Studien auf Zellebene durchgeführt, um zu untersuchen, wie gut und wie schnell die sNEs, bNEs, PLGA-NPs und PLGA-NCs von verschiedenen Zellen aufgenommen werden. Der Versuch beruhte auf der Hypothese, dass die schnelle Elimination der PLGA-NPs aus dem Körper durch eine bessere zelluläre Aufnahme der PLGA-Nanopartikel hervorgerufen werden könnte. Eine solche würde der schnellen Anreicherung der PLGA-NPs im RES entsprechen. Darüber hinaus könnte die vermehrte zelluläre Aufnahme zu einer vermehrten Degradation des PLGAs durch die Phagozyten und entsprechend zu einer beschleunigten Freisetzung des PFCE aus den Zellen führen. Für die *in vitro* Versuche wurden Zelllinien, murine Blutzellen sowie Zellen, die aus murinen Lebern und Milzen gewonnen wurden verwendet.

#### *Aufnahme von PFCs und PLGA-Nanopartikeln in Zelllinien*

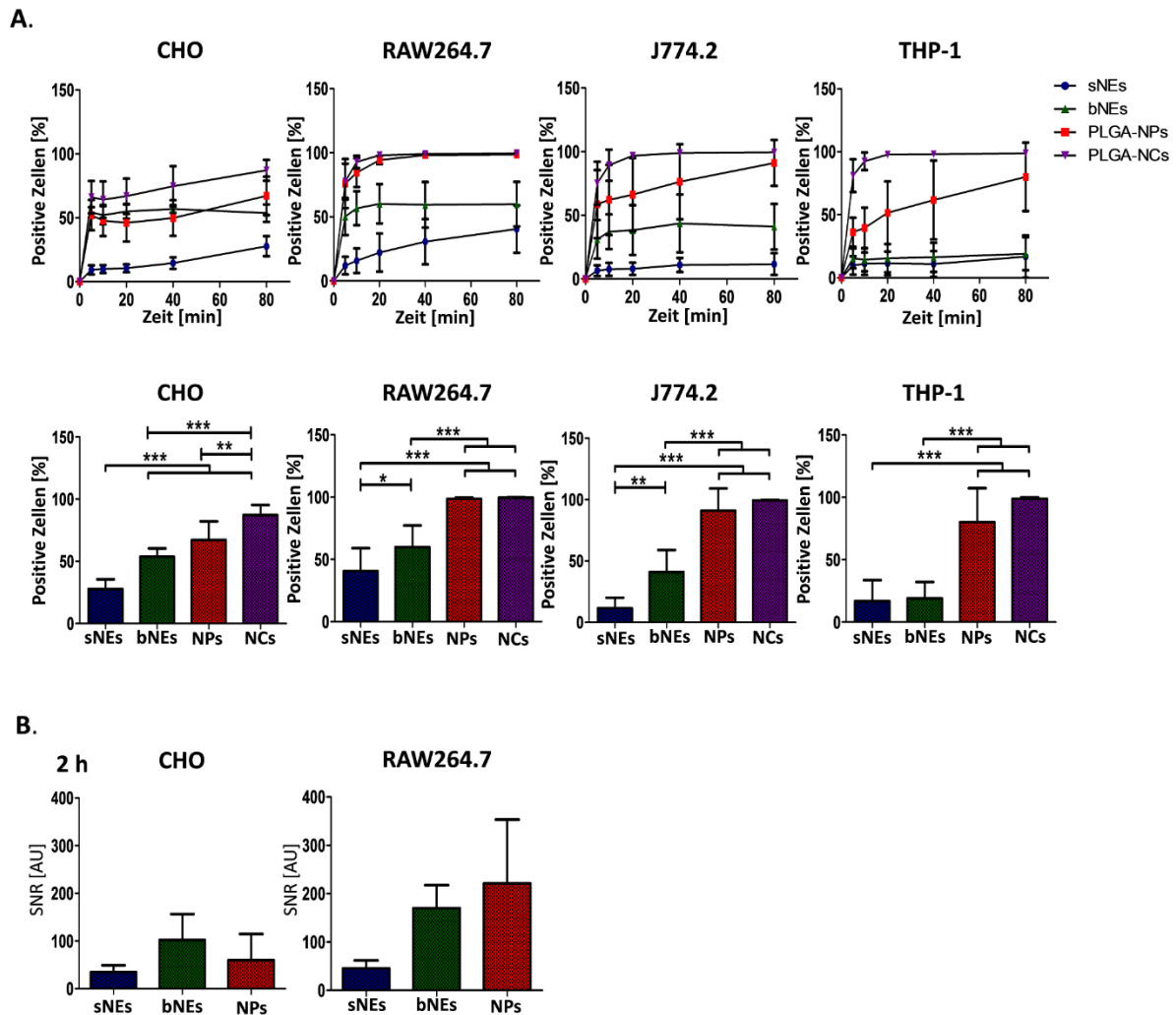
Ziel des Versuches war es, anhand durchflusszytometrischer Untersuchungen sowie der <sup>19</sup>F-Bildgebung zu klären, ob es Unterschiede hinsichtlich der Aufnahme von sNEs, bNEs, PLGA-NPs und PLGA-NCs in etablierte Zelllinien gibt. Hierzu wurden nicht-phagozytierende CHO Zellen sowie die phagozytotischen RAW264.7 und J774.2 Makrophagen, ebenso wie THP-1 Zellen *in vitro* mit PFCs oder PLGA-Nanopartikeln inkubiert. Bei den Versuchen wurden jeweils auf den <sup>19</sup>F-Gehalt normierte Mengen der Partikel miteinander verglichen.

Zu definierten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und durchflusszytometrisch untersucht. Es war erkennbar, dass die PLGA-ummantelten Partikel (PLGA-NPs und PLGA-NCs) über die gesamte Messzeit von allen Zelllinien deutlich besser aufgenommen wurden als die PFCs (**Abbildung 3.5, A**). Eine explizite Beschreibung der Zeitkinetiken der Partikelaufnahme findet sich in Kapitel 3.1.4 „Mechanismen der Aufnahme von PFCs und PLGA-Nanopartikeln“. Die bNEs wurden besser aufgenommen als die sNEs. Exemplarisch herausgegriffen, waren bei den RAW Makrophagen nach 80 min 40,6 ± 18,5 % der Zellen positiv für sNEs, 59,9 ± 17,4 % positiv für bNEs, 98,6 ± 0,9 % positiv für PLGA-NPs und 99,5 ± 0,4 % positiv für PLGA-NCs (**Abbildung 3.5, A**). Die Verhältnisse der für die einzelnen Partikel positiven Zellen waren für die anderen Zelllinien ähnlich. Bei den CHOs war, verglichen mit den RAW264.7 Zellen, die Aufnahme der PLGA-Partikel geringer, bei den J774.2 und insbesondere den THP-1 Zellen war die der PFCs geringer.

Zusätzlich zur Untersuchung der Partikelaufnahme mittels Durchflusszytometrie, wurden als zweite Untersuchungsmethode CHO und RAW264.7 Zellen für 2 h mit Partikeln inkubiert und das <sup>19</sup>F-Signal der Pellets nach Fixierung der Zellen in PFA mittels <sup>19</sup>F-MRT gemessen. In den CHOs wurde nach 2 h das stärkste Signal für die bNEs gemessen (bNEs: 102 ± 54,6 AU, PLGA-NPs: 59,9 ± 54,8 AU), in den RAW264.7 Zellen wurde das stärkste Signal zu diesem Zeitpunkt für die PLGA-NPs beobachtet (bNEs:

## Ergebnisse

170 ± 47,4 AU, PLGA-NPs: 221 ± 132,2 AU). Die sNEs wiesen in beiden Zelllinien das schwächste <sup>19</sup>F-Signal auf. Das <sup>19</sup>F-Signal in den RAW264.7 Zellen war für bNEs und PLGA-NPs stärker als in den CHO Zellen, ein entsprechender Unterschied war auch im Falle der sNEs vorhanden, aber nur gering (**Abbildung 3.5, B.**).



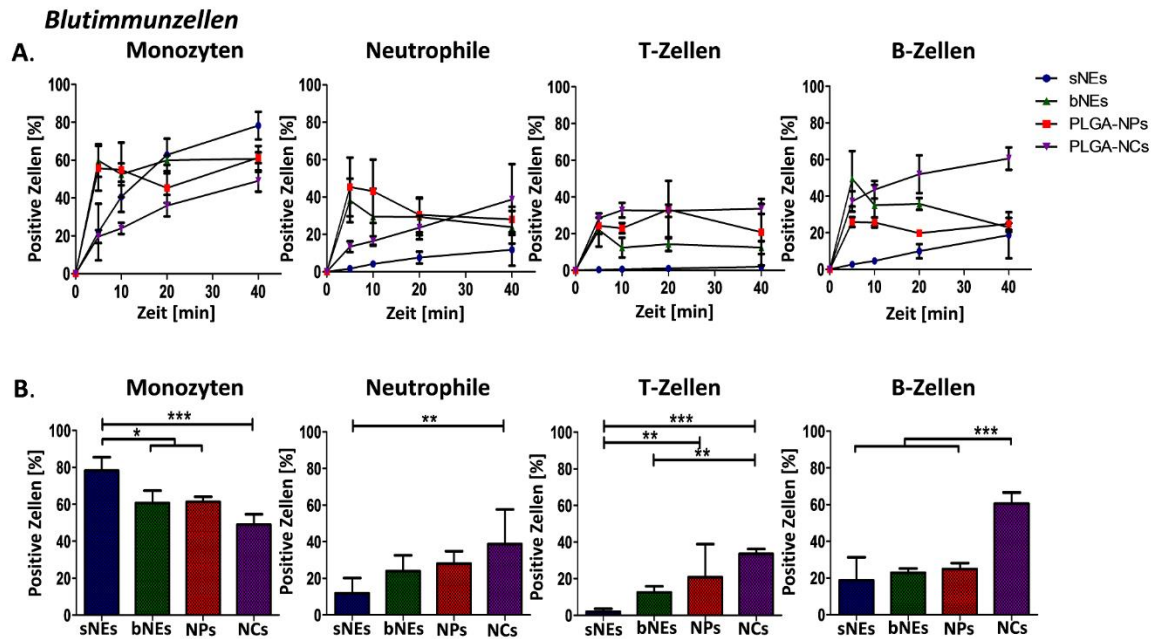
**Abbildung 3.5: Aufnahme von PFCs und PLGA-Nanopartikeln in Zelllinien.** **A.** Die Zelllinien CHO, RAW264.7, J774.2 und THP-1 wurden mit sNEs, bNEs, PLGA-NPs und PLGA-NCs in auf den <sup>19</sup>F-Gehalt normierten Konzentrationen inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0, 5, 10, 20, 40 und 80 min wurden Proben abgenommen. Die Untersuchungen der Proben erfolgten mittels Durchflusszytometrie. Oben: Vergleichende Darstellung des Zeitverlaufes. Unten: Aus der vorherigen Darstellung wurde der Zeitpunkt 80 min herausgegriffen. **B.** Die Zelllinien CHO und RAW264.7 wurden mit sNEs, bNEs und PLGA-NPs inkubiert. Nach 2 h wurden die Zellen fixiert und mittels kombinierter <sup>1</sup>H/<sup>19</sup>F-MRT das Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) des <sup>19</sup>F-Signals bestimmt. sNEs = 83 nm Cy5 PFC-Nanoemulsionen; bNEs = 299 nm Cy5 PFC-Nanoemulsionen; PLGA-NPs = 226 nm Atto647 PLGA-Nanopartikel; PLGA-NCs = 165 nm Atto647 PLGA-Nanokapseln. Für die statistische Auswertung wurde eine Zweifweg-Varianzanalyse mit Bonferroni Post-Hoc-Test (**A.**) bzw. eine Einweg-Varianzanalyse mit Bonferroni Post-Hoc Test (**B.**) verwendet. Daten sind Mittelwert ± SD von n = 6 individuellen Experimenten. \* = p<0,05, \*\* = p<0,01, \*\*\* = p<0,001.

### *Aufnahme von PFCs und PLGA-Nanopartikeln durch primäre Zellen*

Um Bedingungen zu schaffen, welche der *in vivo* Situation näher sind, sowie um zu untersuchen, in welche Zellsubtypen die Partikel *in vivo* aufgenommen werden könnten, wurden zusätzlich zu den Zellkulturstudien noch primäre Zellen aus dem Blut sowie aus den Organen des retikuloendothelialen Systems (Leber und Milz) gewonnen und mithilfe der Durchflusszytometrie die Partikelaufnahme in diese Zellen untersucht. Zu diesem Zweck wurden zum einen Blutimmunzellen *in vitro* über einen Zeitverlauf von 40 min mit sNEs, bNEs, PLGA-NPs und PLGA-NCs inkubiert. Analysiert wurde die Aufnahme der PFCs und PLGA-Nanopartikel durch Monozyten, Neutrophile, B- und T-Zellen. Die zeitlichen Verläufe der Partikelaufnahme ließen sich in der Regel für alle Partikel ungefähr mit einem Anstieg bis zum Zeitpunkt 5 min und dem damit einhergehenden Erreichen eines Plateaus beschreiben. Leichte Abweichungen von dieser Regel zeigten sich für einzelne Zellsubtypen. So kam es für alle verwendeten Partikel im Falle der Monozyten nach dem initialen steilen Anstieg zu einem weiteren leichten Anstieg der Zahl positiver Zellen bis zum Ende der Messphase. Bei den Neutrophilen und B-Zellen kam es für die bNEs und PLGA-NPs nach dem initialen steilen Anstieg hingegen zu einer leichten Reduktion der Zahl positiver Zellen. Die T-Zellen wiederum folgten für alle Partikel dem Muster eines steilen Anstiegs bis 5 min, gefolgt von einem Plateau bis zum Ende der Messphase (**Abbildung 3.6, A.**)

Es war auffällig, dass von den Monozyten ab dem Zeitpunkt 20 min insbesondere die sNEs besonders gut phagozytiert wurden, welche von den anderen untersuchten Zellsubpopulationen nur in sehr geringer Menge internalisiert wurden. Gleichzeitig zeigten die PLGA-NCs, welche von den beiden Lymphozytensubpopulationen von allen Partikeln am besten aufgenommen wurden, für die Monozyten, und zu den früheren Messzeitpunkten zudem für die Neutrophilen die schlechteste Aufnahme. Die PLGA-NPs unterschieden sich bezüglich ihrer Aufnahme durch Monozyten und Neutrophile hingegen so gut wie nicht von den bNEs. Bei B- und T-Zellen war die Präferenz der Aufnahme: PLGA-NCs > PLGA-NPs > bNEs > sNEs. Betrachtet man allgemein den Prozentsatz an positiven Zellen in den einzelnen Leukozytensubpopulationen, so lag im Falle der Monozyten die stärkste Aufnahme der Nanopartikel vor, gefolgt von den Neutrophilen und den B-Zellen, während die geringste Aufnahme bei den T-Zellen zu beobachten war. Um die Unterschiede der Aufnahme der Nanopartikel zwischen den einzelnen Zellpopulationen, sowie um Unterschiede in der Aufnahme der einzelnen Partikel bei Betrachtung einer Zellsubpopulation besser illustrieren und Signifikanzen der Unterschiede aufzeigen zu können, wurden zusätzlich zu den Zeitverläufen exemplarisch die 40 min Werte herausgegriffen und graphisch dargestellt (**Abbildung 3.6, B.**)

## Ergebnisse



**Abbildung 3.6: Aufnahme von PFCs und PLGA-Nanopartikeln durch murine Leukozyten.** Aus murinem Vollblut isolierte Leukozyten wurden mit sNEs, bNEs, PLGA-NPs und PLGA-NCs in auf den  $^{19}\text{F}$ -Gehalt normierten Konzentrationen inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0, 5, 10, 20 und 40 min wurden Proben abgenommen. Die Untersuchungen der Proben erfolgten mittels Durchflusszytometrie. **A.** Vergleichende Darstellung des Zeitverlaufs. **B.** Aus der vorherigen Darstellung wurde der Zeitpunkt 40 min herausgegriffen. sNEs = 83 nm Cy5 PFC-Nanoemulsionen; bNEs = 299 nm Cy5 PFC-Nanoemulsionen PLGA-NPs = 226 nm Atto647 PLGA-Nanopartikel; PLGA-NCs = 165 nm Atto647 PLGA-Nanokapseln. Für die statistische Auswertung wurde eine Zweiweg-Varianzanalyse mit Bonferroni Post-Hoc-Test verwendet. Daten sind Mittelwert  $\pm$  SD von  $n = 3 - 6$  individuellen Experimenten. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ .

Es wird in der Literatur beschrieben, dass injizierte PFCs sich insbesondere in den Organen des retikuloendothelialen Systems anreichern, wo sie vorrangig von den Zellen des mononukleären Phagozytensystems, d. h., von den Kupferzellen der Leber und den Makrophagen der Milz aufgenommen werden<sup>171</sup>. In der vorliegenden Studie sollte daher geklärt werden, von welchen Zellsubpopulationen die Partikel bei der *in vitro* Inkubation aus Lebern und Milzen isolierter primärer Zellen aufgenommen werden. Hierfür wurde nach Dissoziation von murinem Leber- und Milzgewebe mittels durchflusszytometrischer Messungen untersucht, in welchem Maße PFCs und PLGA-Nanopartikel über einen Zeitverlauf von 180 min von den verschiedenen Zellpopulationen (Immunzellen, Hepatozyten, Endothelzellen, Kupferzellen) der beiden Organe *in vitro* aufgenommen werden. Dieser, verglichen mit den vorherigen Studienteilen längere Zeitraum wurde gewählt, da sowohl Leber- als auch Milzzellen *in vitro* länger vital sind als Blutimmunzellen und davon ausgegangen wurde, dass über den längeren Beobachtungszeitraum Unterschiede zwischen den PFCs und PLGA-Nanopartikeln besser herausgestellt werden können.

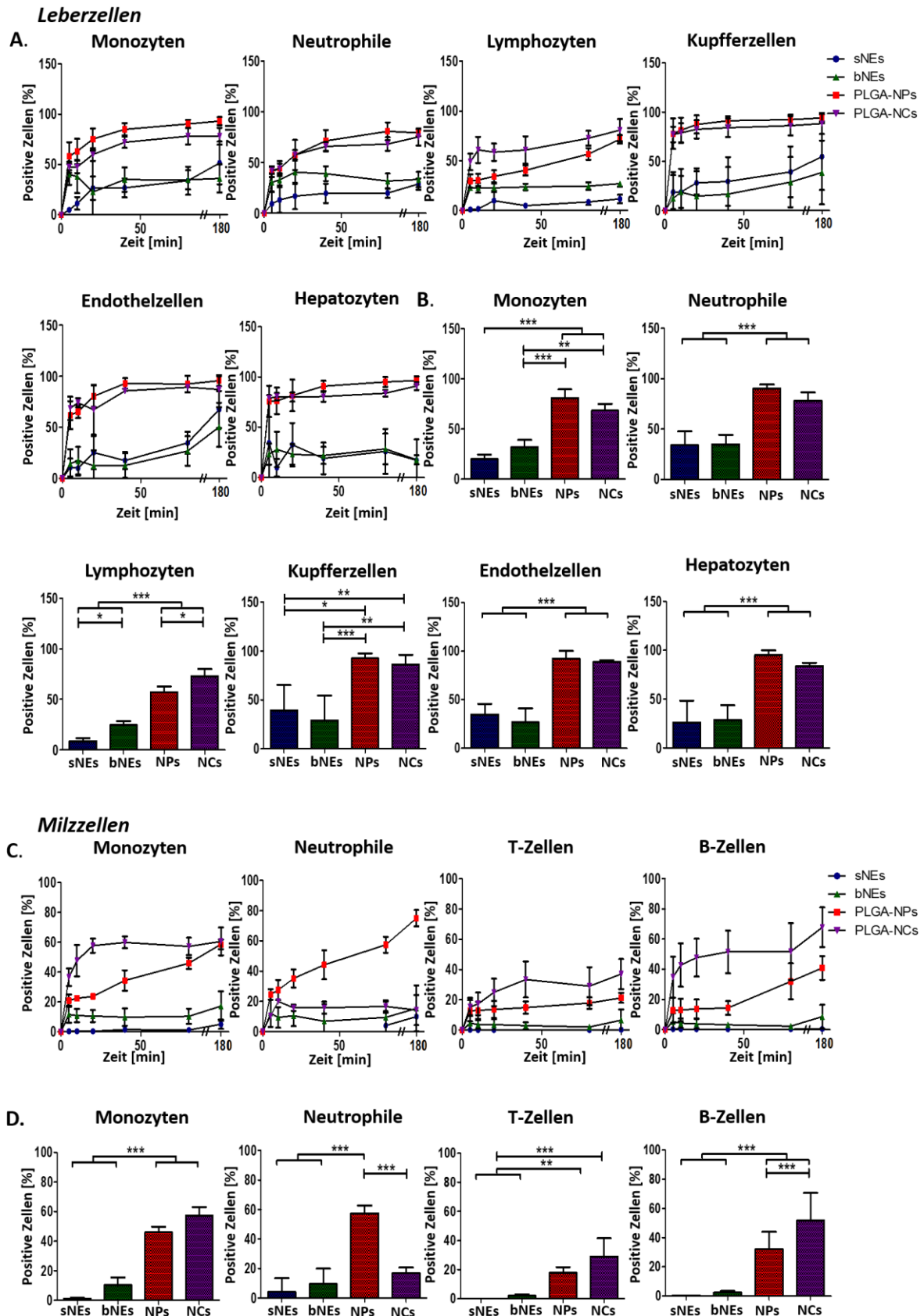
## Ergebnisse

In den aus den Lebern gewonnenen Immunzellen und *Hepatozyten* wurde für die Aufnahme der PFCs, anders als für die Kupfferzellen und Endothelzellen nach 5 min ein Plateau der Zahl positiver Zellen erreicht, das bis zum Ende der Messphase beibehalten wurde. Für die Kupffer- und Endothelzellen kam es hingegen, nach einem initialen steilen Anstieg bis 5 min, bis zum Ende der Messphase zu einer weiteren leichten Zunahme der Zahl positiver Zellen. Für die PLGA-Nanopartikel wurde für Lymphozyten, Kupfferzellen, Endothelzellen und *Hepatozyten*, anders als für Monozyten und Neutrophile, ebenfalls nach 5 min ein Plateau erreicht. Für die Monozyten und Neutrophilen erfolgte hingegen nach dem steilen initialen Anstieg ein fortgesetzter leichter Anstieg bis zum Ende der Messphase (**Abbildung 3.7, A.**). Die sNEs und bNEs wurden ungefähr gleich gut aufgenommen, mit einer etwas besseren Aufnahme der bNEs durch Monozyten und Neutrophile und einer etwas besseren Aufnahme der sNEs durch Kupfferzellen und Endothelzellen. Die Aufnahme der PLGA-Nanopartikel war derjenigen der PFCs in jeder Zellsubpopulation deutlich überlegen. In den Kupfferzellen und Endothelzellen nahm dieser Unterschied gegen Ende der Messphase aufgrund der oben beschriebenen langsamen Zunahme der Zahl der für PFCs positiven Zellen über die Messphase ab. Die PLGA-NPs und PLGA-NCs wurden beide ungefähr gleich gut aufgenommen, mit einer etwas besseren Aufnahme der PLGA-NPs durch Neutrophile und einer etwas besseren Aufnahme der PLGA-NCs durch Lymphozyten. Um Signifikanzen der Unterschiede der Aufnahme der PFCs und PLGA-Nanopartikel durch die einzelnen Zellsubpopulationen darstellen zu können sowie um die Unterschiede der Partikelaufnahme zwischen den einzelnen Zellpopulationen besser herausstellen zu können, wurden zusätzlich zu den Zeitverläufen exemplarisch die 180 min Werte graphisch miteinander verglichen (**Abbildung 3.7, B.**).

In den Milzzellen wurde für die sNEs/bNEs im Falle aller betrachteten Immunzellsubpopulationen (Monozyten, Neutrophile, T- und B-Zellen) nach 5 min ein Plateau der Zahl der positiven Zellen erreicht, das bis zum Ende der Messphase beibehalten wurde. Ein entsprechendes Plateau wurde für die PLGA-NPs im Falle der T-Zellen beobachtet, bei allen anderen Zellsubpopulationen kam es für diese Art der Partikel jedoch zu einem kontinuierlichen Anstieg der Zahl der positiven Zellen bis zum Ende der Messphase. Für die PLGA-NCs wurde bei den Neutrophilen nach 5 und bei den Monozyten nach 40 min ein Plateau erreicht, während bei den T- und B-Zellen ein kontinuierlicher Anstieg der Zahl der positiven Zellen bis zum Ende der Messphase zu beobachten war (**Abbildung 3.7, C.**). Die PLGA-Nanopartikel wurden von Monozyten, Neutrophilen, T- und B-Zellen deutlich stärker aufgenommen als die PFCs. Von den Neutrophilen abgesehen, war die Aufnahme der PLGA-NCs höher als die der PLGA-NPs. Die PFCs, insbesondere die sNEs wurden von keiner der Zellpopulationen in nennenswerter Menge aufgenommen, mit Ausnahme der Aufnahme der bNEs durch Monozyten und Neutrophile, die zwar gering, aber dennoch klar erkennbar war. Auch für die Milzzellen wurden, um Signifikanzen der Unterschiede der Aufnahme der PFCs und PLGA-Nanopartikel durch die einzelnen Immunzellsubpopulationen darstellen sowie um die Unterschiede der Partikelaufnahme zwischen den einzelnen Zellpopulationen

## Ergebnisse

besser herausstellen zu können, exemplarisch zusätzlich zu den Zeitverläufen Balkendiagramme der 180 min Werte abgebildet (**Abbildung 3.7, D.**).



**Abbildung 3.7: Aufnahme von PFCs und PLGA-Nanopartikeln durch Zellen aus murinem Leber- und Milzgewebe.** Aus murinem Leber- und Milzgewebe isolierte Zellen (Immunzellen, Hepatozyten, Endothelzellen, Kupfferzellen) wurden mit sNEs, bNEs, PLGA-NPs und PLGA-NCs in auf den  $^{19}\text{F}$ -Gehalt normierten Konzentrationen inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0, 5, 10, 20, 40, 80 und 180 min wurden Proben abgenommen. Die Untersuchungen der Proben erfolgten mittels Durchflusszytometrie. **(A. + C.)** Darstellung des Zeitverlaufes. **(B. + D.)** Aus der vorherigen Darstellung wurde der Zeitpunkt 180 min herausgegriffen. sNEs = 83 nm Cy5 PFC-Nanoemulsionen; bNEs = 299 nm Cy5 PFC-Nanoemulsionen; PLGA-NPs = 226 nm Atto647 PLGA-Nanopartikel; PLGA-NCs = 165 nm Atto647 PLGA-Nanokapseln. Für die statistische Auswertung wurde eine Zweifach-Varianzanalyse mit Bonferroni Post-Hoc-Test verwendet. Daten sind Mittelwert  $\pm$  SD von  $n = 3$  individuellen Experimenten. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ .

### 3.1.4 Mechanismen der Aufnahme von PFCs und PLGA-Nanopartikeln

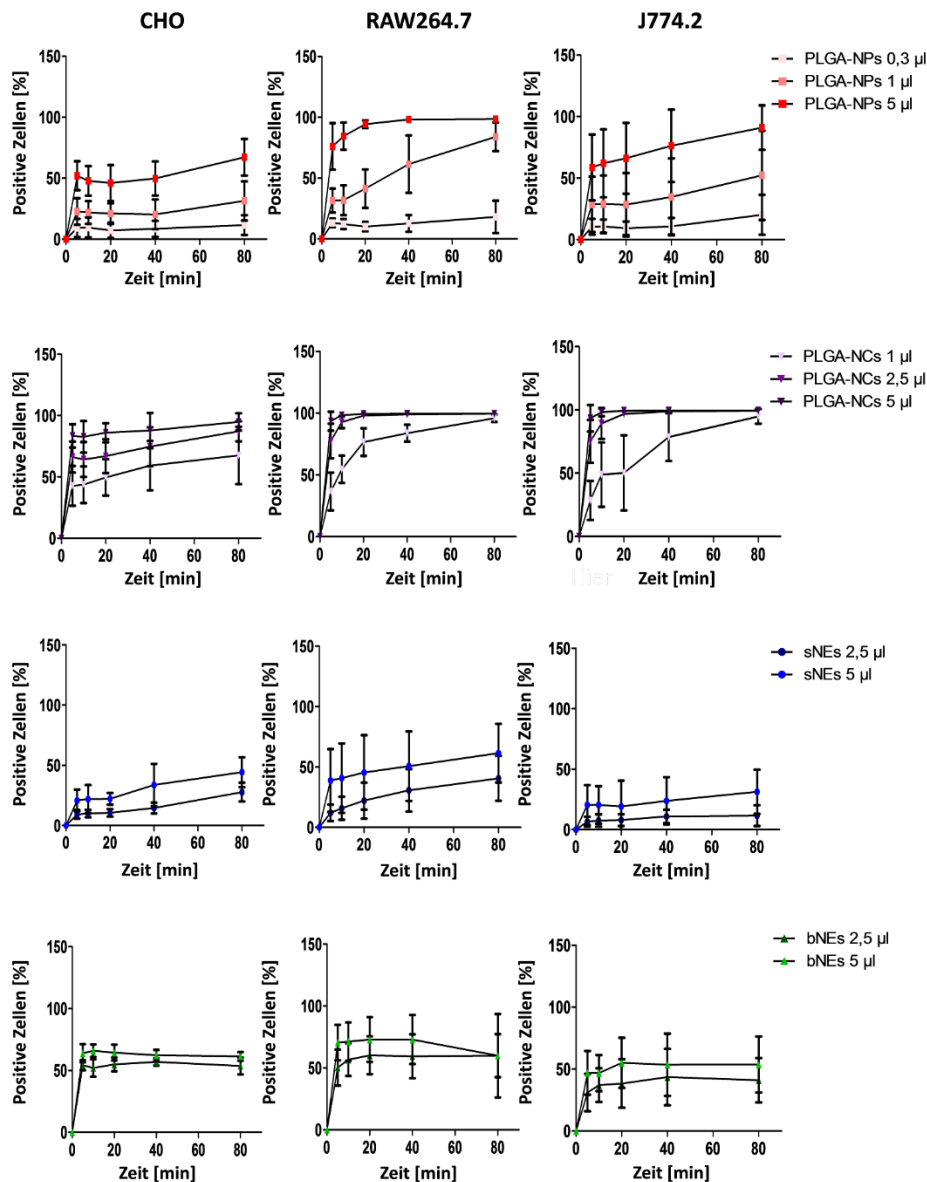
Im vorherigen Studienteil wurde beobachtet, dass PLGA-Nanopartikel besser von Zellen aufgenommen werden als PFCs. Um der Beantwortung der Frage nach dem Grund hierfür näher zu kommen, wurde im nächsten Schritt untersucht, von welchen Faktoren die Aufnahme der PFCs und PLGA-Nanopartikel in Zellen abhängt. Hierfür wurden kultivierte Zellen sowie primäre Leukozyten aus murinem Blut verwendet.

#### *Konzentrationsabhängigkeit der Partikelaufnahme*

Um zu untersuchen, inwieweit die Aufnahme von PFCs und PLGA-Nanopartikeln konzentrationsabhängig ist, wurden die einzelnen Partikel in verschiedenen Konzentrationen auf den Zellen inkubiert und Zellen im Anschluss durchflusszytometrisch sowie über  $^{19}\text{F}$ -MRT-Messungen gemessen.

Mittels Durchflusszytometrie war für die PFCs ein steiler Anstieg der Zahl positiver Zellen bis zum Zeitpunkt 5 min zu beobachten. Diesem folgte im Falle der sNEs eine nur noch leichte Zunahme der Zahl positiver Zellen bis zum Ende der Beobachtungsperiode, während die bNEs ein Plateau bis zum Ende der Messphase aufwiesen. Im Falle der PLGA-NPs wurden für die CHO und J774.2 Zellen ähnliche Zeitkinetiken beobachtet - ein steiler Anstieg bis 5 min nach Beginn der Inkubation, gefolgt von einem Plateau oder nur noch leichten Anstieg. Im Falle der RAW Makrophagen war für die PLGA-NPs eine initial langsamere Zunahme der Zahl positiver Zellen zu beobachten. Hier zeigte sich der steilste Anstieg zwar ebenfalls in den ersten 5 min, dann folgte jedoch für die höchste Konzentration eine weitere deutliche Zunahme bis 20 min und ein Anstieg bis 80 min bei der mittleren Konzentration. Lediglich für die niedrigste Konzentration wurde, ebenso wie für die PFCs, ein Plateau nach 5 min erreicht. Für die PLGA-NCs wurde für RAW264.7 und J774.2 Makrophagen ein leichter Anstieg bis zum Ende der Messphase für die niedrigste Konzentration beobachtet, während die hohen Konzentrationen nach 5 min ein Plateau erreichten. Für die CHO Zellen hingegen wiesen alle Konzentrationen einen Anstieg bis zum Ende der Messphase auf (**Abbildung 3.8**).

## Ergebnisse

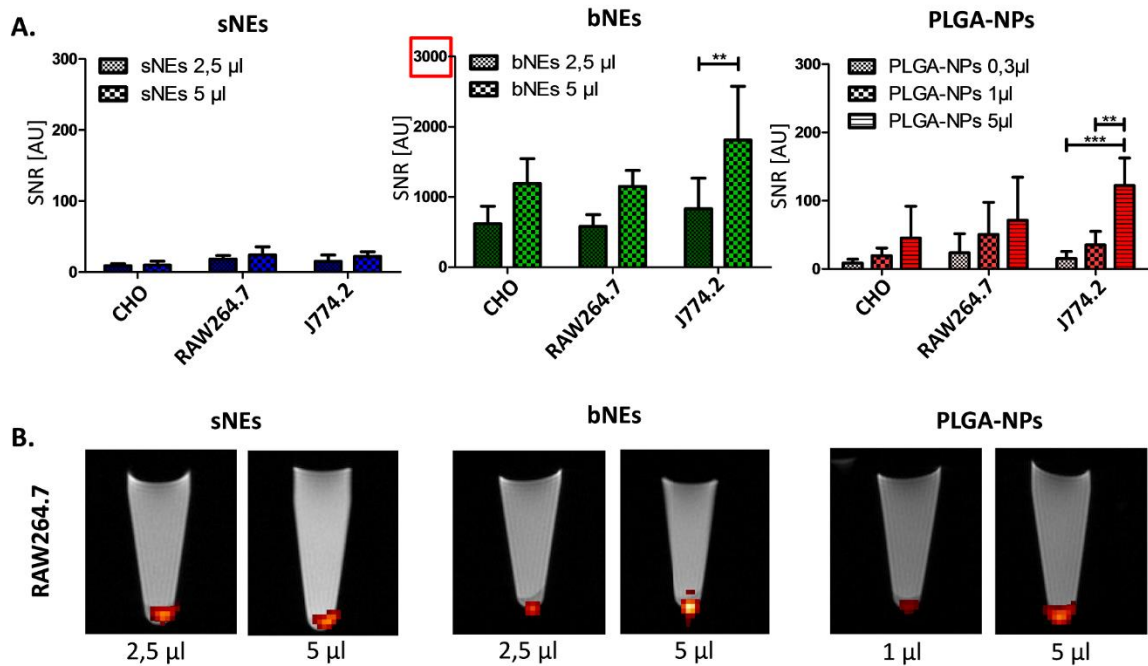


**Abbildung 3.8: Konzentrationsabhängige Aufnahme von PFCs und PLGA-Nanopartikeln durch Zelllinien.** Die Zelllinien CHO, RAW264.7 und J774.2 wurden mit sNEs, bNEs, PLGA-NPs und PLGA-NCs inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0, 5, 10, 20, 40 und 80 min wurden Proben abgenommen. Die Untersuchungen der Proben erfolgten mittels Durchflusszytometrie. sNEs = 83 nm Cy5 PFC-Nanoemulsionen; bNEs = 299 nm Cy5 PFC-Nanoemulsionen; PLGA-NPs = 226 nm Atto647 PLGA-Nanopartikel; PLGA-NCs = 165 nm Atto647 PLGA-Nanokapseln. Für die statistische Auswertung wurde eine Zweifweg-Varianzanalyse mit Bonferroni Post-Hoc-Test verwendet. Daten sind Mittelwert  $\pm$  SD von n = 5 - 6 individuellen Experimenten.

Zusätzlich zu den durchflusszytometrischen Untersuchungen erfolgte eine Quantifizierung des  $^{19}\text{F}$ -Gehaltes der Zellen für verschiedene Konzentrationen an PFCs und PLGA-NPs, die für 24 h auf den Zellen inkubiert worden waren. Hierbei zeigten sich zum einen Unterschiede in der Aufnahme der Partikel durch die verschiedenen Zelllinien, zudem fand sich sowohl für die PFCs als auch die PLGA-NPs für alle Zelllinien eine Konzentrationsabhängigkeit des  $^{19}\text{F}$ -Signals (**Abbildung 3.9**).



## Ergebnisse



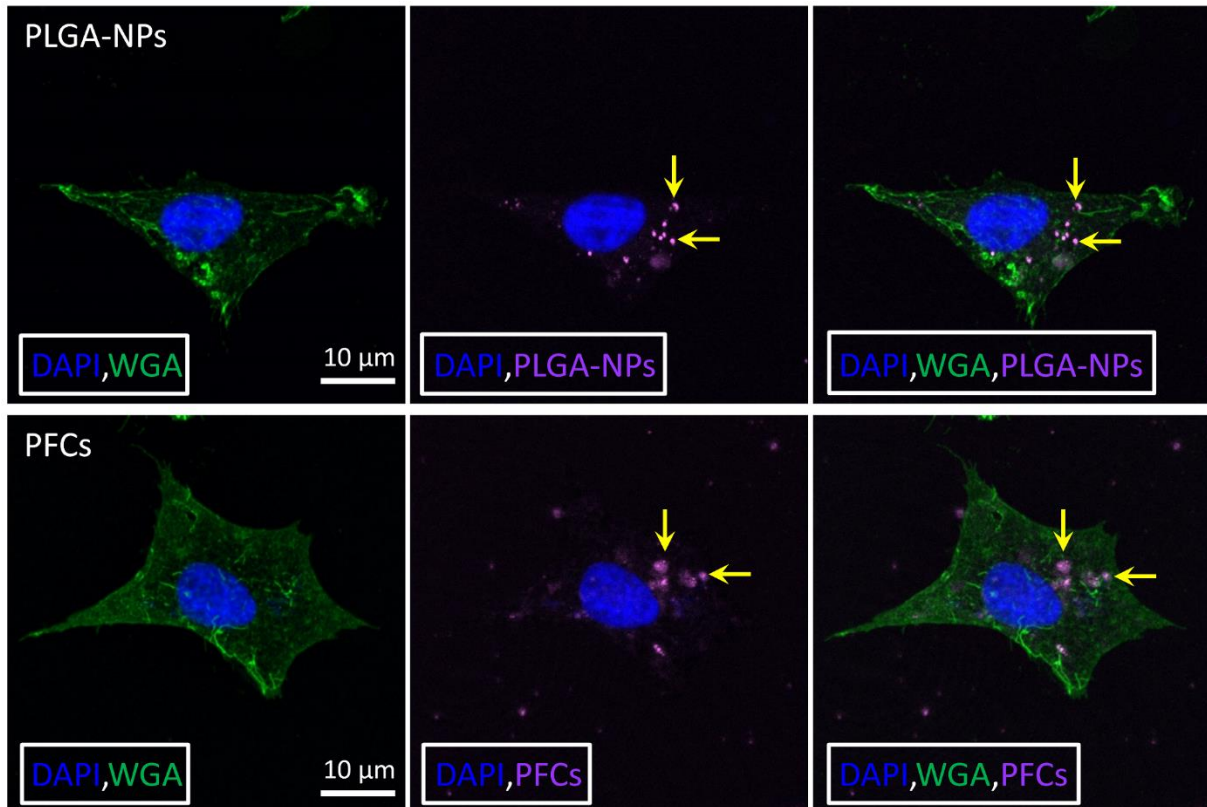
**Abbildung 3.9:**  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT Untersuchungen der Aufnahme verschiedener Konzentrationen von PFCs und PLGA-Nanopartikeln. CHO, RAW264.7 und J774.2 Zellen wurden mit sNEs, bNEs und PLGA-NPs inkubiert. Zum Zeitpunkt 24 h wurden die Zellen fixiert und mittels kombinierter  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT der  $^{19}\text{F}$ -Gehalt der Proben bestimmt. (A) Quantitative Analyse des  $^{19}\text{F}$  Signals durch Ermittlung des Signal-Rausch-Verhältnisses (SNR). (B) Repräsentative überlagerte  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT Bilder zur Darstellung des  $^{19}\text{F}$ -Gehaltes in aus RAW Makrophagen gewonnenen Zellpellets.  $^{19}\text{F}$ -Signal in rot dargestellt. sNEs = 83 nm Cy5 PFC-Nanoemulsionen; bNEs = 299 nm Cy5 PFC-Nanoemulsionen; PLGA-NPs = 226 nm Atto647 PLGA-Nanopartikel. Für die statistische Auswertung wurde eine Zweiweg-Varianzanalyse mit Bonferroni Post-Hoc-Test verwendet. Daten sind Mittelwert  $\pm$  SD von n = 5 - 6 individuellen Experimenten. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ .

PFCs und PLGA-Nanopartikel werden von Zellen internalisiert

Mittels Konfokalmikroskopie sollte die Aufnahme von PFCs und PLGA-NPs in CHO-Zellen, welche für 90 min mit Partikeln inkubiert wurden, untersucht werden. Der Hintergrund dieses Versuches war, dass die Untersuchung der zellulären Partikelaufnahme sowohl mittels durchflusszytometrischer Messungen als auch mittels  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT den Nachteil besitzt, dass nicht unterschieden werden kann, ob die Partikel wirklich aktiv von den Zellen aufgenommen wurden, oder ob sie lediglich passiv der Zelloberfläche anhaften. Um die Internalisierung darzustellen, wurde die Oberfläche der Zellen mit „wheat germ agglutinin“ (WGA) angefärbt. Die Cy5- bzw. Atto647-markierten Partikel konnten anhand der Fluorochrome detektiert werden.

In diesem Versuch zeigte sich sowohl für PFCs (rosa) als auch für PLGA-NPs (rosa) eine Akkumulation in vesikulären Strukturen innerhalb des Zytoplasmas, d. h. innerhalb der Grenzen der mittels WGA (grün) angefärbten Zellmembran der CHO-Zellen. Hingegen war keine Kolokalisation der Partikel mit dem Zellkern (DAPI, blau) zu beobachten. Die bei der Inkubation mit PFCs beobachteten Vesikel waren größer, verglichen mit den Vesikeln bei der Inkubation mit PLGA-NPs (**Abbildung 3.10**).

## Ergebnisse



**Abbildung 3.10: Internalisation von PFCs und PLGA-NPs in CHO-Zellen - Konfokalmikroskopie.** CHO Zellen wurden für 90 min mit PFCs bzw. PLGA-NPs in auf den  $^{19}\text{F}$ -Gehalt normierten Konzentrationen inkubiert. Nach Fixation und Anfärbung der Zellmembranen mit WGA sowie der Zellkerne mit DAPI erfolgten konfokalmikroskopische Untersuchungen. Cy5- bzw. Alexa647-positive Vesikel sind mit Pfeilen markiert. PFCs = Cy5 PFC-Nanoemulsionen; PLGA-NPs = Atto647 PLGA-Nanopartikel; WGA: „wheat germ agglutinin“, Alexa Fluor™ 488 Conjugate; DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol. Grün: WGA; Blau: DAPI; Rosa: Cy5 bzw. Atto647. 400 x Vergrößerung.

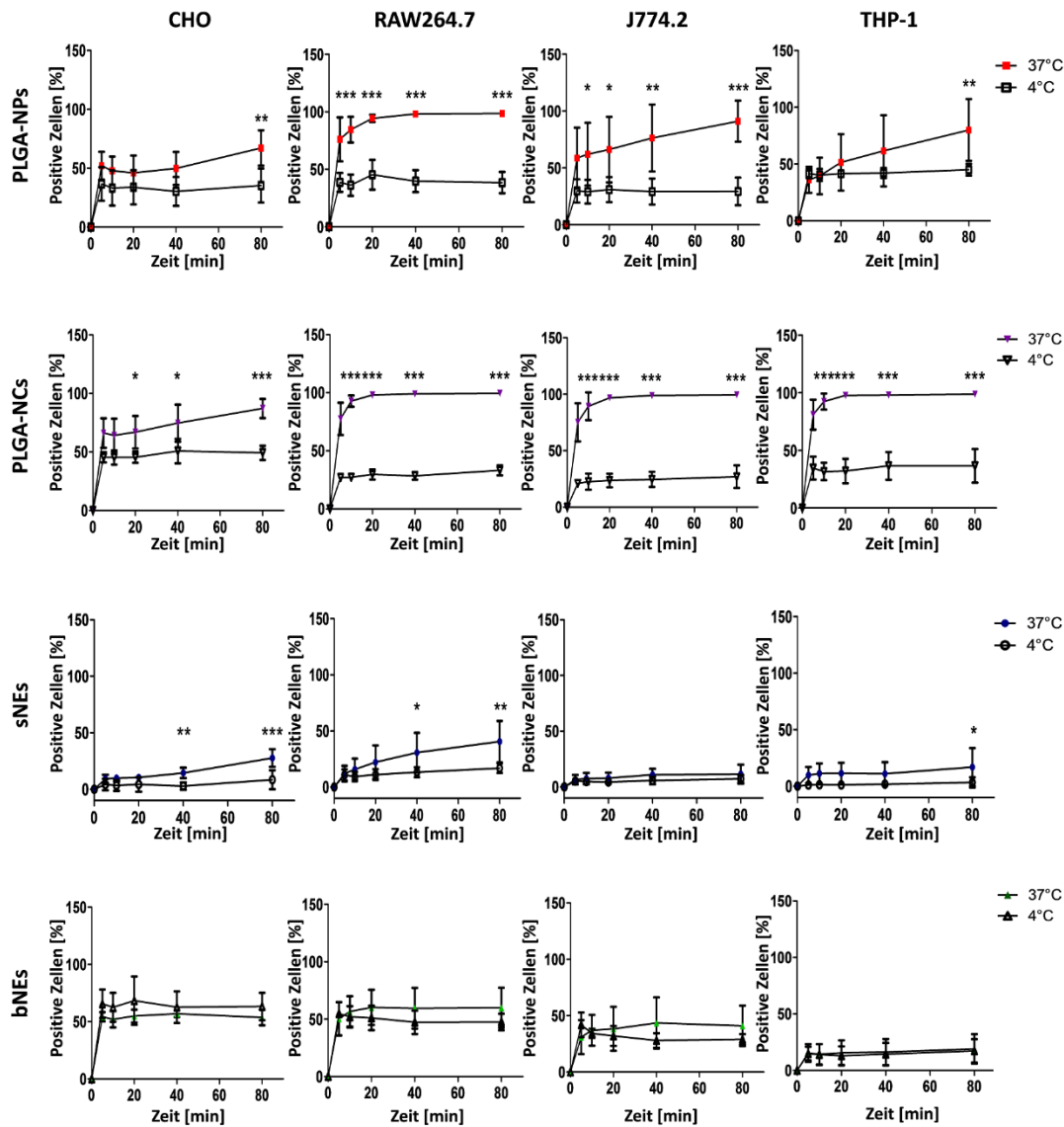
Die zelluläre Aufnahme von PFCs und PLGA-Nanopartikeln ist energieabhängig

Um die Mechanismen der zellulären Partikelaufnahme näher zu untersuchen, insbesondere um festzustellen, ob die Partikel den Zellen lediglich passiv anhaften oder ob sie von diesen durch energieabhängige Prozesse wie Endozytose oder Phagozytose aktiv aufgenommen werden, wurden in einer weiteren Reihe von Experimenten die Zellen (Kulturzellen, primäre Blutleukozyten) für durchflusszytometrische Untersuchungen der Partikelaufnahme zusätzlich bei einer Temperatur von 4 °C statt bei physiologischen 37 °C inkubiert. Bei 4 °C sind sämtliche ATP-verbrauchenden Prozesse, zu denen auch die aktive Partikelaufnahme (Endozytose/Phagozytose) gehört, inhibiert. So ist es möglich, auch mittels Durchflusszytometrie eine energieabhängige aktive Aufnahme der Partikel von einem energieunabhängigen Anhaften an der Zelloberfläche zu unterscheiden<sup>158</sup>.

Es zeigte sich, dass in den Kulturzellen die Zeitkinetiken der Partikelaufnahme bei der Inkubation bei 4 °C, bei unterschiedlich starker maximaler Aufnahme der einzelnen Partikel ähnlich waren. Sowohl bei PFCs als auch bei PLGA-Nanopartikeln wurde nach 5 min ein Plateau der Zahl positiver Zellen erreicht, das über die gesamte restliche Messphase beibehalten wurde. Abgesehen von den bNEs wurde dabei

## Ergebnisse

eine stärkere Aufnahme der Partikel bei 37 °C, verglichen mit 4 °C beobachtet. Die bNEs wiesen hingegen kaum Unterschiede in der Aufnahme zwischen den beiden Temperaturen auf (**Abbildung 3.11**).

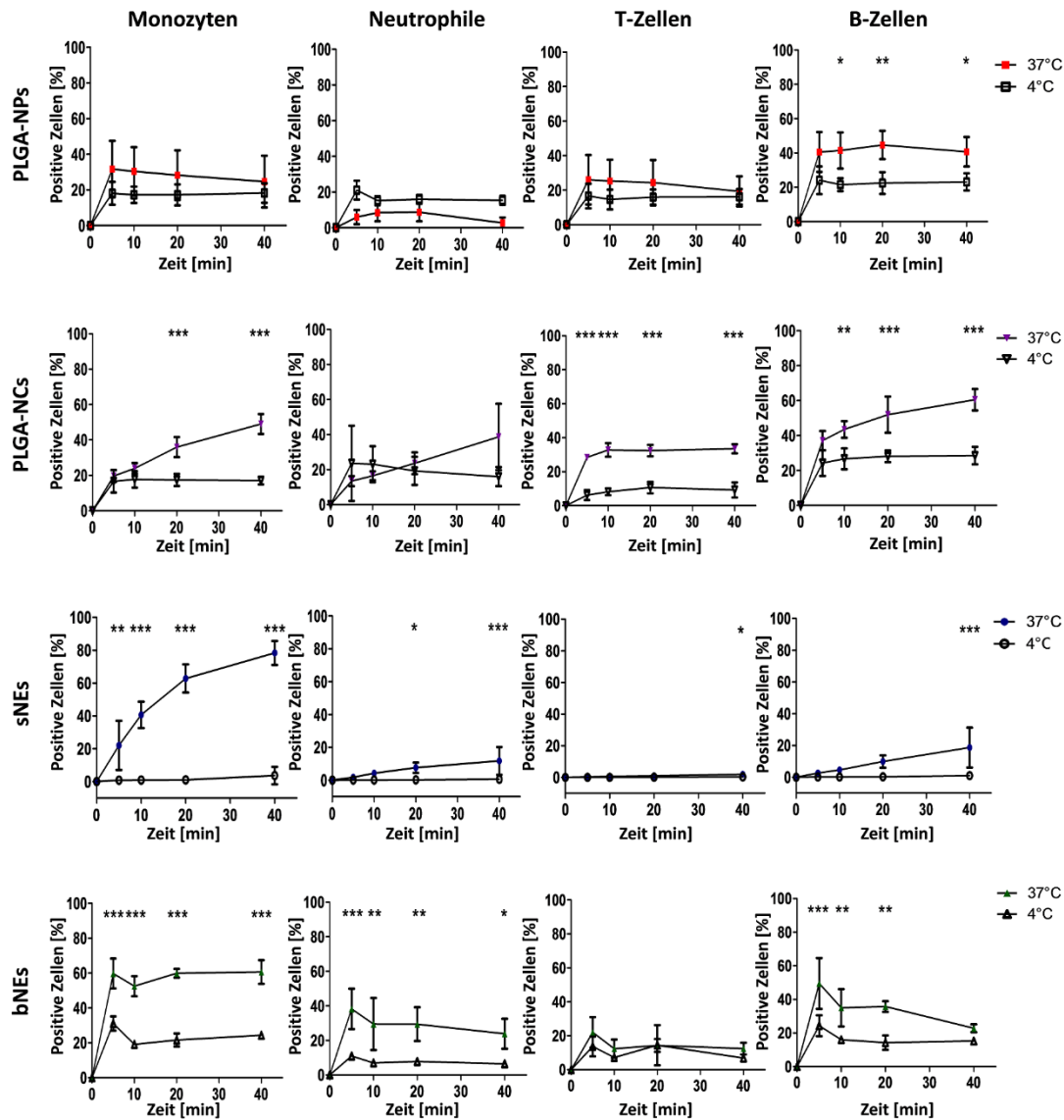


**Abbildung 3.11: Energieabhängigkeit der Partikelaufnahme durch Zelllinien.** CHO, RAW264.7, J774.2 und THP-1 Zellen wurden mit sNEs, bNEs, PLGA-NPs und PLGA-NCs in auf den  $^{19}\text{F}$ -Gehalt normierten Konzentrationen inkubiert. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C und bei 37 °C. Zu den Zeitpunkten 0, 5, 10, 20, 40 und 80 min wurden Proben abgenommen. Die Untersuchungen der Proben erfolgten mittels Durchflusszytometrie. sNEs = 83 nm Cy5 PFC-Nanoemulsionen; bNEs = 299 nm Cy5 PFC-Nanoemulsionen; PLGA-NPs = 226 nm Atto647 PLGA-Nanopartikel; PLGA-NCs = 165 nm Atto647 PLGA-Nanokapseln. Für die statistische Auswertung wurde eine Zweiweg-Varianzanalyse mit Bonferroni Post-Hoc-Test verwendet. Daten sind Mittelwert  $\pm$  SD von n = 3 - 6 individuellen Experimenten. \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01, \*\*\* = p < 0,001.

Keine der aus peripherem Blut gewonnenen Leukozytensubpopulationen zeigte in durchflusszytometrischen Untersuchungen nach der Inkubation mit sNEs bei 4 °C eine nennenswerte Menge an sNE-positiven Zellen. Für die bNEs und noch mehr für die PLGA-NPs und PLGA-NCs waren die Mengen positiver Zellen bei der Inkubation bei 4 °C höher als für die sNEs. Auch im Falle dieser drei Partikel wurden

## Ergebnisse

jedoch insbesondere zu Zeitpunkten, zu denen eine starke Partikelaufnahme bei 37 °C detektiert werden konnte, deutlich mehr Zellen bei Körpertemperatur aufgenommen. Bei 4 °C war für die bNEs für jede der untersuchten Zellsubpopulationen ein Anstieg bis 5 min, gefolgt von einer leichten Reduktion bis auf ein Plateau zu beobachten, während für die PLGA-NPs und PLGA-NCs ein Plateau bereits nach 5 min erreicht wurde (**Abbildung 3.12**).



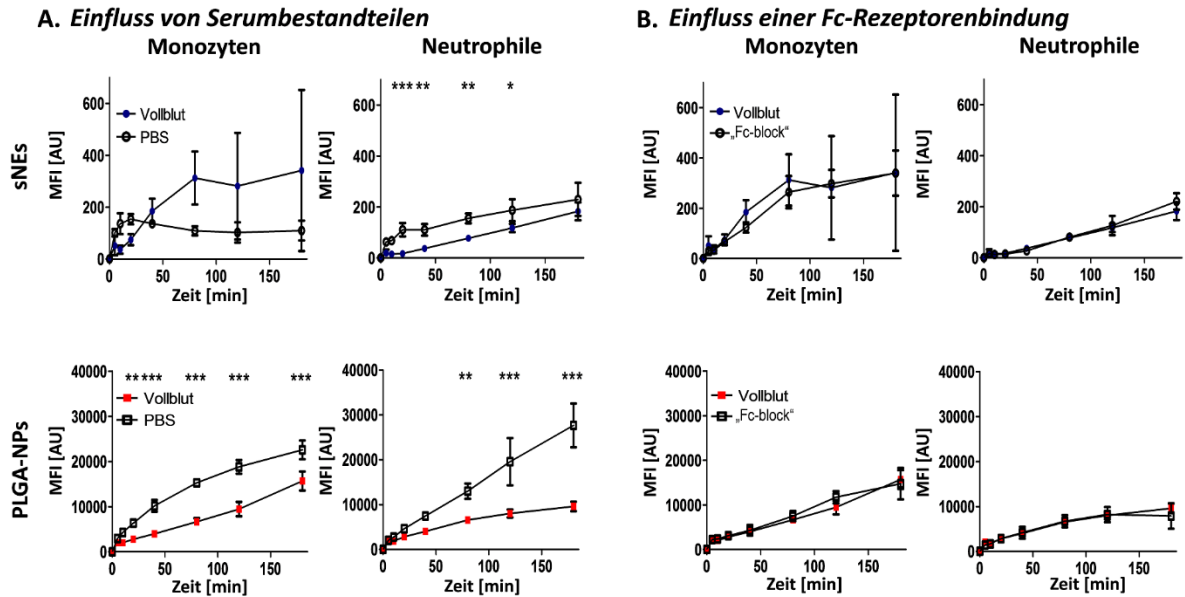
**Abbildung 3.12: Energieabhängigkeit der Partikelaufnahme durch murine Leukozyten.** Aus murinem Vollblut isolierte Leukozyten wurden mit sNEs, bNEs, PLGA-NPs und PLGA-NCs in auf den  $^{19}\text{F}$ -Gehalt normierten Konzentrationen inkubiert. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C und bei 37 °C. Zu den Zeitpunkten 0, 5, 10, 20 und 40 min wurden Proben abgenommen. Die Untersuchungen der Proben erfolgten mittels Durchflusszytometrie. sNEs = 83 nm Cy5 PFC-Nanoemulsionen; bNEs = 299 nm Cy5 PFC-Nanoemulsionen; PLGA-NPs = 226 nm Atto647 PLGA-Nanopartikel; PLGA-NCs = 165 nm Atto647 PLGA-Nanokapseln. Für die statistische Auswertung wurde eine Zweifweg-Varianzanalyse mit Bonferroni Post-Hoc-Test verwendet. Daten sind Mittelwert  $\pm$  SD von n = 3 - 6 individuellen Experimenten. \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01, \*\*\* = p < 0,001.

### *Einfluss von Serumbestandteilen und der Bindung von Nanopartikeln an Fc-Rezeptoren auf die Partikelaufnahme*

In diesem Versuchsteil wurde untersucht, ob Serumbestandteile einen Einfluss auf die Partikelaufnahme besitzen und welchen Einfluss die Bindung an Fc-Rezeptoren, welche ebenso wie Mannoserezeptoren entscheidend an der Aufnahme von Nanopartikeln durch Phagozyten beteiligt sind<sup>208,209</sup> auf die Partikelaufnahme hat. Diese beiden Wege der Partikelaufnahme wurden ebenso in vorherigen Studien anderer Autoren untersucht<sup>163</sup>. Zur Beantwortung der Frage nach der Bedeutung von Serumbestandteilen wurde Vollblut mehrfach mit PBS gewaschen, um das Serum zu entfernen, und schließlich den Blutzellen eine dem Volumen des entfernten Serums entsprechende Menge an PBS zugesetzt. Für die Untersuchung der Bedeutung von Fc-Rezeptoren für die Partikelaufnahme wurde Vollblut mit „Fc-block“ versetzt, um eine Bindung der Partikel an die Fc-Rezeptoren der Immunzellen zu unterbinden. Die Aufnahme von Partikeln durch Leukozyten des serumfreien bzw. mit „Fc-block“ versetzten Blutes wurde mit der durch Leukozyten aus unbehandeltem Vollblut verglichen. Für diesen Versuch wurden sNEs und PLGA-NPs verwendet. So war es möglich, die Bedeutung verschiedener für die zelluläre Aufnahme verantwortlicher Mechanismen für beide Arten von Ummantelungen zu untersuchen. bNEs als der Größe der PLGAs entsprechende Partikel wurden nicht untersucht, da sich bei diesen im vorangehenden Studienteil zur energieabhängigen Partikelaufnahme eine starke Sedimentation fand und somit nicht klar zwischen aktiver Aufnahme und passivem Anheften an den Zellen getrennt werden konnte.

Die sNEs wurden in Abwesenheit von Serum deutlich schlechter durch Monozyten aufgenommen als bei der Inkubation von Vollblut. Im Falle der Neutrophilen war die Aufnahme der sNEs in Abwesenheit von Serum dagegen sogar besser. Die PLGA-NPs wurden sowohl durch Monozyten als auch durch Neutrophile in serumfreiem Blut deutlich besser aufgenommen als in Vollblut (**Abbildung 3.13, A**). Bei der Inkubation mit „Fc-block“ waren sowohl für die sNEs als auch für die PLGA-NPs keine Unterschiede in der Aufnahme durch Monozyten und Neutrophile zwischen dem Vollblut ohne und dem mit „Fc-block“ versetzten Blut zu beobachten (**Abbildung 3.13, B**).

## Ergebnisse

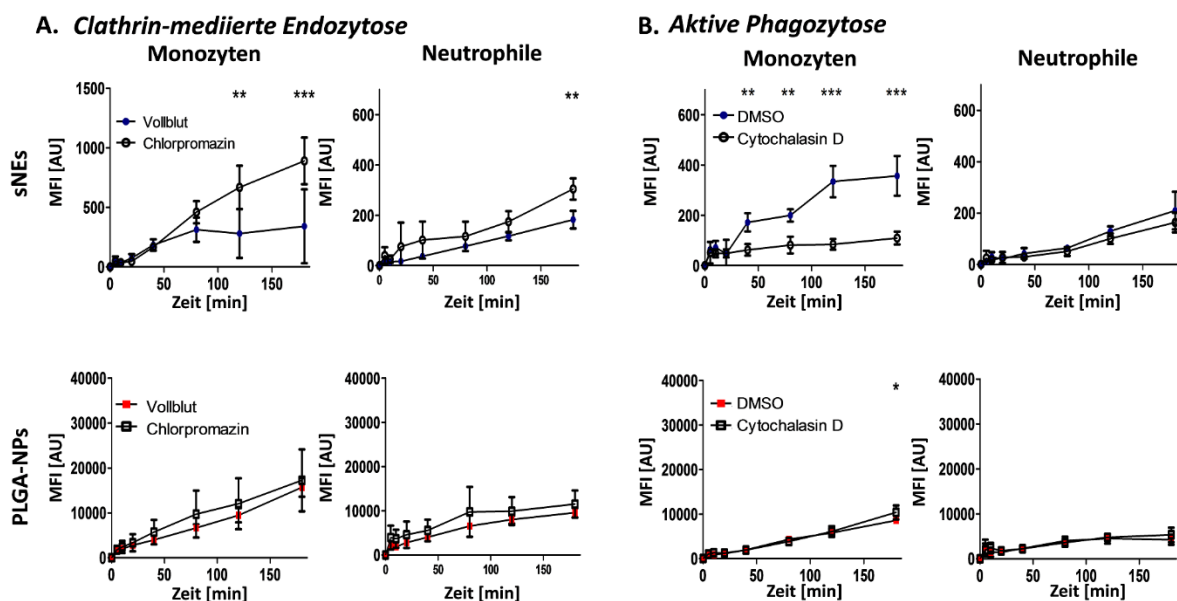


**Abbildung 3.13: Einfluss von Serumbestandteilen und der Bindung an Fc-Rezeptoren auf die Aufnahme von PFCs und PLGA-Nanopartikeln.** A. Bei murinem Blut wurde das Serum durch PBS ersetzt oder (B.) das Vollblut wurde mit „Fc-block“ versetzt. Es erfolgte eine Inkubation mit sNEs und PLGA-NPs. Zu den Zeitpunkten 0, 5, 10, 20, 40, 80, 120 und 180 min wurden Proben entnommen. Die Untersuchungen der Proben erfolgten mittels Durchflusszytometrie. sNEs = 83 nm Cy5 PFC-Nanoemulsionen; bNEs = 299 nm Cy5 PFC-Nanoemulsionen; PLGA-NPs = 226 nm Atto647 PLGA-Nanopartikel. MFI = mittlere Fluoreszenzintensität. Für die statistische Auswertung wurde eine Zweiweg-Varianzanalyse mit Bonferroni Post-Hoc-Test verwendet. Daten sind Mittelwert  $\pm$  SD von  $n = 3$  individuellen Experimenten. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ .

### Hemmung der Clathrin-abhängigen Endozytose und der Phagozytose

Als weiterer Schritt sollte untersucht werden, ob eine unspezifische Hemmung der Clathrin-medierten Endozytose durch Chlorpromazin oder eine Hemmung der Phagozytose durch Cytochalasin D eine Reduktion der Partikelaufnahme bewirken. Hierzu wurden dem Vollblut  $10 \mu\text{g}$  Chlorpromazin bzw.  $10 \mu\text{M}$  Cytochalasin D zugesetzt und die Aufnahme der Partikel durch die verschiedenen Leukozytensubgruppen in so behandeltem Blut mit der durch die Leukozyten in unbehandeltem Kontrollblut verglichen (**Abbildung 3.14**). Auch in diesem Versuchsteil wurde die Aufnahme von sNEs und PLGA-NPs durch die Immunzellen untersucht.

Überraschenderweise zeigte sich eine bessere Aufnahme der sNEs durch Monozyten und Neutrophile, wenn das Blut mit Chlorpromazin versetzt wurde, wobei der Effekt mit längerer Inkubationsdauer zunahm (**Abbildung 3.14, A**). Für die Aufnahme der PLGA-NPs waren jedoch keine Effekte des Chlorpromazins auf die Partikelaufnahme zu detektieren (**Abbildung 3.14, A**). Bei der Behandlung mit Cytochalasin D zeigte sich eine deutliche Reduktion der Aufnahme der sNEs durch Monozyten (**Abbildung 3.14, B**), jedoch nicht durch Neutrophile. Für die Aufnahme von PLGA-NPs zeigte Cytochalasin D hingegen keinen Effekt auf die Partikelaufnahme.



**Abbildung 3.14: Einfluss der Clathrin-medierten Endozytose sowie der Phagozytose auf die Aufnahme von PFCs und PLGA-Nanopartikeln durch murine Leukozyten.** A. Murines Vollblut wurde mit 10 µg Chlorpromazin oder (B.) mit 10 µM Cytochalasin D sowie mit sNEs bzw. PLGA-NPs inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0, 5, 10, 20, 40, 80, 120 und 180 min wurden Proben entnommen. Die Untersuchungen der Proben erfolgten mittels Durchflusszytometrie. NEs = 83 nm Cy5 PFC-Nanoemulsionen; PLGA-NPs = 226 nm Atto647 PLGA-Nanopartikel. MFI = mittlere Fluoreszenzintensität. Für die statistische Auswertung wurde eine Zweifweg-Varianzanalyse mit Bonferroni Post-Hoc-Test verwendet. Daten sind Mittelwert ± SD von n = 3 individuellen Experimenten. \* = p<0,05, \*\* = p<0,01, \*\*\* = p<0,001.

### 3.1.5 PFCs und PLGA-Nanopartikel besitzen keine zytotoxischen Eigenschaften

Es ist bekannt, dass Perfluorkarbone chemisch und biologisch inert und daher nicht toxisch sind<sup>118</sup>. Auch die in dieser Studie verwendeten umhüllenden Substanzen, d. h. die aus Lipoid E80S stammenden Phospholipide<sup>140,141</sup> sowie PLGA<sup>123,144–146,171</sup> sind nicht toxisch. Jedoch gibt es bisher keine systematischen Untersuchungen zytotoxischer Effekte speziell der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Partikel. Daher wurde in diesem Studienteil die akute Zytotoxizität der PFCs und PLGA-Nanopartikel auf Zelllinien sowie primäre Zellen genauer untersucht. Zudem sollte mit diesem Studienteil die Ursache der schnellen Ausscheidung der PLGA-NPs aus dem Körper weiter erforscht werden. So wäre es möglich, dass die PLGA-NPs zytotoxische Effekte haben. Dies würde zu einer vermehrten Apoptose der Zellen nach Partikelaufnahme führen, was wiederum zu einer schnelleren Freisetzung des PFCE aus den Zellen mit folgender effizienterer Ausscheidung aus dem Körper führen könnte.

Das erste Ziel des Versuches war es, die Zahl lebender Zellkulturzellen nach der Inkubation mit Partikeln zu quantifizieren. Dies erfolgte durchflusszytometrisch mithilfe einer Lebend-Tot Färbung. Hierfür wurde 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) verwendet, ein Fluoreszenzfarbstoff, der an DNA bindet. Da DAPI die Membran lebender Zellen nicht durchtreten kann, färbt es nur die Kerne toter Zellen an. Des Weiteren wurde anhand der mikroskopischen morphologischen Beurteilung von für 24 h mit Partikeln

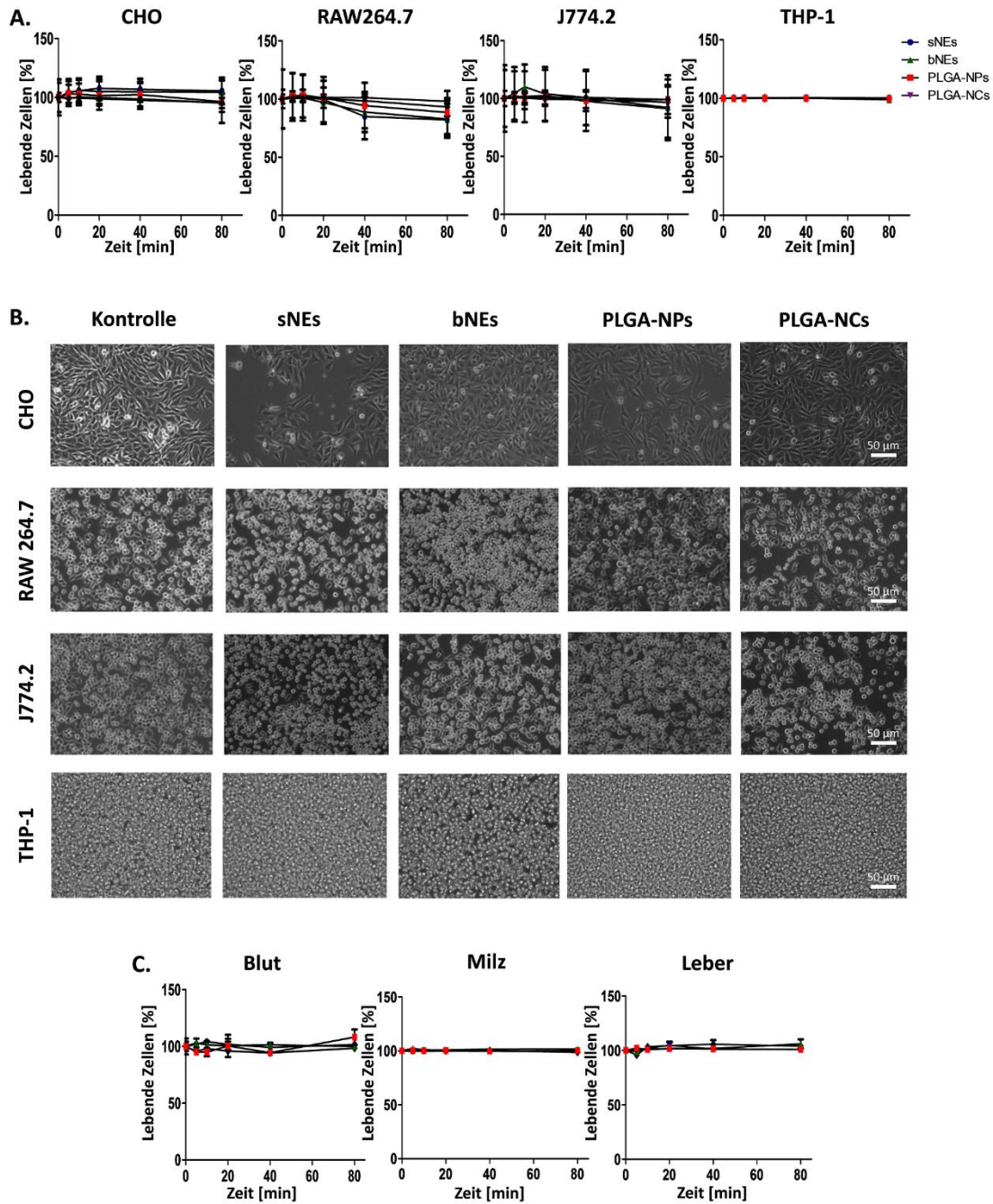
## Ergebnisse

inkubierten Zellkulturen untersucht, ob sich Hinweise auf akute zytotoxische Effekte der Partikel fanden. In den durchflusszytometrischen Untersuchungen zeigte sich in der unbehandelten Kontrolle für alle verwendeten Zelllinien und Partikel über die Inkubationsdauer von 80 min nur eine minimale Reduktion der Zahl lebender Zellen (DAPI-) (**Abbildung 3.15, A.**). Bei mikroskopischer Beurteilung der Zellkulturen nach 24 h Partikelinkubation fanden sich ebenfalls keine Hinweise auf morphologische Veränderungen der Zellen, zytotoxische Effekte der Partikel oder Veränderungen der Zelldichte (**Abbildung 3.15, B.**).

Wie bereits bei den Untersuchungen zur zellulären Partikelaufnahme, war es auch in diesem Studienabschnitt zur akuten Zytotoxizität das Ziel, Bedingungen zu untersuchen, welche der *in vivo* Situation möglichst nahekommen. Entsprechend wurden primäre Zellen (murine Blutzellen, aus murinen Lebern und Milzen isolierte Zellen) gewonnen, mit Partikeln inkubiert und mittels Durchflusszytometrie die Mortalität der Zellen untersucht. In der unbehandelten Kontrolle zeigte sich für murine Blutzellen innerhalb der Inkubationsdauer von 80 min keine nennenswerte Reduktion der Zahl lebender Zellen. Auch für die PFCs und PLGA-Nanopartikel wurde keine erhöhte Zahl an toten Leukozyten, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt festgestellt. Für aus murinen Milzen und Lebern gewonnene Zellen zeigte sich in der unbehandelten Kontrolle keine erhöhte Zahl toter Zellen über die Inkubationszeit von 80 min. Auch bei Vergleich der mit PFCs oder PLGA-Nanopartikeln inkubierten Zellen mit der unbehandelten Kontrolle wurden zu den einzelnen Zeitpunkten keine erhöhten Zahlen an toten Zellen beobachtet.



## Ergebnisse



**Abbildung 3.15: Vitalität von Zelllinien sowie primären Zellen nach Inkubation mit PFCs und PLGA-Nanopartikeln.** A. + B. CHO, RAW264.7 und J774.2 Zellen sowie (C.) aus murinem Blut, Milzen und Lebern gewonnene Zellen wurden mit sNEs, bNEs, PLGA-NPs und PLGA-NCs inkubiert. A. +C. Zu den Zeitpunkten 0, 5, 10, 20, 40 und 80 min wurden Proben entnommen. Die Untersuchungen der Proben erfolgten mittels Durchflusszytometrie. B. Nach 24 h wurden die Zellkulturen einer mikroskopischen morphologischen Beurteilung unterzogen, in der auf Hinweise akuter Zytotoxizität, veränderte Morphologie der Zellen oder verminderte Zellzahl geachtet wurde. sNEs = 83 nm Cy5 PFC-Nanoemulsionen; bNEs = 299 nm Cy5 PFC-Nanoemulsionen; PLGA-NPs = 226 nm Atto647 PLGA-Nanopartikel; PLGA-NCs = 165 nm Atto647 PLGA-Nanokapseln. Für die statistische Auswertung wurde eine Zweifweg-Varianzanalyse mit Bonferroni Post-Hoc-Test verwendet. Daten sind Mittelwert  $\pm$  SD von  $n = 3$  individuellen Experimenten.

### 3.2 Einfluss von sterilen und nicht-sterilen Entzündungsprozessen auf die zelluläre Aufnahme und Gewebeverteilung von PFCs

Ziel dieses Teils der Arbeit war, anhand zweier verschiedener Entzündungsmodelle – dem Myokardinfarkt (MI) als Modell für eine sterile Entzündung sowie dem Matrigel/LPS-Modell als Modell für eine bakterielle Entzündung – systematisch das  $^{19}\text{F}$ -Signal im Entzündungsherd, in Blut und in peripheren Organen (Leber, Milz, Knochenmark, Lymphknoten) vergleichend zu charakterisieren. Der Hintergrund dieser Versuche war, dass bisher noch keine systematische Charakterisierung des  $^{19}\text{F}$ -Signals in Blut und den Organen des retikuloendothelialen Systems unter nicht-entzündlichen und entzündlichen Bedingungen durchgeführt wurde. Aus zahlreichen Untersuchungen ist zwar bekannt, dass bei Myokardinfarkt ein deutliches  $^{19}\text{F}$ -Signal im Knochenmark des *Sternums* nachgewiesen werden kann<sup>110</sup>. Ob dieses Signal jedoch unter entzündlichen Bedingungen gegenüber dem Ruhezustand verändert ist und ob die Art der Entzündung hierbei eine Rolle spielt, wurde noch nicht untersucht. Zudem sollte der Ursprung des  $^{19}\text{F}$ -Signals in Entzündungsherden auf zellulärer Ebene genauer untersucht werden. Zu diesem Zwecke wurden *in vitro* und *in vivo* vergleichende Partikelstudien an Immunzellen durchgeführt, welche aus dem Blut von Tieren mit und ohne Entzündung sowie direkt aus Entzündungsherden gewonnenen wurden. Darüber hinaus wurden Kulturzellen und primäre Zellen *in vitro* mit verschiedenen Entzündungsmediatoren stimuliert und der Einfluss dieser Behandlung auf die zelluläre PFC-Aufnahme untersucht.

#### 3.2.1 $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT von Entzündungsherd, Blut und peripheren Organen

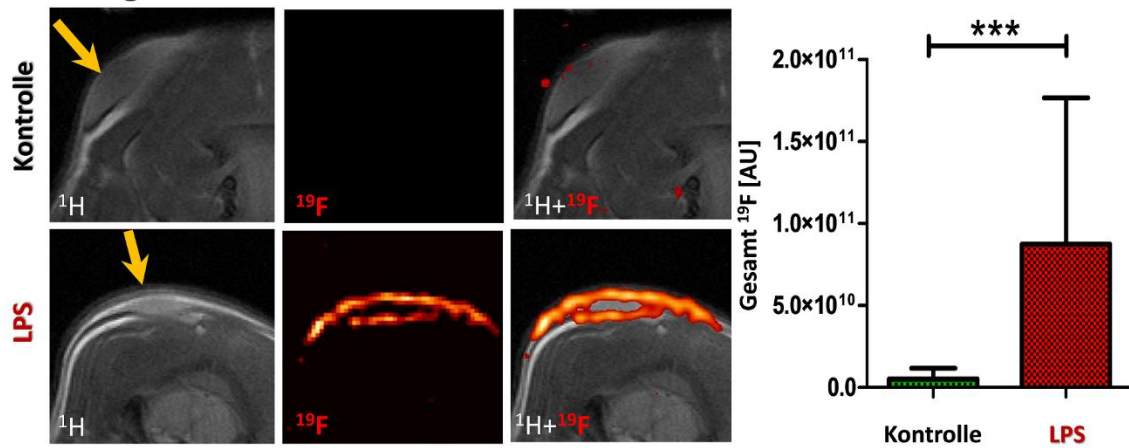
Für diese Studie wurden zwei verschiedene Entzündungsmodelle gewählt. Als Modell für eine nicht-sterile Entzündung wurde das Matrigel/LPS-Modell verwendet. Bei diesem wird Matrigel (Lösung von Bestandteilen extrazellulärer Matrix), versetzt mit LPS s. c. in den Nacken von Mäusen implantiert, wo das LPS eine milde lokale Entzündungsreaktion auslöst<sup>170,210,211</sup>. Kontrolltieren wurde Matrigel ohne Zusatz von LPS implantiert. Als Modell für eine sterile Entzündung wurde der Myokardinfarkt gewählt. Dieser wurde experimentell dadurch ausgelöst, dass die linke Coronararterie (LAD) temporär verschlossen wurde, wodurch eine Ischämie des Myokards induziert wurde. In dem hier gewählten Modell erfolgte durch Wiedereröffnung des Gefäßes im Anschluss an 50 min Ischämie eine Reperfusion des Gewebes. In der vorliegenden Studie wurden als Kontrolle Tiere verwendet, bei denen die gleiche Operation durchgeführt, die LAD jedoch nicht verschlossen wurde („sham“ OP). Die auf den Myokardinfarkt folgenden Veränderungen im Herzgewebe beinhalten auch eine Entzündungsreaktion.

### *<sup>1</sup>H/<sup>19</sup>F-MRT von Matrigel- „plugs“ und infarzierten Herzen*

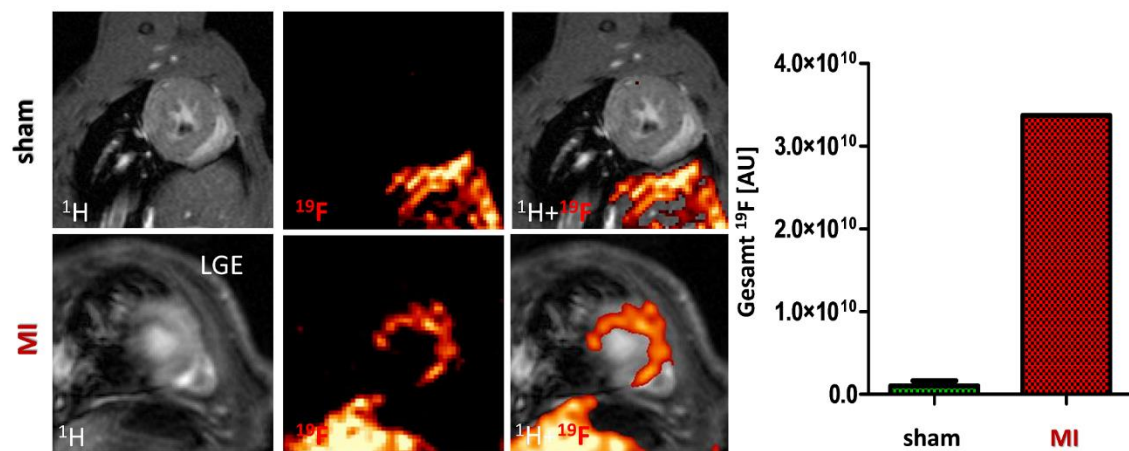
Die <sup>1</sup>H/<sup>19</sup>F-MRT Messungen des Matrigel- „plugs“ erfolgten 48 h nach Implantation des Matrigel- „plugs“, bzw. 24 h nach Partikelinjektion. Die <sup>19</sup>F-Messung diente dem Zweck, das <sup>19</sup>F-Signal im Entzündungsherd zu quantifizieren. Bei den Tieren, denen mit LPS versetztes Matrigel implantiert worden war, zeigte sich ein deutliches <sup>19</sup>F-Signal im Entzündungsherd (**Abbildung 3.16, A.**). Dieses Signal war auf das implantierte Material beschränkt, wobei sich der höchste Gesamt <sup>19</sup>F-Gehalt im Randbereich des Matrigel- „plugs“ fand, während das Zentrum in den meisten Fällen kein Signal aufwies. Bei den Tieren, denen Matrigel ohne LPS injiziert wurde, fand sich hingegen nur ein geringes Hintergrundsignal im Bereich des Matrigel- „plugs“ (**Abbildung 3.16, A.**).

Auch nach der MI-Operation erfolgte die <sup>1</sup>H/<sup>19</sup>F-MRT Messung des Herzens 48 h nach Operation, bzw. 24 h nach Partikelinjektion. Die <sup>1</sup>H-MRT Messungen wurden dabei mit „late-gadolinium-enhancement“ (LGE) kombiniert, um den ischämischen Bereich des Herzens darzustellen. Bei den Tieren nach MI-Operation zeigte sich mittels LGE ein klar abgrenzbares Areal mit erhöhter Signalintensität im T2 gewichteten Bild (**Abbildung 3.16, B.**). Dieses war deckungsgleich mit einem deutlichen <sup>19</sup>F-Signal im Myokard im *apikalen* Bereich des Herzens (**Abbildung 3.16, B.**). Bei den „sham“-operierten Tieren fanden sich hingegen weder eine erhöhte Signalintensität im <sup>1</sup>H-Bild nach LGE, noch ein <sup>19</sup>F-Signal oberhalb des Hintergrundrauschens im Bereich des Herzens.

**A. Matrigel**



**B. MI**



**Abbildung 3.16:**  $^{19}\text{F}$ -Signal in Matrigel- „plugs“ und infarzierten Herzen. **A.** Matrigel/LPS-Modell. **B.** Myokardinfarktmodell. **A + B:** An Tag 0 wurden den Tieren PFCs in die seitliche Schwanzvene injiziert. 24 h später erfolgte kombinierte  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT Bildgebung zur Darstellung des Entzündungsherdes. Es wurde der Gesamt  $^{19}\text{F}$ -Gehalt des Matrigel- „plugs“ bzw. des mittels LGE identifizierten ischämischen Myokardareals bestimmt. **A.** Links:  $^1\text{H}$ ,  $^{19}\text{F}$  und kombinierte  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Bilder des Matrigel- „plugs“ von Kontrolltieren (oben) und Tieren, denen Matrigel vermischt mit LPS implantiert worden war (unten). Rechts: Graphische Darstellung des Gesamt  $^{19}\text{F}$ -Gehaltes im Matrigel- „plug“ 24 h nach der PFC-Injektion in die seitliche Schwanzvene. **B.** Links: Mit LGE kombinierte  $^1\text{H}$ , sowie  $^{19}\text{F}$  und kombinierte  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Bilder des Herzens von „sham“-operierten Tieren (oben) und Tieren nach MI-Operation (unten). Rechts: Graphische Darstellung des Gesamt  $^{19}\text{F}$ -Gehaltes im mittels LGE identifizierten Infarktareal 24 h nach der PFC-Injektion in die seitliche Schwanzvene. Für die statistische Auswertung wurde ein t-Test verwendet. Daten sind Mittelwert  $\pm$  SD von (A.)  $n = 5$ , (B.)  $n = 3$  (sham) bzw.  $n = 1$  (MI) individuellen Experimenten; \*\*\*= $p < 0,001$ .

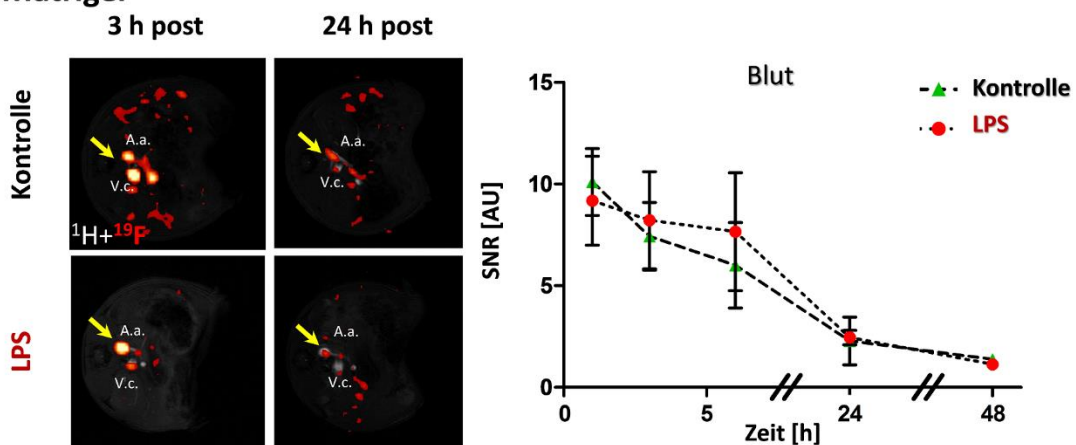
**$^1\text{H}/^{19}\text{F}$  MRT von Blut und peripheren Organen**

Die  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT-Messungen von Blut und peripheren Organen erfolgten 1 h, 3 h, 6 h und 24 h, bzw. für das Matrigel/LPS-Modell in einem Fall statt nach 24 h, 48 h nach der Injektion von PFCs in die seitliche Schwanzvene. Die Injektion erfolgte wiederum 24 h nach der Implantation des Matrigel- „plugs“ bzw. nach der MI-Operation. Die MRT-Aufnahmen dienten dem Zweck, das  $^{19}\text{F}$ -Signal in verschiedenen Organen unter entzündlichen Bedingungen zu charakterisieren.

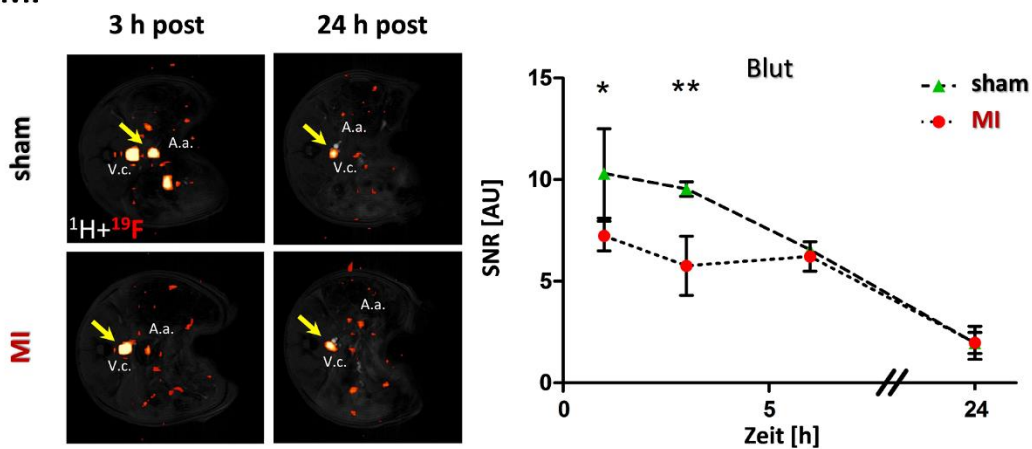
Im Falle des Matrigel/LPS-Modells war im Blut noch bis 6 h nach PFC-Injektion ein  $^{19}\text{F}$ -Signal detektierbar, welches aber bis zum Zeitpunkt 24 h auf Werte im Bereich des Hintergrundrauschens absank (**Abbildung 3.17, A.**). Es zeigte sich kein Unterschied in der Stärke des  $^{19}\text{F}$ -Signals zwischen den Tieren, denen Matrigel mit LPS implantiert worden war und den Kontrolltieren ohne Entzündung, denen Matrigel ohne LPS implantiert worden war.

Bei Mäusen, an denen eine MI-Operation durchgeführt worden war, war im Blut noch bis 6 h nach PFC-Injektion ein deutliches  $^{19}\text{F}$ -Signal detektierbar, welches aber bis zum Zeitpunkt 24 h auf Werte im Bereich des Hintergrundrauschens absank. Zu den Zeitpunkten 1 h ( $10,3 \pm 2,2$  vs.  $7,23 \pm 0,13$  AU,  $p < 0,05$ ) und 3 h ( $9,54 \pm 0,36$  vs.  $5,76 \pm 1,46$  AU,  $p < 0,01$ ) zeigten sich deutliche Unterschiede in der Stärke des  $^{19}\text{F}$ -Signals zwischen den Tieren nach MI-Operation und den „sham“-operierten Tieren, mit deutlich stärkerem Signal in der „sham“-Gruppe. Erst nach 6 h glichen sich die Werte zwischen den beiden Versuchsgruppen an (**Abbildung 3.17, B.**).

### A. Matrigel



### B. MI



**Abbildung 3.17: Bluthalbwertszeit von PFCs.** Zu den Zeitpunkten 1 h, 3 h, 6 h und 24 h bzw. 48 h nach Injektion von PFCs in die seitliche Schwanzvene erfolgte kombinierte  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT Bildgebung zur Bestimmung der Stärke des  $^{19}\text{F}$ -Signals im Blut. Es wurde das SNR der *V. cava caudalis* sowie *Aorta abdominalis* auf Höhe der Nieren bestimmt. Links: Kombinierte  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Bilder

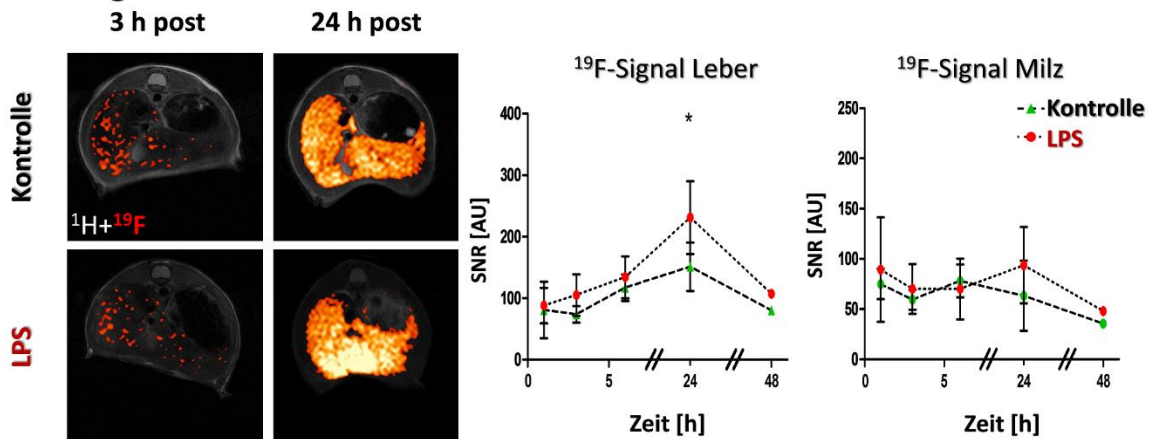
## Ergebnisse

der *V. cava caudalis* und *Aorta abdominalis* 3 h bzw. 24 h nach der Injektion von PFCs in die seitliche Schwanzvene. **A.** Matrigel/LPS-Modell. Kontrolltiere (oben) und Tiere, denen Matrigel vermischt mit LPS implantiert worden war (unten). **B.** MI-Modell. „Sham“-operierte Tiere (oben) und Tiere nach MI-Operation (unten). Rechts: Graphische Darstellung des SNR im Blut über 48 h (Matrigel/LPS-Modell) bzw. 24 h (MI-Modell). Für die statistische Auswertung wurde eine Zweifach-Varianzanalyse mit Bonferroni Post-Hoc-Test verwendet. Daten sind Mittelwert  $\pm$  SD von (**A.**)  $n = 4$  (24 h),  $n = 1$  (48 h), (**B.**)  $n = 3$  (sham) bzw.  $n = 2$  (MI) individuellen Experimenten;  $*=p<0,05$ ,  $**=p<0,01$ .

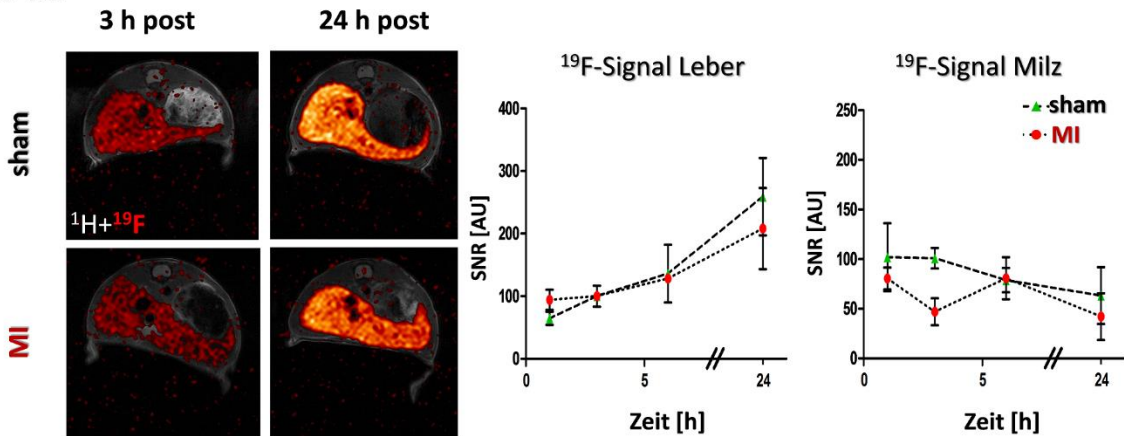
In der Leber nahm im Matrigel/LPS-Modell die Signalintensität in beiden Gruppen innerhalb von 24 h deutlich zu und fiel erst danach bis 48 h wieder bis auf den Ausgangswert ab. In der Gruppe, der Matrigel/LPS implantiert worden war, war ab 3 h nach Partikelinjektion ein deutlich stärkeres  $^{19}\text{F}$ -Signal in der Leber zu detektieren als in der Kontrollgruppe (24 h:  $151 \pm 39,6$  vs.  $231 \pm 59,2$  AU,  $p<0,05$ , **Abbildung 3.18, A.**). Auch in der Milz zeigte sich in diesem Modell ab 24 h ein gering stärkeres  $^{19}\text{F}$ -Signal in den Tieren, bei denen dem Matrigel LPS beigemischt worden war (24 h:  $63,3 \pm 34,9$  vs.  $93,7 \pm 38$  AU, **Abbildung 3.18, A.**).

Nach MI nahm in der Leber die  $^{19}\text{F}$ -Signalintensität in beiden Gruppen innerhalb von 24 h deutlich zu. Es fanden sich jedoch keine Unterschiede zwischen den MI- und den „sham“-operierten Tieren (**Abbildung 3.18, B.**). In der Milz zeigte sich bei diesem Modell in den Tieren, an denen eine MI-Operation durchgeführt worden war, verglichen mit den Tieren nach „sham“-Operation, ein tendenziell, jedoch nicht signifikant schwächeres  $^{19}\text{F}$ -Signal, insbesondere zu den beiden frühesten Messzeitpunkten (1 h:  $102 \pm 34,1$  vs.  $80,5 \pm 11$  AU; 3 h:  $101 \pm 10,4$  vs.  $47 \pm 13,5$  AU). Erst nach 6 h glichen sich die Werte der beiden Gruppen an (**Abbildung 3.18, B.**).

**A. Matrigel**

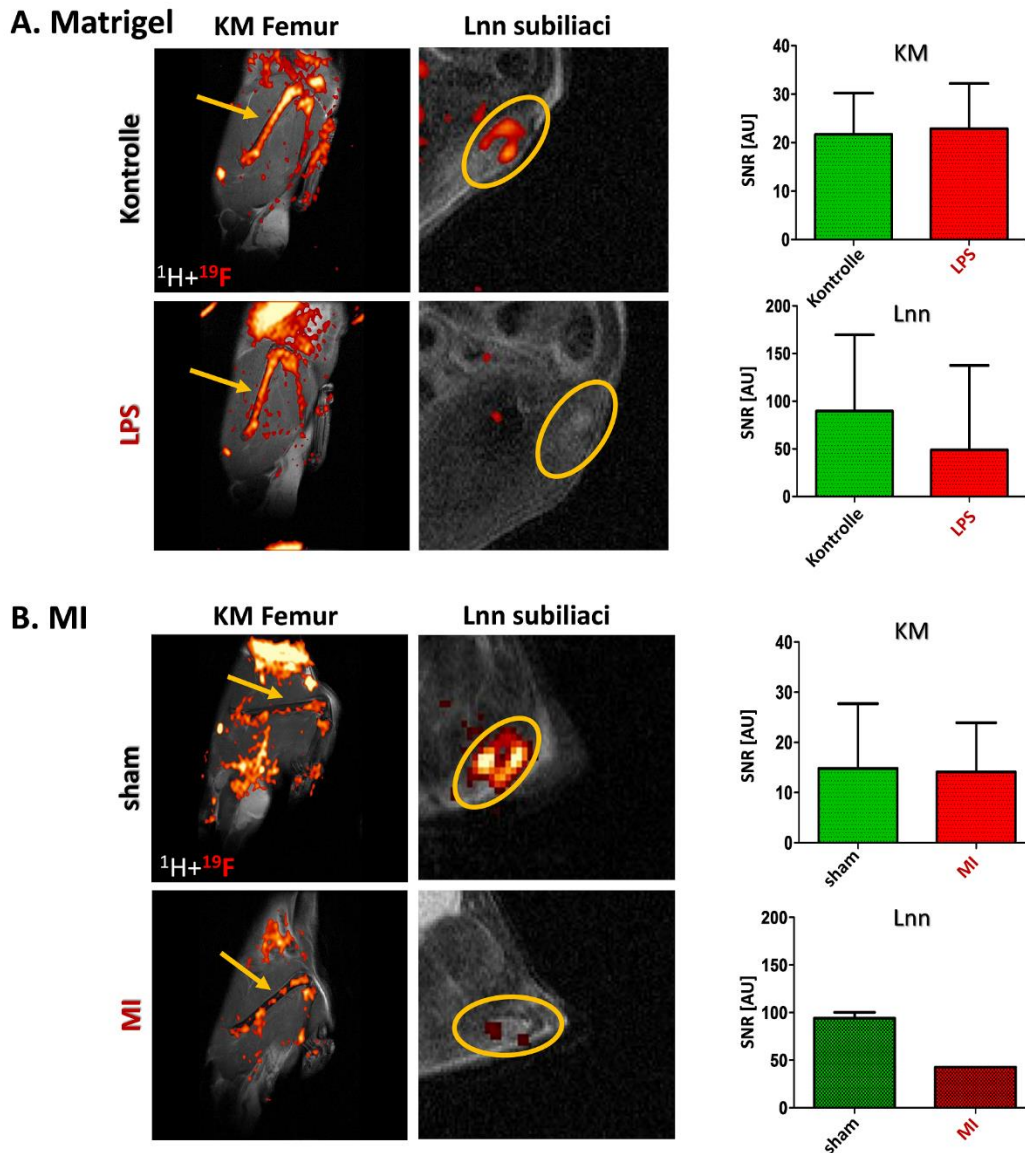


**B. MI**



**Abbildung 3.18: Aufnahme von PFCs in Leber und Milz unter entzündlichen Bedingungen.** Zu den Zeitpunkten 1 h, 3 h, 6 h und 24 h bzw. 48 h nach Injektion von PFCs in die seitliche Schwanzvene erfolgte kombinierte  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT Bildgebung zur Bestimmung der Stärke des  $^{19}\text{F}$ -Signals in Leber und Milz. Es wurde das SNR der Organe bestimmt. Links: Kombinierte  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Bilder der Leber 3 h bzw. 24 h nach Partikelinjektion. **A.** Matrigel/LPS-Modell. Kontrolltiere (oben) und Tiere, denen Matrigel vermischt mit LPS implantiert worden war (unten). **B.** MI-Modell. „Sham“-operierte Tiere (oben) und Tiere nach MI-Operation (unten). Rechts: Graphische Darstellung des SNR in Leber und Milz über 48 h (Matrigel/LPS-Modell) bzw. 24 h (MI-Modell). Für die statistische Auswertung wurde eine Zweifweg-Varianzanalyse mit Bonferroni Post-Hoc-Test verwendet. Daten sind Mittelwert  $\pm$  SD von (**A.**)  $n = 4$  (24 h),  $n = 1$  (48 h), (**B.**)  $n = 3$  (sham) bzw.  $n = 2$  (MI) individuellen Experimenten;  $*=p<0,05$ .

Sowohl in dem Entzündungsmodell der sterilen als auch der nicht-sterilen Entzündung fanden sich im Knochenmark keine Unterschiede in der Stärke des  $^{19}\text{F}$ -Signals zwischen entzündlichem und nicht-entzündlichem Zustand (**Abbildung 3.19**). Hingegen war in beiden Modellen in den Lymphknoten der Tiere mit Entzündungsherd ein tendenziell, aber nicht signifikant schwächeres  $^{19}\text{F}$ -Signal zu detektieren als in denjenigen der Kontrolltiere, bzw. der Tiere, an denen eine „sham“-Operation durchgeführt worden war (Matrigel/LPS-Modell:  $89,7 \pm 79,9$  vs.  $48,9 \pm 88,6$  AU; MI-Modell:  $94,1 \pm 6,08$  vs.  $42,7$  AU, **Abbildung 3.19**).

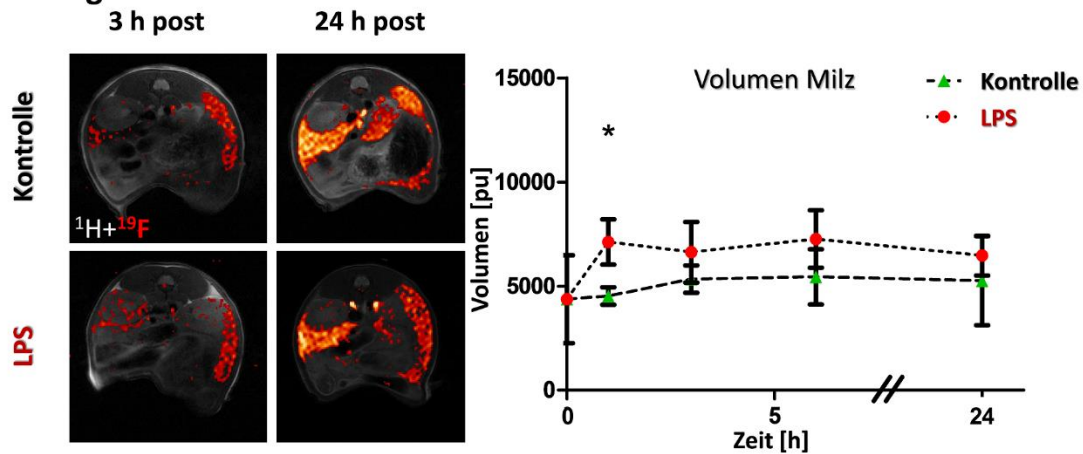


**Abbildung 3.19: Aufnahme von PFCs in Knochenmark und Lymphknoten unter entzündlichen Bedingungen.** 24 h nach Injektion von PFCs in die seitliche Schwanzvene erfolgte kombinierte  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT Bildgebung zur Bestimmung der Stärke des  $^{19}\text{F}$ -Signals in Knochenmark und Lymphknoten. Es wurde das SNR der Organe bestimmt. Links: Kombinierte  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Bilder des Knochenmarks des Femurs und der Lnn. subiliaci. **A.** Matrigel/LPS-Modell. Kontrolltiere (oben) und Tiere, denen Matrigel vermischt mit LPS implantiert worden war (unten). **B.** MI-Modell. „Sham“-operierte Tiere (oben) und Tiere nach MI-Operation (unten). Rechts: Graphische Darstellung des SNR in Knochenmark und Lymphknoten 24 h nach der Injektion von PFCs in die seitliche Schwanzvene. Für die statistische Auswertung wurde ein t-Test verwendet. Daten sind Mittelwert  $\pm$  SD von **(A.)**  $n = 4$ , **(B.)**  $n = 3$  (KM sham),  $n = 2$  (KM MI, Lnn. sham) bzw.  $n = 1$  (Lnn. MI) individuellen Experimenten; \*\*\*= $p < 0,001$ .

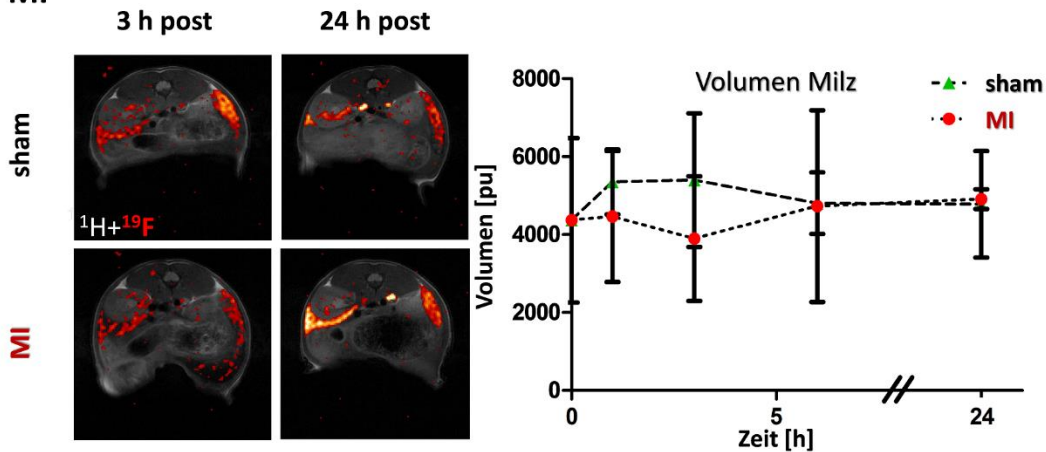
Als weitere mit MRT detektierbare Messgröße wurde anhand der in den  $^1\text{H}$ -Aufnahmen umrandeten Umrisse der Milz das Volumen dieses Organs quantifiziert. Hierbei zeigte sich im Matrigel/LPS-Modell, dass die Milz in Tieren mit Entzündungsherd zu allen Messzeitpunkten größer war als in den Kontrolltieren (1 h:  $4523,2 \pm 421,83$  vs.  $7114,4 \pm 1089,13$  pu,  $p < 0,05$ , **Abbildung 3.20, A.**). In den Tieren, an denen eine MI-Operation durchgeführt worden war, war die Milz nach 1 h und 3 h tendenziell, jedoch nicht signifikant kleiner als bei den „sham“-operierten Tieren (1 h:  $5350,33 \pm 835,11$  vs.  $4466,33 \pm 1680,14$  AU; 3 h:  $5397 \pm 1714,15$  vs.  $3896 \pm 1601,02$  pu, **Abbildung 3.20, B.**).



## A. Matrigel



## B. MI



**Abbildung 3.20: Größe der Milz unter entzündlichen Bedingungen.** Zu den Zeitpunkten 1 h, 3 h, 6 h und 24 h nach Injektion von PFCs in die seitliche Schwanzvene erfolgte kombinierte  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT Bildgebung. Es wurde das Volumen der Milz quantifiziert. Links: Kombinierte  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Bilder der Milz 3 h bzw. 24 h nach der Injektion von PFCs in die seitliche Schwanzvene. **A.** Matrigel/LPS-Modell. Kontrolltiere (oben) und Tiere, denen Matrigel/LPS implantiert worden war (unten). **B.** MI-Modell. „Sham“-operierte Tiere (oben) und Tiere nach MI-Operation (unten). Rechts: Graphische Darstellung des Volumens der Milz über 24 h. Für die statistische Auswertung wurde eine Zweifweg-Varianzanalyse mit Bonferroni Post-Hoc-Test verwendet. Daten sind Mittelwert  $\pm$  SD von (A.)  $n = 4$  (24 h),  $n = 1$  (48 h), (B.)  $n = 3$  (sham) bzw.  $n = 2$  (MI) individuellen Experimenten;  $*=p < 0,05$ .

### 3.2.2 Zusammensetzung der aus dem Entzündungsherd isolierten Immunzellpopulation

Um Informationen darüber zu gewinnen, von welchem Immunzelltyp das  $^{19}\text{F}$ -Signal getragen werden könnte wurde die Zusammensetzung der Immunzellen im Entzündungsherd – d. h. im Matrigel- „plug“ bzw. im infarzierten Herzen – untersucht.

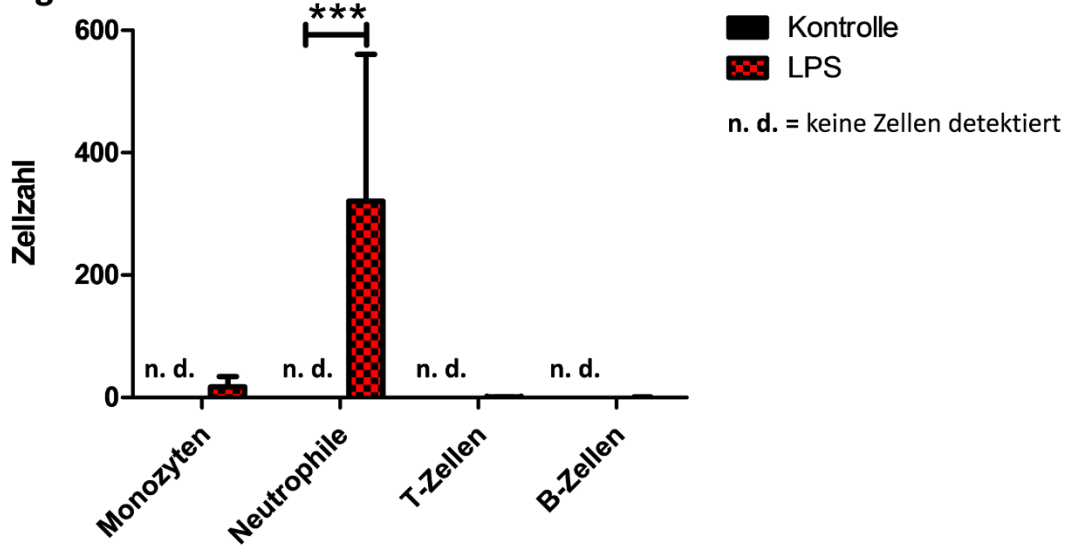
Die Matrigel- „plugs“ wurden 48 h nach Implantation entnommen, die Zellen dissoziiert, Monozyten, Neutrophile sowie T- und B-Lymphozyten mit Antikörpern spezifisch angefärbt und mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Die aus den mit LPS versetzten Matrigel- „plugs“ isolierte Immunzellpopulation bestand fast ausschließlich aus Neutrophilen ( $320,75 \pm 240,14$  Zellen, d. h.  $94,04 \pm 2,45$  %),

## Ergebnisse

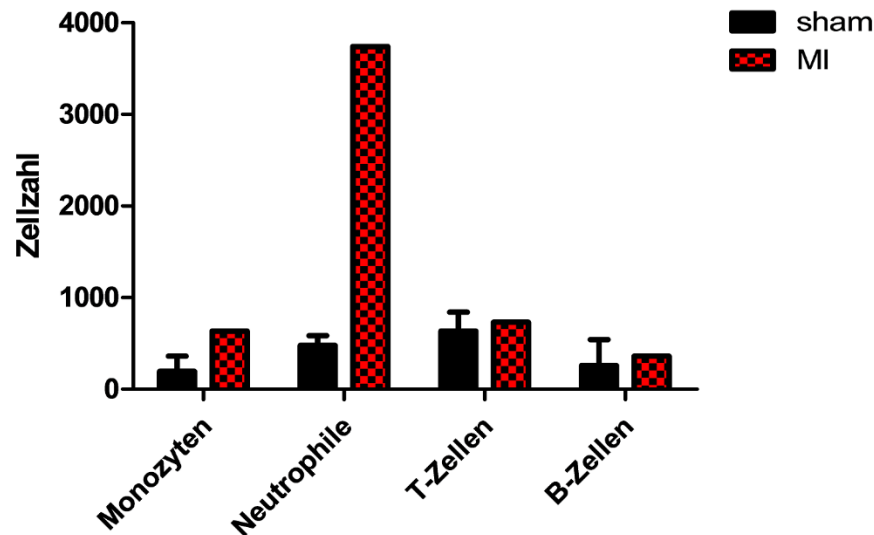
zudem aus einer geringen Zahl an Monozyten ( $17 \pm 17,22$  Zellen) und sehr geringen Mengen an Lymphozyten (T-Zellen:  $0,5 \pm 0,58$  Zellen; B-Zellen:  $0,25 \pm 0,5$  Zellen, **Abbildung 3.21, A.**).

Auch die Herzen wurden 48 h nach MI-Operation entnommen, mit Collagenase verdaut, die Zellen dissoziiert und Monozyten, Neutrophile sowie T- und B-Lymphozyten mit Antikörpern spezifisch angefärbt und mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. In den MI-Herzen fanden sich vor allem Neutrophile, die einen deutlich höheren Gesamtanteil der Zellen ausmachten verglichen mit Kontrollherzen (MI: 3740 Zellen, Kontrolle  $477,33 \pm 106,64$  Zellen, d. h. 32,95 % bzw.  $4,7 \pm 0,94$  %). Die Zahl der Monozyten war nach MI-Operation ebenfalls erhöht (MI: 636 Zellen, Kontrolle:  $196 \pm 167,31$  Zellen, d. h. 5,6 % bzw.  $1,93 \pm 1,47$  %). In den Kontrollherzen war der Gehalt an T-Zellen höher als der an Neutrophilen, die absolute Menge der T-Zellen war gleich zwischen den Kontroll- und den MI-Herzen (MI: 732 Zellen, Kontrolle:  $634,67 \pm 205,84$  Zellen, **Abbildung 3.21, B.**).

## A. Matrigel



## B. Myokardinfarkt



**Abbildung 3.21: Zusammensetzung der aus den Entzündungsherden isolierten Immunzellpopulationen.** An Tag 2 nach Induktion der Entzündung wurde A. der Matrigel- „plug“ entnommen bzw. B. das Herz entnommen und mit Collagenase verdaut. In beiden Fällen wurden die Immunzellen isoliert. Die Untersuchung der Proben erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Für die statistische Auswertung wurde eine Zweifweg-Varianzanalyse mit Bonferroni Post-Hoc-Test verwendet. Daten sind Mittelwert  $\pm$  SD von (A.)  $n = 4$  (24 h), (B.)  $n = 3$  (sham) bzw.  $n = 1$  (MI) individuellen Experimenten.

## 3.2.3 Zelluläre Partikel Aufnahme unter entzündlichen Bedingungen

*Zelluläre Partikel Aufnahme durch Immunzellen in vitro*

In diesem Studienteil sollte untersucht werden, in welchem Ausmaß PFCs *in vitro* von aktivierten Immunzellen aus dem peripheren Blut oder aus dem Entzündungsherd aufgenommen werden, verglichen mit Immunzellen, welche aus dem Blut gesunder Kontrolltiere gewonnen wurden.

## Ergebnisse

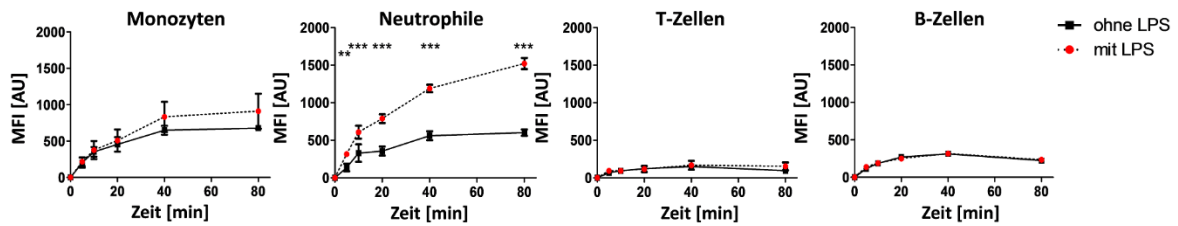
Untersuchung der Partikelaufnahme in Blutimmunzellen *in vitro*

Die Blutentnahme erfolgte zum einen 48 h nach Induktion der Entzündung. Aufgrund fehlender Unterschiede zwischen der PFC-Aufnahme durch Blutimmunzellen aus gesunden Tieren, verglichen mit solchen, die zu diesem Zeitpunkt aus Tieren nach MI-Operation gewonnen wurden erfolgte für das MI-Modell zudem 5-6 h nach der Operation eine weitere Blutentnahme aus der Schwanzspitze der lebenden Tiere.

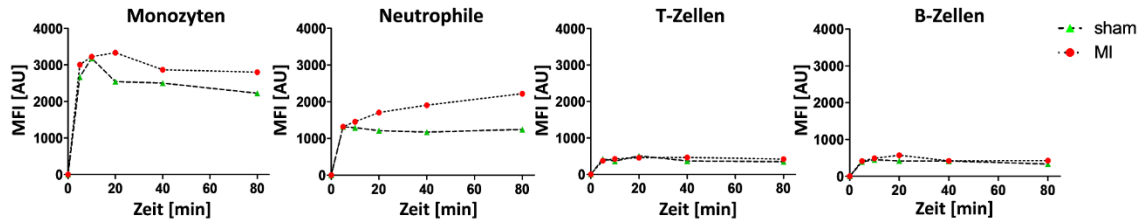
Im Matrigel/LPS-Modell zeigte sich, dass bereits nach 5 min Partikelinkubation eine vermehrte Aufnahme der PFCs durch Neutrophile, welche aus dem Blut von Tieren mit Entzündung gewonnen worden waren zu beobachten war, verglichen mit der Aufnahme durch Neutrophile aus dem Blut gesunder Kontrolltiere. Hierbei fand sich eine weitere Zunahme der Unterschiede zwischen den beiden Gruppen über den Beobachtungszeitraum (80 min:  $602,37 \pm 42,49$  vs.  $1521,2 \pm 73,95$  AU,  $p < 0,001$ ). Die Partikelaufnahme durch die Monozyten (80 min:  $677,13 \pm 34,32$  vs.  $911,03 \pm 240,59$  AU), welche aus den Tieren mit Entzündungsherd gewonnen worden waren, war hingegen nur zu den späteren Zeitpunkten leicht erhöht, während im Falle der Lymphozyten keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen vorlagen (**Abbildung 3.22, A.**). Wurde den Tieren 5-6 h nach MI-Operation Blut entnommen, war eine vermehrte Partikelaufnahme durch Neutrophile (80 min:  $1243,4$  vs.  $2218,3$  AU) und Monozyten (80 min:  $2226$  vs.  $2802,3$  AU) zu detektieren (**Abbildung 3.22, B.**).

## Ergebnisse

### A. Matrigel



### B. MI



**Abbildung 3.22: Aufnahme von PFCs durch entzündlich stimulierte periphere Blutzellen *in vitro*.** 48 h nach Implantation des Matrigels wurden die Tiere final entblutet (A.) bzw. wurde 5-6 h nach MI-Operation Blut aus der Schwanzspitze entnommen (B.), die Immunzellen aus dem gewonnenen Vollblut isoliert und *in vitro* mit Cy5-PFCs inkubiert, mit Probenahmen nach 5, 10, 20, 40 und 80 min. Die Untersuchung der Proben erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Für die statistische Auswertung wurde eine Zweifach-Varianzanalyse mit Bonferroni Post-Hoc-Test verwendet. Daten sind Mittelwert  $\pm$  SD von (A.)  $n = 4$  bzw. (B.)  $n = 1$  individuellen Experimenten; \*\*= $p < 0,01$ , \*\*\*= $p < 0,001$ .

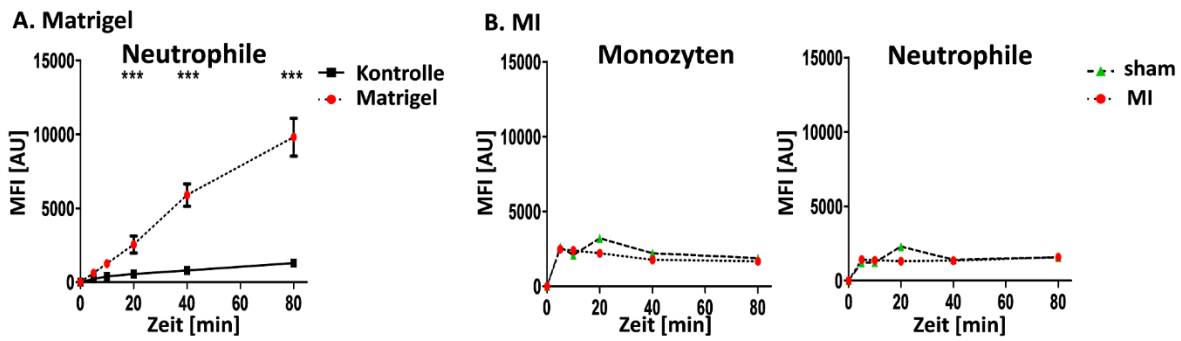
PFC-Aufnahme durch aus dem Entzündungsherd isolierte Immunzellen *in vitro*

48 h nach Induktion der Entzündung wurden die Matrigel- „plugs“ bzw. Herzen entnommen, die Immunzellen aus diesen isoliert und *in vitro* mit Partikeln inkubiert, gefolgt von Anfärbung der Monozyten, Neutrophilen sowie T- und B-Lymphozyten mit spezifischen Antikörpern und durchflusszytometrischer Quantifizierung der MFI der einzelnen Leukozytensubpopulationen im APC-Kanal.

Im Matrigel/LPS-Modell wurden die aus den mit LPS versetzten Matrigel- „plugs“ gewonnenen Zellen mit aus dem peripheren Blut gesunder Kontrolltiere gewonnenen Immunzellen verglichen, da sich in den Matrigel- „plugs“ ohne LPS-Zusatz so gut wie keine Zellen fanden. Es war eine deutlich vermehrte Partikel Aufnahme durch Neutrophile zu beobachten, welche aus den Matrigel- „plugs“ gewonnen wurden, verglichen mit der Aufnahme durch nicht-stimulierte periphere Neutrophile (80 min:  $1290,5 \pm 22,6$  vs.  $9801,7 \pm 1280,56$  AU,  $p < 0,001$ ). Besonders auffällig war, dass die MFI im APC-Kanal der direkt aus dem Entzündungsherd gewonnenen Neutrophilen deutlich höher war als diejenige der aus dem peripheren Blut von Tieren mit Entzündung gewonnenen (**Abbildung 3.23, A.**).

Im MI-Modell hingegen zeigte sich kein Unterschied in der Partikel Aufnahme zwischen den aus den Herzen nach MI-Operation und den Herzen der „sham“-operierten Tiere gewonnenen Immunzellen (**Abbildung 3.23, B.**).

## Ergebnisse



**Abbildung 3.23: Aufnahme von PFCs durch aus den Entzündungsherden gewonnene Immunzellen *in vitro*.** 48 h nach Induktion der Entzündung wurden **A.** die Matrigel- „plugs“ entnommen bzw. **B.** die Herzen entnommen und mit Collagenase verdaut. In beiden Fällen wurden die Immunzellen isoliert. Diese wurden dann *in vitro* mit Cy5-PFCs inkubiert, mit Probenahmen nach 5, 10, 20, 40 und 80 min. Die Untersuchung der Proben erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Graphische Darstellung der MFI der Neutrophilen (**A.** + **B.**) und Monozyten (**B.**) über 80 min. Für die statistische Auswertung wurde eine Zweifach-Varianzanalyse mit Bonferroni Post-Hoc-Test verwendet. Daten sind Mittelwert  $\pm$  SD von (**A.**)  $n = 4$  bzw. (**B.**)  $n = 1$  individuellen Experimenten; \*\*\*= $p < 0,001$ .

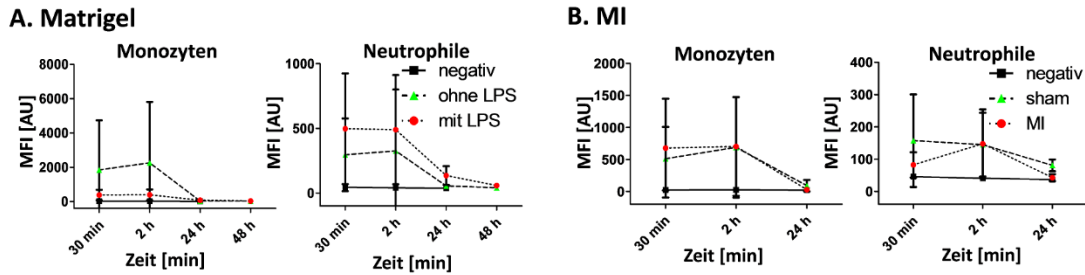
### Untersuchung der Partikelaufnahme durch Immunzellen *in vivo*

In diesem Studienteil wurde den Tieren nach der Induktion einer Entzündung zu verschiedenen Zeitpunkten nach der *i. v.* Injektion von PFCs, welche in ihrer Lipidhülle das Fluorophor Cy5 enthielten (Zeitpunkt der Injektion: 24 h nach Induktion der Entzündung) Blut entnommen, bzw. im zweiten Teil des Experiments im Anschluss an die MRT-Messungen, d. h. 24 h nach der Partikelinjektion Matrigel- „plugs“ bzw. Herzen entnommen und die Immunzellen aus diesen isoliert. Daraufhin wurde die MFI der einzelnen Immunzellsubpopulationen im APC-Kanal mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dies ermöglichte es, die *in vivo* erfolgte Partikelaufnahme durch die verschiedenen Leukozytensubpopulationen zu ermitteln.

Die Blutentnahme erfolgte 30 min, 2 h und 24 h nach PFC-Injektion. Im Matrigel/LPS-Modell konnte eine tendenziell, jedoch nicht statistisch signifikant erhöhte Aufnahme der PFCs durch Neutrophile in Tieren mit Entzündung detektiert werden. Als Kontrollgruppe dienten Tiere, denen Matrigel ohne LPS implantiert worden war, oder unbehandelte Tiere, denen zudem keine Partikel injiziert wurden. Letztere wurden verwendet, um sicherzugehen, dass das beobachtete Fluoreszenzsignal wirklich durch die aufgenommenen PFCs und nicht durch Autofluoreszenz der Zellen im APC-Kanal zustande kam (30 min: Kontrolle:  $45,6 \pm 6,79$ , -LPS:  $295,85 \pm 280,81$ , +LPS:  $497 \pm 427,74$  AU). Die Aufnahme in die restlichen Leukozytensubpopulationen war zwischen den Versuchsgruppen identisch (**Abbildung 3.24, A.**).

Im MI-Modell zeigte sich für keine der Immunzellsubpopulationen ein Unterschied in der Partikelaufnahme zwischen den aus den MI-, den „sham“-Tieren oder den aus unbehandelten Kontrolltieren, denen keine Partikel injiziert worden waren, gewonnenen Blutimmunzellen (**Abbildung 3.24, B.**).

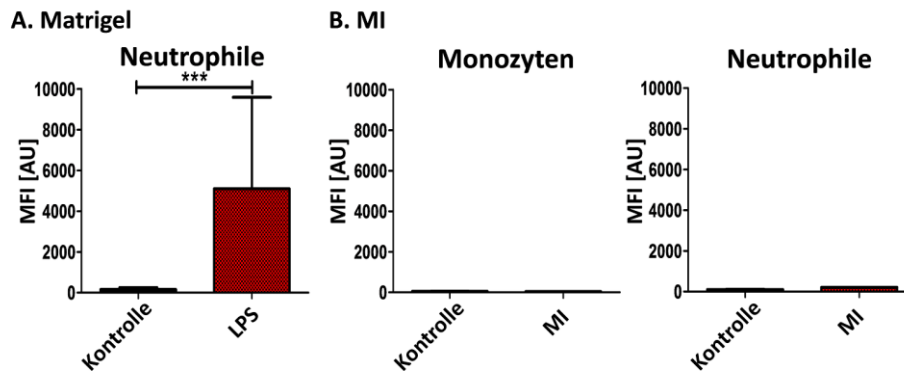
## Ergebnisse



**Abbildung 3.24: Aufnahme von PFCs durch entzündlich stimulierte periphere Blutimmunzellen in vivo.** 30 min, 2 h und 24 h nach der Injektion von Cy5-PFCs in die seitliche Schwanzvene (Injektionszeitpunkt: 24 h nach der Induktion der Entzündung) wurde Blut entnommen und die Immunzellen aus dem Vollblut isoliert. Die Untersuchung der Proben erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Negativ = Blutimmunzellen aus unbehandelten Tieren, denen keine Partikel injiziert wurden. **A.** Matrigel/LPS-Modell, **B.** MI-Modell. Für die statistische Auswertung wurde eine Zweifweg-Varianzanalyse mit Bonferroni Post-Hoc-Test verwendet. Daten sind Mittelwert  $\pm$  SD von **(A.)**  $n = 4$  (24 h),  $n = 1$  (48 h), **(B.)**  $n = 3$  (Kontrolle, sham) bzw.  $n = 2$  (MI) individuellen Experimenten.

24 h nach der i. v. Injektion Fluorophor-gekoppelter PFCs, d. h. 48 h nach der Induktion der Entzündung wurden Matrigel- „plugs“ bzw. Herzen entnommen, die Immunzellen aus diesen isoliert, Monozyten, Neutrophile sowie T- und B-Zellen mit spezifischen Antikörpern angefärbt und durchflusszytometrischen Untersuchungen zur Quantifizierung der MFI der einzelnen Leukozytensubpopulationen durchgeführt. Im Matrigel/LPS-Modell wurden als Kontrolle Zellen aus mit LPS versetzten Matrigel- „plugs“ von Tieren verwendet, denen keine PFCs injiziert worden waren. In diesem Versuchsteil fand sich eine starke Fluoreszenz in den Neutrophilen, welche nach PFC-Injektion aus mit LPS versetzten Matrigel- „plugs“ gewonnen wurden ( $51,08 \pm 11,4$  vs.  $5095 \pm 4490,39$  AU). Besonders auffällig war, dass die MFI der direkt aus dem Entzündungsherd gewonnenen Neutrophilen deutlich höher war als diejenige der aus dem peripheren Blut von Tieren mit Entzündung gewonnenen (**Abbildung 3.25, A.**). Im MI-Modell wurde ebenfalls die Fluoreszenz der Immunzellen untersucht, welche aus den infarzierten Herzen gewonnen worden waren. Als Kontrolle wurden Zellen aus Herzen von Tieren, die nicht operiert und denen keine PFCs-injiziert worden waren verwendet. Es fand sich in keiner der beiden Gruppe Fluoreszenz in den Immunzellen (**Abbildung 3.25, B.**).

## Ergebnisse



**Abbildung 3.25: Aufnahme von PFCs durch aus dem Entzündungsherd gewonnene Immunzellen *in vivo*.** 24 h nach der Injektion von Cy5-PFCs in die seitliche Schwanzvene (Injektionszeitpunkt: 24 h nach der Induktion der Entzündung) wurden **A.** die Matrigel- „plugs“ entnommen bzw. **B.** die Herzen entnommen und mit Collagenase verdaut. In beiden Fällen wurden die Immunzellen isoliert. Die Untersuchung der Proben erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Graphische Darstellung der MFI der Neutrophilen (**A + B.**) und Monozyten (**B.**). Für die statistische Auswertung wurde ein t-Test verwendet. Daten sind Mittelwert  $\pm$  SD von (**A.**)  $n = 4$ , (**B.**)  $n = 2$  (sham) bzw.  $n = 1$  (MI) individuellen Experimenten; \*\*\*= $p < 0,001$ .

### *In vitro* Stimulation von Zellen mit LPS

Um die Mechanismen genauer zu untersuchen, welche die vermehrte Partikelaufnahme unter entzündlichen Bedingungen im Matrigel/LPS-Modell bedingen, wurden in diesem Studienteil Zellen *in vitro* mit LPS inkubiert und die Partikelaufnahme durch die so stimulierten Zellen untersucht. Hierfür wurde unter anderem die Makrophagenzelllinie RAW264.7 verwendet. Es erfolgte entweder eine Kurzzeitstimulation der Zellen über einen Zeitraum von 80 min mit zeitgleicher Partikelinkubation, oder eine Langzeitstimulation über 24 h. Während dieser Langzeitstimulation wurde entweder zeitgleich eine Partikelinkubation durchgeführt oder die Partikelinkubation fand erst im Anschluss an die 24 h Vorstimulation mit LPS, über einen Zeitraum von 180 min statt, in Abwesenheit von LPS. Als Kontrolle dienten Zellen, die für die gleiche Zeit mit PFCs inkubiert, aber nicht mit LPS stimuliert wurden. Unter keiner der beschriebenen Bedingungen konnte eine Steigerung der Partikelaufnahme beobachtet werden (**Abbildung 3.26, A.**).

Darüber hinaus wurde untersucht, ob die Stimulation mit LPS zu einer erhöhten Partikelaufnahme durch verschiedene primäre Zellen (Blutimmunzellen, *Splenozyten*) führt. Hierfür wurden zum einen Blutimmunzellen isoliert und über 24 h mit LPS stimuliert und zugleich mit Partikeln inkubiert. Nach 1 h, 2 h und 24 h wurden Proben abgenommen, die Monozyten, Neutrophilen sowie T- und B-Zellen mit spezifischen Antikörpern angefärbt und durchflusszytometrische Messungen durchgeführt. In keiner der Immunzellpopulationen war eine Steigerung der Aufnahme der PFCs, verglichen mit unstimulierten Blutimmunzellen zu beobachten (**Abbildung 3.26, B.**). Als zweiter Typ primärer Zellen wurden zudem noch mit LPS stimulierte Milzzellen auf ihre PFC-Aufnahme untersucht. Hierfür wurden die Zellen für 24 h mit LPS stimuliert und gleichzeitig mit Partikeln inkubiert. Probennahmen erfolgten nach 1 h, 2 h und 24 h (**Abbildung 3.26, C.**). Zudem wurde eine Stimulation bei gleichzeitiger Partikelinkubation

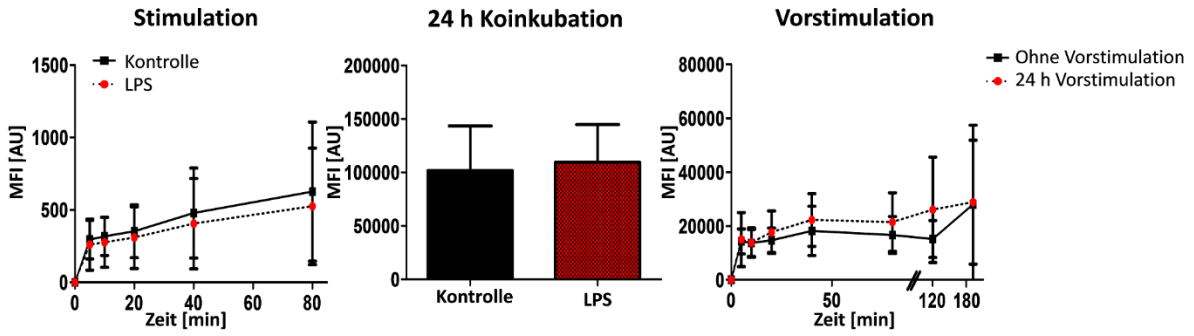


## Ergebnisse

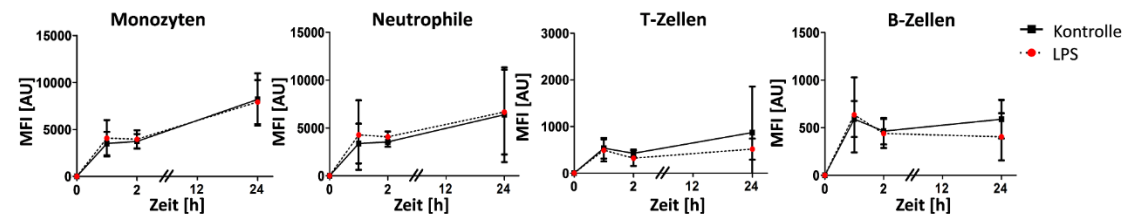
über 24 h durchgeführt, mit einmaliger Probenabnahme nach 24 h, bei der neben der für die restlichen Versuche verwendeten LPS-Konzentration von 1 µg/ml zudem eine Konzentration von 0,1 µg/ml verwendet wurde (**Abbildung 3.26, D.**). Als Kontrolle dienten in allen Fällen nicht-stimulierte Zellen, die für die gleiche Zeit in DMEM ohne LPS inkubiert wurden. Auch bei der Stimulation von Milzzellen mit LPS (**Abbildung 3.26, C+D**) ließ sich keine vermehrte Aufnahme der PFCs induzieren.

## Ergebnisse

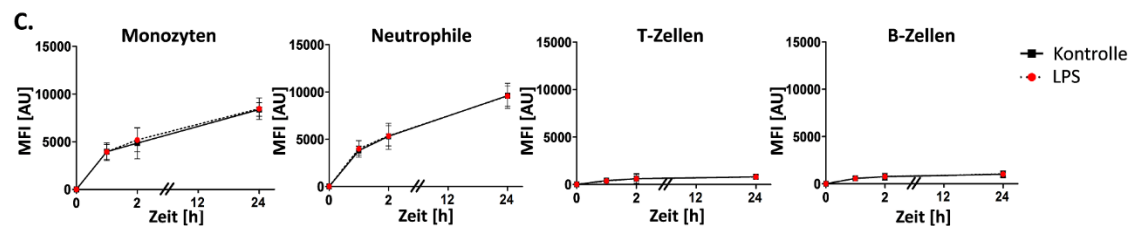
### A. Kulturzellen



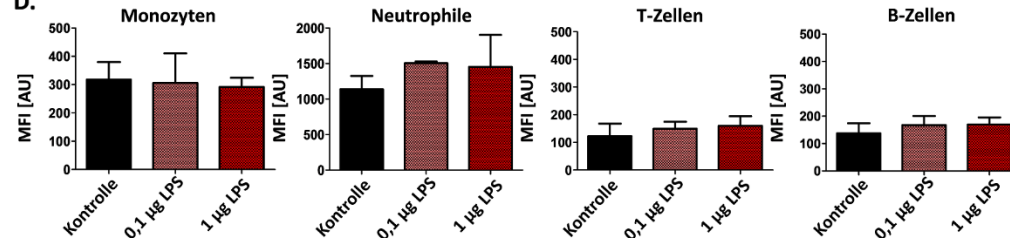
### B. Blutimmunzellen



### C. Milzzellen



### D.

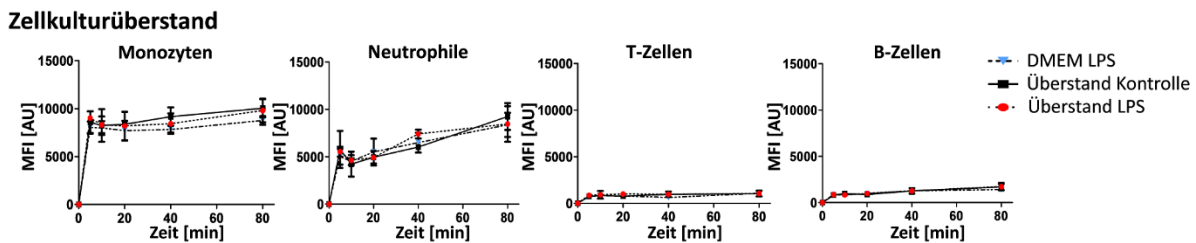


**Abbildung 3.26: Aufnahme von PFCs durch LPS-stimulierte Zellen.** **A.** Stimulation von Kulturzellen. Links: RAW264.7 Makrophagen wurden mit LPS (1 µg/ml) und Cy5-PFCs inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0, 5, 10, 20, 40 und 80 min wurden Proben abgenommen. Mitte: RAW264.7 Makrophagen wurden für 24 h mit LPS und Cy5-PFCs inkubiert. Rechts: RAW264.7 Makrophagen wurden für 24 h mit LPS vorstimuliert, gefolgt von einer Inkubation mit Cy5-PFCs. Während der Inkubation mit den Cy5-PFCs wurden zu den Zeitpunkten 0, 5, 10, 20, 40, 80, 120 und 180 min Proben abgenommen. **B.** Blutimmunzellen wurden mit LPS (1 µg/ml) und Cy5-PFCs inkubiert. Zu den Zeitpunkten 1 h, 2 h und 24 h wurden Proben abgenommen. **C.** Milzzellen wurden mit LPS (1 µg/ml) und Cy5-PFCs inkubiert. Zu den Zeitpunkten 1 h, 2 h und 24 h wurden Proben abgenommen. **D.** Milzzellen wurden für 24 h mit LPS in zwei verschiedenen Konzentrationen (0,1 und 1 µg/ml) und mit Cy5-PFCs inkubiert. Die Untersuchung der Proben erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Für die statistische Auswertung wurden eine Zweifweg-Varianzanalyse mit Bonferroni Post-Hoc-Test (**A.**, Links und Rechts bzw. **B.** und **C.**), eine Einweg-Varianzanalyse mit Bonferroni-Post-Hoc-Test (**D.**) bzw. ein t-Test (**A.**, Mitte) verwendet. Daten sind Mittelwert ± SD von n = 3 individuellen Experimenten.

## Ergebnisse

### Stimulation mit Zellkulturüberstand

Es ist bekannt, dass die Aktivierung von Neutrophilen durch LPS von Monozyten abhängen kann<sup>203,204</sup>. Daher sollte untersucht werden, ob die PFC-Aufnahme durch Neutrophile durch Zellkulturüberstand von LPS-stimulierten Makrophagen verstärkt werden kann. Hierfür wurden RAW Makrophagen für 24 h mit LPS stimuliert, der Zellkulturüberstand abgenommen und aus Vollblut isolierte Blutimmunzellen für 80 min in diesem inkubiert. Zeitgleich wurden die Blutimmunzellen mit PFCs inkubiert. Die PFC-Aufnahme durch die derart inkubierten Blutimmunzellen wurde verglichen mit der durch Blutimmunzellen, die mit Zellkulturüberstand unbehandelter Kontrollmakrophagen inkubiert wurden. Als Positivkontrolle dienten Blutimmunzellen, welche in mit LPS versetztem Medium inkubiert wurden. Es zeigte sich keine vermehrte PFC-Aufnahme durch eine der beiden Gruppen von stimulierten Immunzellen (**Abbildung 3.27**).



**Abbildung 3.27: Aufnahme von PFCs durch periphere Blutimmunzellen bei Inkubation in Kulturüberstand LPS-stimulierter RAW Makrophagen.** RAW264.7 Makrophagen wurden für 24 h mit LPS (1 µg/ml) stimuliert. Der Kulturüberstand wurde abgenommen und aus Vollblut isolierte Blutimmunzellen wurden in dem Zellkulturüberstand und mit Cy5-PFCs inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0, 5, 10, 20, 40 und 80 min wurden Proben abgenommen. Die Untersuchung der Proben erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Für die statistische Auswertung wurde eine Zweiweg-Varianzanalyse mit Bonferroni Post-Hoc-Test verwendet. Daten sind Mittelwert ± SD von n = 3 individuellen Experimenten.

### In vitro Stimulation von Zellen mit CRP

Da LPS alleine keine Verstärkung der PFC-Aufnahme bewirkte, wurde als weitere Substanz, welche möglicherweise eine Rolle bei der vermehrten zellulären PFC-Aufnahme unter entzündlichen Bedingungen spielen könnte das akute Phase Protein CRP zur *in vitro* Stimulation von Zellen verwendet. Von CRP ist bekannt, dass es die Beseitigung apoptotischer Zellen beschleunigt, indem es diese opsoniert und durch die folgende Aktivierung des klassischen Wegs der Komplementkaskade sowie über Bindung an Fc-Rezeptoren deren Phagozytose befördert<sup>212–214</sup>. CRP ist für die vorliegende Studie zudem von Interesse, da es zu den Faktoren gehört, welche nach MI hochreguliert werden<sup>212,215</sup>. Seine Level sind eng mit dem Verlauf und dem Therapieausgang nach MI assoziiert<sup>216–221</sup>.

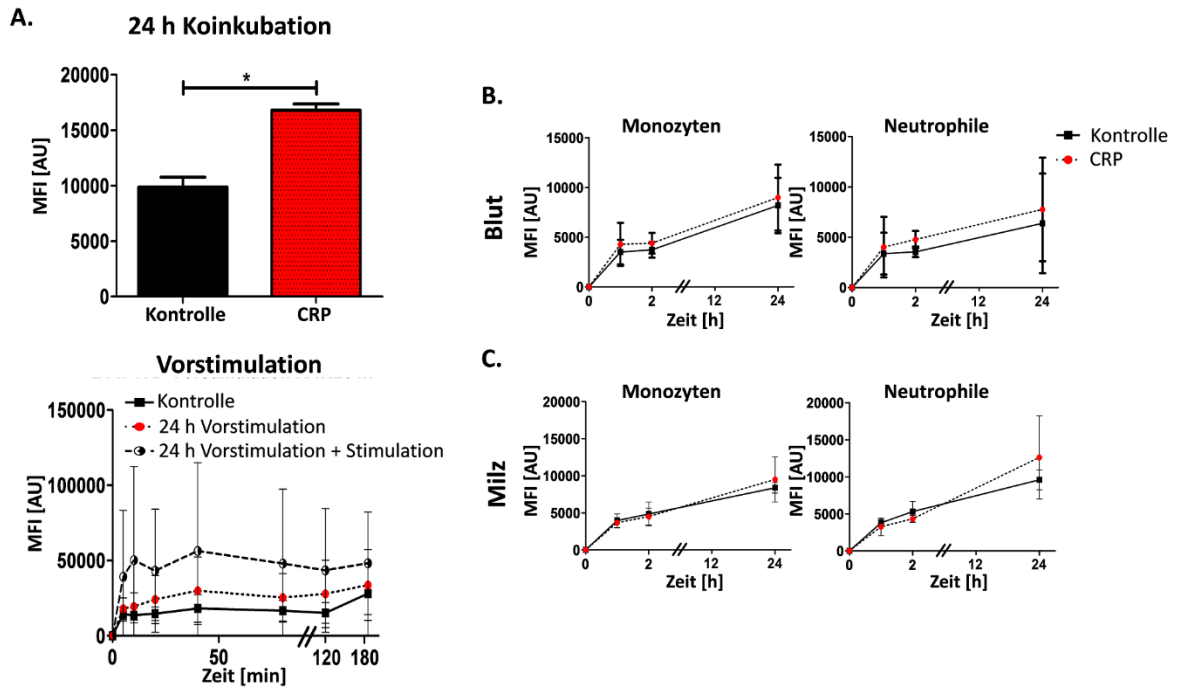
In diesem Versuchsteil wurden zum einen RAW264.7 Makrophagen entweder über 24 h mit CRP stimuliert und parallel mit PFCs inkubiert. Hierbei konnte eine Steigerung der Partikelaufnahme, verglichen mit unbehandelten Kontrollzellen beobachtet werden (9870,5 ± 890,25 vs. 16800 ± 565,69 AU, p<0,05, **Abbildung 3.28, A**). Allerdings war es durch die Koinkubation mit CRP und PFCs nicht möglich,

## Ergebnisse

direkt die Zellen stimulierende Effekte des CRP von einer vermehrten Aufnahme von PFCs aufgrund von Opsonierung der Partikel durch CRP zu unterscheiden. Um diese Effekte trennen zu können, erfolgte in einem weiteren Schritt eine Vorstimulation der Makrophagen mit CRP über 24 h, gefolgt von 180 min Partikelinkubation mit und ohne zeitgleiche Stimulation mit CRP. Wurden die Zellen über 24 h vorstimuliert, konnte während der folgenden Partikelinkubation eine tendenzielle, jedoch nicht signifikante Erhöhung der PFC-Aufnahme beobachtet werden. Die PFC-Aufnahme war, ebenfalls nur tendenziell und nicht statistisch signifikant, noch weiter erhöht, wenn die Zellen während der 180 min Partikelinkubation weiterhin mit CRP stimuliert wurden (180 min: Kontrolle:  $28041,5 \pm 29309,74$ , 180 min -CRP:  $33729,33 \pm 23478,31$ , 180 min +CRP:  $48177,67 \pm 34066,51$  AU, **Abbildung 3.28, A.**).

Zum anderen sollte in einem weiteren Versuchsteil untersucht werden, ob die Stimulation mit CRP zu einer erhöhten Partikelaufnahme durch verschiedene primäre Zellen (Blutimmunzellen, *Splenozyten*) führt. Hierfür wurden zum einen Blutimmunzellen isoliert und über 24 h, bei gleichzeitiger Partikelinkubation mit CRP stimuliert. Zu den Zeitpunkten 1 h, 2 h und 24 h wurden Proben abgenommen, die Immunzellsubpopulationen mit spezifischen Antikörpern angefärbt und durchflusszytometrische Messungen durchgeführt, in denen die MFI der jeweiligen Leukozytensubpopulation bestimmt wurde. Hierbei zeigte sich zu den späteren Messzeitpunkten eine tendenziell, aber nicht statistisch signifikant höhere PFC-Aufnahme durch die Neutrophilen und Monozyten, verglichen mit einer unstimulierten Kontrolle (**Abbildung 3.28, B.**). Auch primäre Milzzellen wurden für 24 h mit CRP stimuliert und gleichzeitig mit PFCs inkubiert. Probennahmen erfolgten wie für die Blutimmunzellen nach 1 h, 2 h und 24 h. In den durchflusszytometrischen Messungen zeigte sich nach 24 h eine tendenziell vermehrte Aufnahme der PFCs durch alle Zellsubpopulationen, verglichen mit unstimulierten Milzzellen (**Abbildung 3.28, C.**).

## Ergebnisse



**Abbildung 3.28: Aufnahme von PFCs durch CRP-stimulierte Zellen.** A. Oben: RAW264.7 Makrophagen wurden für 24 h mit CRP (50 µg/ml) und Cy5-PFCs inkubiert. Unten: RAW264.7 Makrophagen wurden für 24 h mit CRP vorstimuliert, gefolgt von einer Inkubation mit Cy5-PFCs mit oder ohne fortgesetzte CRP-Stimulation. Zu den Zeitpunkten 0, 5, 10, 20, 40, 80, 120 und 180 min wurden Proben abgenommen. B. + C. Zellen aus Blut bzw. Milz wurden für 24 h mit CRP (50 µg/ml) und Cy5-PFCs inkubiert. Die Untersuchungen der Proben erfolgten mittels Durchflusszytometrie. Für die statistische Auswertung wurden eine Zweifweg-Varianzanalyse mit Bonferroni Post-Hoc-Test (A. unten, B. und C.) bzw. ein t-Test (A. oben) verwendet. Daten sind Mittelwert ± SD von n = 3 (A. oben, B. und C.) bzw. n = 6 (A. unten) individuellen Experimenten. \* = p < 0,05.

## 4 Diskussion

Die Technik der  $^{19}\text{F}$ -MRT wurde bereits in den 70er Jahren des 20. Jhd. entwickelt und die ersten Veröffentlichungen stammen aus der Zeit kurz nach der Einführung der  $^1\text{H}$ -MRT<sup>112,113</sup>. Anders als  $^1\text{H}$ -MRT wurde  $^{19}\text{F}$ -MRT in den folgenden Jahrzehnten jedoch kaum angewendet, was insbesondere in der fast vollständigen Abwesenheit von  $^{19}\text{F}$  in Körpergeweben begründet ist. Als alternative Einsatzmöglichkeit wurde jedoch bereits in der ersten Publikation über  $^{19}\text{F}$ -MRT vorgeschlagen, diese MRT-Technik unter Verwendung von  $^{19}\text{F}$  als „tracer“-Agens zu nutzen<sup>112</sup>. In dieser Indikation werden heute vor allem Perfluorkarbone eingesetzt<sup>115,122,123</sup>. Perfluorkarbone eignen sich zum Beispiel für die direkte Darstellung von Entzündungsprozessen, da Perfluorkarbon-Nanoemulsionen (PFCs) von phagozytotischen Zellen im Blut aufgenommen werden, die daraufhin unter anderem in Entzündungsherde einwandern. Derart markierte Entzündungsherde können mittels  $^{19}\text{F}$ -MRT mit hoher Sensitivität und Spezifität ohne jeglichen natürlichen Hintergrund als  $^{19}\text{F}$ - „hot spot“ detektiert, quantifiziert und bei Überlagerung mit ortsgleichen  $^1\text{H}$ -Bildern in den exakten anatomischen Kontext eingeordnet werden. Trotz des dringenden Bedarfs an Techniken, die eine schnelle und exakte Diagnostik von Entzündungsprozessen erlauben, kam es erst in den letzten Jahren zu einem deutlichen Entwicklungsfortschritt im Bereich der Entzündungsbildgebung mit  $^{19}\text{F}$ -MRT<sup>112</sup>. Daher ist die Translation dieser Technik in die Klinik derzeit noch auf das „tracking“ *in vitro* markierter humaner Zellen in Tiermodellen<sup>222-224</sup> und auf die i. v. Applikation von PFCs im Großtiermodell<sup>177,178</sup> beschränkt. Das, obwohl PFCs bereits eine lange Geschichte in der Humanmedizin in der Indikation als künstliche Blutersatzstoffe besitzen<sup>122</sup>. Eines der entscheidendsten Hindernisse bei der Übertragung der  $^{19}\text{F}$ -MRT in die Klinik ist, dass es noch keinen  $^{19}\text{F}$ - „tracer“ gibt, der für die i. v. Verabreichung am Menschen zugelassen ist. Zudem ist noch Forschung erforderlich, um die der Entzündungsbildgebung zugrundeliegenden Prozesse auf zellulärer Ebene zu ergründen. Beide Punkte waren Forschungsgegenstand der vorliegenden Studie.

### 4.1 Zelluläre Aufnahme, Gewebeverteilung und Bioeliminierung von PFCE-haltigen Nanopartikeln

Im Zentrum dieser Arbeit stand zum einen die Frage, ob die Formulierung von Perfluorkarbonen einen Einfluss auf die biologischen Eigenschaften der resultierenden Nanopartikel besitzt. Für die  $^{19}\text{F}$ -MRT *in vivo* eingesetzte Perfluorkarbone müssen ein einfaches Spektrum besitzen, um gut detektiert werden zu können. Optimalerweise besitzen sie ein Spektrum mit nur einer einzelnen Resonanzlinie, da dies die Anregung und Signaldetektion mit einer breiten Frequenzbandbreite erlaubt. Ein Perfluorkarbon mit einem solchen idealen Spektrum ist der Perfluor-15-kronen-5-ether (PFCE), da dieser 20  $^{19}\text{F}$ -Atome in identischer chemischer Umgebung besitzt<sup>225</sup>. Eine höhere Zahl von 36 chemisch äquivalenten  $^{19}\text{F}$ -Atomen enthält lediglich das noch relativ neue Molekül PERFECTA<sup>226</sup>. Solche Moleküle lassen sich sehr

gut in der MRT darstellen und quantifizieren<sup>123,192,227</sup>. In vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe wurde jedoch gezeigt, dass PFCE eine Halbwertszeit von über 250 Tagen aufweist, was klinisch nicht akzeptabel ist<sup>192</sup>. Andere Perfluorkarbonate, wie Perfluoroktylbromid (PFOB) besitzen zwar akzeptable Gewebehalbwertszeiten von 12 Tagen<sup>192</sup>, jedoch auch komplexere Spektren<sup>88,115</sup>. Der Einsatz von PFOB als *in vivo* „tracer“ Agens erwies sich im Schweinemodell als grundsätzlich möglich<sup>177,178</sup>. In der vorliegenden Studie sollte nun untersucht werden, ob der Einsatz des Kronenethers in verschiedenen Umhüllungen dessen biologische Eigenschaften beeinflusst. Hierfür wurden mit verschiedenen Hüllsubstanzen (PFCs, PLGA) ummantelte PFCE-haltige Nanopartikel charakterisiert, indem systematisch Gewebeverteilung und -halbwertszeit nach i. v. Applikation, die zelluläre Aufnahme der Partikel und mögliche zytotoxische Effekte der Substanzen untersucht wurden.

### 4.1.1 Die Ultrastruktur der Nanopartikel beeinflusst die Gewebehalbwertszeit

In der vorliegenden Studie wurde ein besonderes Augenmerk auf die Ausscheidung der Nanopartikel aus Milz und Leber sowie dem Knochenmark als Organe mit bekannter starker PFC-Akkumulation<sup>110,228</sup> gelegt. Es ist essentiell, dass Perfluorkarbonate im Anschluss an die Bildgebung schnell wieder aus dem Körper exkretiert werden<sup>125</sup>. In dieser Studie wurde eine schnelle Elimination sowohl der PFCs als auch der PLGA-NPs aus der Milz beobachtet, hingegen eine Persistenz der PFCs in der Leber, während die PLGA-NPs innerhalb weniger Tage fast vollständig aus diesem Organ eliminiert wurden.

Die Ausscheidung von Perfluorkarbonen aus biologischen Systemen ist aufgrund ihres vorherigen Einsatzes als chirurgischer Blutersatzstoff gut erforscht<sup>115</sup>. Nach der zellulären Aufnahme werden die Lipidhüllen der PFCs abgebaut und die Perfluorkarbontröpfchen zunächst intrazellulär gelagert, bevor sie langsam zurück ins Blut gelangen. Dort, gebunden an dem Fetttransport dienende Plasmaproteine, werden sie in gelöster Form zur Lunge transportiert und über diese dosisabhängig abgeatmet<sup>122,229,230</sup>. Eine aktive Exozytose wurde für Perfluorkarbonate noch nicht<sup>231</sup> und auch für Nanopartikel nur vereinzelt berichtet<sup>232</sup>. Die Geschwindigkeit der Elimination aus den Zellen hängt vom verwendeten Perfluorkarbon ab<sup>192</sup>. Sie ist durch das Molekulargewicht und die Lipophilie des jeweiligen Perfluorkarbons bedingt<sup>125</sup> und proportional zu dessen Dampfdruck, welcher negativ mit dem Molekulargewicht und positiv mit der Lipophilie korreliert ist<sup>122</sup>. D. h., kleine Perfluorkarbonate mit hohem Dampfdruck werden am schnellsten ausgeschieden<sup>115</sup>. So liegen die Halbwertszeiten von PFD bei neun Tagen, von PFOB bei 12 Tagen und von F-44E bei 28 Tagen<sup>192</sup>.

Hier wurde als Perfluorkarbon der Kronenether verwendet, dessen biologische Halbwertszeit aufgrund des hohen Molekulargewichts und des dadurch bedingten geringen Dampfdrucks dieses Perfluorkarbons<sup>163</sup> im Gegensatz zu den vorgenannten Perfluorkarbonen mit über 250 Tagen angegeben wird<sup>117,192</sup>. Übereinstimmend mit den Vorstudien, wurde für die in der vorliegenden Studie eingesetzt-

ten PFCs ebenfalls keine Reduktion des  $^{19}\text{F}$ -Signals in der Leber über die Messphase von 28 Tagen beobachtet. Die PLGA-NPs hingegen wiesen überraschenderweise eine Halbwertszeit von lediglich 17 Tagen auf. Unterschiede zwischen PFCs und PLGA-NPs bestehen zum einen in den Hüllsubstanzen. Diese sind jedoch in beiden Fällen biodegradierbar<sup>171,233,234</sup>. Des Weiteren besteht ein Unterschied zwischen den Partikeln in deren Ultrastruktur<sup>207</sup>. Von dieser wurde gezeigt, dass sie bereits *in vitro* einen Einfluss auf die Stabilität der Nanopartikel hat. So konnten unsere Kooperationspartner der AG Srinivas (RadboudUMC, Nijmegen, Niederlande) zeigen, dass PLGA-NPs bereits bei mehrtägiger Inkubation in Puffer bei 37 °C in Nanodomänen zerfallen, d. h. in einzelne kleine Perfluorkarbontröpfchen, welche immer noch von einer Hülle aus PLGA ummantelt werden<sup>235</sup>. Aufgrund der vorliegenden Daten wurden folgende Hypothesen für die schnelle Ausscheidung der PLGA-NPs aus dem Körper aufgestellt: Die PLGA-NPs werden aufgrund ihrer Hüllsubstanz besser von Zellen aufgenommen als die PFCs. In den Zellen zerfallen sie aufgrund ihrer Ultrastruktur bereits kurz nach ihrer Aufnahme in Nanodomänen, welche zum einen schneller aus den Zellen freigesetzt und ins Blut rezirkuliert werden als die großen Perfluorkarbontröpfchen der PFCs. Des Weiteren werden die aus den Nanodomänen freigesetzten kleineren PFCE Tröpfchen schneller über die Lunge abgeatmet (**Abbildung 4.1**).

Um zu überprüfen, ob die Ultrastruktur der Nanopartikel der Grund für die schnellere Ausscheidung der PLGA-NPs aus dem Körper war, wurden von der AG Srinivas zusätzlich zu den beschriebenen PLGA-NPs noch sogenannte PLGA-NCs hergestellt. Deren Hüllsubstanz bestand ebenfalls aus PLGA, sie enthielten den Kronenether jedoch, wie die PFCs in Form eines einzelnen großen Tropfens. Für diese Partikel zeigte sich eine Gewebelagerungszeit, die derjenigen der PFCs entsprach. So wiesen sie ebenfalls eine Retention in der Leber über die gesamte Messperiode auf<sup>236</sup>. Dies unterstützt die Hypothese, dass, anders als aus der Literatur bekannt, nicht allein Molekulargewicht, Dampfdruck und Lipophilie des jeweiligen Perfluorkarbons die Geschwindigkeit seiner Ausscheidung bedingen, sondern dass zudem die Ultrastruktur der verwendeten Nanopartikel die Ausscheidungsgeschwindigkeit des Perfluorkarbons entscheidend beeinflusst.

Eine alternative Hypothese für die schnelle Elimination der PLGA-NPs aus der Leber ist eine Umverteilung dieser Nanopartikel in andere Organe, wie Knochenmark und Lymphknoten, von denen ebenfalls eine Akkumulation von PFCs bekannt ist. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde in der vorliegenden Studie das  $^{19}\text{F}$ -Signal in Knochenmark und Lymphknoten untersucht. Hierbei zeigte sich, dass sich die PLGA-NPs, verglichen mit den gleich großen bNEs initial unverändert in Knochenmark und Lymphknoten anreicherten. Dem folgte eine schnelle Ausscheidung der PLGA-NPs aus dem Knochenmark, bei Persistenz des Signals der bNEs in diesem Organ, was nahelegt, dass die PLGA-NPs nicht allein aus der Leber, sondern auch aus anderen Organen sehr schnell eliminiert werden. Auch eine vermehrte Aus-



scheidung der PLGA-NPs über Kot oder Urin als alternativer Exkretionsweg kann ausgeschlossen werden, da sich in <sup>19</sup>F-MRT Untersuchungen von Kot, Harnblase und Darm sowie *Feces* kein <sup>19</sup>F-Signal nachweisen ließ<sup>236</sup>.

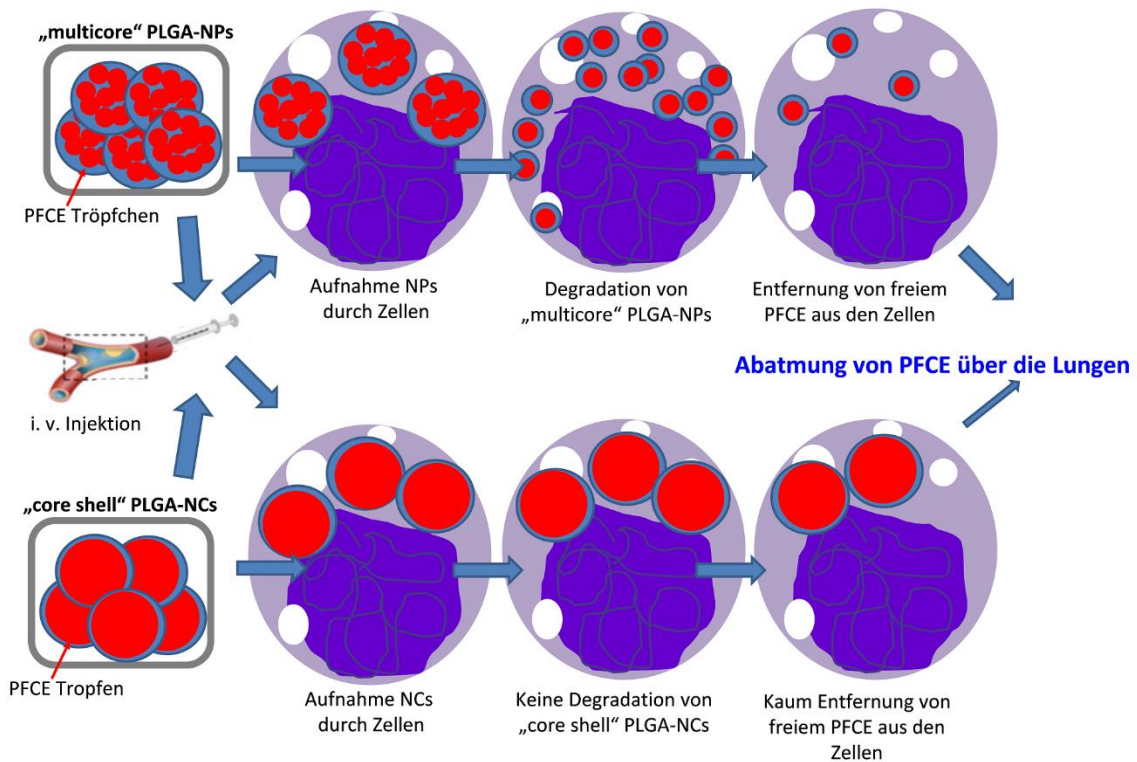
#### 4.1.1 Größe und Oberflächeneigenschaften beeinflussen die zelluläre Aufnahme von Nanopartikeln

Um weitere Hinweise auf die Ursachen der schnellen Bioelimination der PLGA-NPs zu finden, wurde in diesem Studienabschnitt die zelluläre Aufnahme von PFCs und PLGA-Nanopartikeln durch kultivierte und primäre Zellen untersucht. Insbesondere eine deutlich stärkere zelluläre Aufnahme der PLGA-NPs könnte zu einer schnelleren Degradation des umhüllenden PLGAs mit Freisetzung des PFCEs aus den Zellen führen (**Abbildung 4.1**). In der vorliegenden Studie zeigte sich sowohl in Kulturzellen als auch in primären Zellen aus Leber und Milz eine bessere Aufnahme beider Arten von PLGA-Nanopartikeln verglichen mit den PFCs. Unter den PFCs war die Aufnahme der bNEs deutlich besser als die der sNEs. Interessanterweise wurden von Monozyten aus dem Blut im Gegensatz dazu sNEs am stärksten aufgenommen, während insbesondere die PLGA-NPs nur eine schwache Aufnahme durch diesen Immunzellsubtyp aufwiesen. In Zellen aus Milz und Leber zeigte sich eine klar erkennbare Aufnahme von PFCs und PLGA-Nanopartikeln durch sämtliche untersuchten Zellsubpopulationen.

Für die besonders effiziente Aufnahme der PLGA-Nanopartikel durch verschiedene Arten von Zellen gibt es verschiedene mögliche Erklärungen. Neben der Größe<sup>128,237–239</sup> sind Oberflächencharakteristika<sup>88,128,240,241</sup>, Geometrie<sup>128,242</sup> sowie Perfluorkarbonszusammensetzung und -konzentration<sup>128</sup> die wichtigsten Faktoren, welche die Aufnahme von Nanopartikeln durch Phagozyten (und andere Zellen) beeinflussen<sup>123,243</sup>. PLGA-Nanopartikel besitzen ein weniger negatives  $\zeta$ -Potential (-23 bzw. -31 mV für NPs und NCs) als bNEs (-43 mV). Für andere Nanopartikel wurde für verschiedene Tumorzelltypen, Endothelzellen, Immun- und Stammzellen<sup>241,244–247</sup>, ebenso wie für *Hepatozyten*<sup>232</sup> gezeigt, dass kationische Partikel besser aufgenommen werden als anionische. Im Gegensatz dazu nehmen Kupferzellen vor allem anionische Partikel auf<sup>232</sup>. Die in der Regel präferierte Aufnahme von kationischen Partikeln könnte dadurch bedingt sein, dass positiv geladene Partikel besser an die negativ geladene Oberfläche von Zellen binden<sup>129,248–250</sup>. Die vorliegende Studie legt nahe, dass es bezüglich der Oberflächenladung einen Schwellenwert geben könnte, ab dem Partikel besser von Zellen aufgenommen werden. Um dies genauer zu untersuchen, müssten Studien an Nanopartikeln mit identischer Ummantelung, aber unterschiedlicher Oberflächenladung durchgeführt werden. Als weitere mögliche Erklärung für die effiziente zelluläre Aufnahme mit PLGA ummantelter Nanopartikel kommen die Zuckerstrukturen auf deren Oberfläche in Betracht, die möglicherweise bevorzugt phagozytiert werden, z. B. über Mannoserezeptoren<sup>251</sup>.

Das hier beobachtete Aufnahmeprofil der PFCs entspricht Daten aus der Literatur. So ist bereits aus einer Studie von Flögel et al. aus dem Jahr 2008<sup>110</sup> bekannt, dass der überwiegende Teil der Blutimmunzellen (80 %), die Fluorophor-gekoppelte PFCs (ca. 130 nm Durchmesser) aufnahmen, CD11b positiv war. Die restlichen 20 % waren B-Zellen, und nur <2 % T-Zellen. Entsprechende Beobachtungen mit einer weiteren Differenzierung (Monozyten>Neutrophile>B-Zellen) wurden in nachfolgenden Studien gemacht<sup>88,163,252,253</sup>. Diese Präferenz bezüglich der PFC-Aufnahme durch die einzelnen Immunzellsubtypen gilt sowohl für *in vitro* Inkubation als auch für *in vivo* Markierung<sup>88,110,131,195</sup>. Die nur schwache Aufnahme der PLGA-NPs durch Monozyten könnte damit zu erklären sein, dass die positivere Oberflächenladung der PLGA-NPs, einer PEGylierung<sup>128</sup> ähnlich, deren Aufnahme über Phagozytose reduziert<sup>254–257</sup>. Die gute Aufnahme der PLGA-NPs durch Lymphozyten entspricht den Beobachtungen verschiedener Autoren, dass dieser Typ von Partikeln unabhängig von der Gegenwart von Transfektionsagenzien auch von nicht-phagozytotischen Zellen aufgenommen wird<sup>123,130,145,151,258</sup>. Dies könnte ebenfalls im weniger negativen  $\zeta$ -Potential dieser Partikel begründet sein. Jedoch wurde in einzelnen Studien auch für PFCs gezeigt, dass die *in vitro* Aufnahme dieser Art von Nanopartikeln in nicht-phagozytotische Zellen ohne Transfektionsagenzien möglich ist<sup>259–261</sup>. Dem entspricht die hier zu beobachtende schwache Aufnahme auch der PFCs in die nicht-phagozytotischen Lymphozyten.

Interessanterweise wurden PFCs und PLGA-Nanopartikel in der vorliegenden Studie *in vitro* in alle untersuchten Zellpopulationen der Leber und Milz aufgenommen. Aus vorhergehenden Studien ist bekannt, dass PFCs im Gewebe vorrangig von Makrophagen aufgenommen werden. So zeigte sich in der Leber eine präferentielle Aufnahme durch Kupfferzellen<sup>171</sup>, während in der Lunge nach Pneumonie vor allem Monozyten PFCs aufnahmen<sup>120</sup>. Hingegen ist in der Regel keine Kolo-kalisation mit anderen Zelltypen wie Neutrophilen oder Endothelzellen zu beobachten<sup>89,110,119,179,184</sup>. Andererseits wurde auch in einzelnen weiteren Studien eine Lokalisation von PFCs in anderen Immunzelltypen als Makrophagen berichtet<sup>186</sup>, wie in myeloischen Suppressorzellen, welche aus Tumoren dissoziiert wurden<sup>161</sup>, oder in B-Zellen in Lymphknoten<sup>88,110</sup>. Von anderen Typen von Nanopartikeln ist zudem auch eine Aufnahme in *Hepatozyten* bekannt<sup>232,262</sup>. Die Daten der vorliegenden Studie unterstützen das Bild einer Aufnahme von PFCs durch eine heterogenere als ursprünglich angenommene Zellpopulation.



**Abbildung 4.1: Hypothese zur schnellen Ausscheidung der PLGA-NPs.** Die PLGA-NPs werden nach i. v. Injektion, verglichen mit PFCs vermehrt von Zellen aufgenommen. In diesen zerfallen sie bereits nach kurzer Zeit in Nanodomänen – d. h. einzelne PFCE-Tröpfchen, welche immer noch von einer Schicht PLGA ummantelt sind. Die Nanodomänen werden bereits nach kurzer Zeit ins Blut rezirkuliert und das frei werdende PFCE wird in der Folge schnell und effizient über die Lunge abgeatmet. In PFCs und PLGA-NCs liegt der Kronenether in Form eines einzelnen großen Tropfens vor, der nach der Aufnahme durch Zellen nicht weiter fragmentiert wird. Aufgrund seines hohen Molekulargewichts wird das in dieser Form vorliegende PFCE in den Zellen zurückgehalten und nur in sehr geringem Maße ins Blut rezirkuliert und über die Lunge abgeatmet.

#### 4.1.2 Die Größe der Nanopartikel beeinflusst die Bluthalbwertszeit

Um zu untersuchen, ob es weitere Unterschiede im Verhalten der PFCs und PLGA-NPs gibt, wurde die Bluthalbwertszeit von PFCs und PLGA-NPs untersucht. Bei dieser zeigte sich eine Größenabhängigkeit. So waren die 226 nm PLGA-NPs und die 299 nm bNEs bereits nach 1 h nicht mehr im Blut nachweisbar, während die 83 nm großen sNEs eine Bluthalbwertszeit von 4-10 h aufwiesen.

Bereits in vorhergehenden Studien an Mäusen wurde die Bluthalbwertszeit von PFCs mit einem Durchmesser von ca. 130 nm mit 72 h angegeben<sup>110 120</sup>. In weiteren Studien wurden für Partikel mit einem mittleren Durchmesser von 145 nm Bluthalbwertszeiten von 9 - 12 h beobachtet<sup>119</sup>. Übereinstimmend mit der vorliegenden Studie wurde auch von anderen Autoren eine reduzierte Bluthalbwertszeit größerer Nanopartikel (z. B. unter 1 h für 250 nm PFCs<sup>7</sup>) beobachtet. Um korrekte Rückschlüsse über die Ursachen der unterschiedlich langen Bluthalbwertszeiten von PFCs und PLGA-NPs ziehen zu können, muss zunächst bedacht werden, in welchem Zustand die Partikel im Blut vorliegen. So könnten sie frei im Blut zirkulieren oder an Blutimmunzellen gebunden sein. In mehreren Studien fanden sich PFCs 2-

12 h nach i. v. Injektion mit Monozyten und Neutrophilen, und nach 24-48 h mit Monozyten assoziiert, bevor sie nach drei Tagen wieder aus dem Blutstrom verschwanden<sup>110,120</sup>. In einer weiteren Studie konnte über 2 h nach der Injektion von PFCs ein <sup>19</sup>F-Signal in Blutplasma detektiert werden<sup>263</sup>.

Die Elimination zellgebundener PFCs aus dem Blut erklärt sich durch ein Auswandern der die Partikel enthaltenden Immunzellen aus dem Blut in Leber, Milz und Knochenmark - Organe, in denen zirkulierende Immunzellen lokale Immunzellpopulationen ersetzen oder gealterte Blutimmunzellen eliminiert werden<sup>264</sup>. Eine mögliche Erklärung für die Größenabhängigkeit der Eliminationsdauer der Partikel aus dem Blut könnte die bessere Aufnahme größerer Partikel durch phagozytische Blutimmunzellen sein, ebenso wie eine bessere Aufnahme der frei im Blut vorliegenden Partikel durch phagozytische Zellen in Organen<sup>123,128,265</sup>. Solche finden sich hauptsächlich im retikuloendothelialen System, das insbesondere die Makrophagen der Milz und die Kupfferzellen der Leber umfasst<sup>266,267</sup>. Die Aufnahme von Partikeln oberhalb einer bestimmten Größe durch Phagozyten der Milz wird dabei dadurch befördert, dass Partikel ab einem Durchmesser von 100-200 nm die endothelialen Lücken der splenischen Sinus nicht mehr durchdringen können, wodurch sie vermehrt in der roten Pulpa zurückgehalten und von lokalen Makrophagen aufgenommen werden<sup>268</sup>. In der Leber hingegen können Partikel bis zu einem Durchmesser von 500 nm ungehindert durch die Poren im Endothel treten<sup>269</sup>. Neben der Aufnahme durch Phagozyten gibt es aber auch noch andere Ausscheidungswege von Nanopartikeln aus dem Körper. So werden kleine Partikel bis zu einem Durchmesser von 6 bis maximal 8 nm vorrangig über glomeruläre Filtration ausgeschieden<sup>232,262</sup>. Nanopartikel können zudem von *Hepatozyten* aufgenommen, abgebaut und über die Galle in den Dünndarm exkretiert werden<sup>232</sup>. Von *Hepatozyten* werden kleine Nanopartikel von 50 nm deutlich schneller exkretiert als solche von 100 nm Durchmesser, während über 200 nm fast keine Exkretion über *Hepatozyten* mehr zu beobachten ist<sup>232</sup>.

Abgesehen von der Größe ist bekannt, dass auch die Oberflächenladung eine entscheidende Rolle für die Bluthalbwertszeit spielt. So sind die Zirkulationszeiten von leicht negativ geladenen oder neutralen Nanopartikeln deutlich verlängert gegenüber den sehr kurzen Zirkulationszeiten von kationischen und den immer noch längeren Zirkulationszeiten von stark anionischen Nanopartikeln<sup>247,262</sup>. Dies begründet sich vorrangig in unterschiedlich guter Adsorption geladener Nanopartikel an Plasmaproteine, welche schließlich zur Ausbildung einer Proteinkorona führt<sup>247,262</sup>. So zeigen positiv geladene Partikel eine bessere Bindung an negativ geladene Moleküle im Blut, wozu neben Plasmaproteinen aber auch Zuckerreste von Zellmembranen gehören, während neutrale oder negativ geladene Partikel eine reduzierte Bindung an Serumproteine aufweisen<sup>232,270</sup>. Die Proteinkorona erhöht zum einen den hydrodynamischen Durchmesser der Nanopartikel, zum anderen befördert sie in Form einer Opsonierung die Phagozytose, wodurch letztendlich die Aufnahme in Gewebe beeinflusst wird<sup>232,247,262</sup>.

Möglich wäre, dass die Unterschiede in den Bluthalbwertszeiten der PLGA-NPs, bNEs und sNEs dadurch zustande kommen, dass PLGA-NPs und bNEs größenabhängig deutlich besser von den phagozytischen Zellen des RES aufgenommen und hierdurch schneller aus dem Blut herausgefiltert werden als sNEs. Die unterschiedliche Ladung der Nanopartikel scheint hingegen eine untergeordnete Rolle zu spielen, da keine Unterschiede in der Bluthalbwertszeit der bNEs und PLGA-NPs zu beobachten waren. Möglicherweise könnten entsprechende Unterschiede detektiert werden, wenn das Signal früher als 1 h nach Partikelinjektion gemessen würde, also zu einem Zeitpunkt, zu dem noch ein Signal für die beiden Partikel im Blut detektiert werden kann.

### 4.1.3 Die Größe der Nanopartikel beeinflusst die Gewebeverteilung

Es ist bekannt, dass sich PFCs nach ihrer Elimination aus dem Blut zunächst in Organen anreichern, die reich an Makrophagen bzw. phagozytierenden Zellen sind<sup>170</sup>. Zu diesen phagozytenreichen Organen gehört insbesondere das retikuloendotheliale System (RES), dem die Milz sowie die Leber zugeordnet werden<sup>228</sup>. Ob die PFCs im RES zellgebunden, z. B. in Makrophagen oder frei im *intravaskulären* oder *extravaskulären/interstitiellen* Raum vorliegen ist noch unklar<sup>88,192,266,271</sup>. Einhergehend mit der größenabhängigen Elimination von PFCs aus dem Blut ist von diesen Organen bekannt, dass sie vermehrt größere Nanopartikel (>250 nm) akkumulieren<sup>7,232</sup>. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass sich die 226 nm PLGA-NPs und die 299 nm bNEs zum einen schneller in Milz und Leber anreicherten, während die mit 83 nm kleineren sNEs eine langsamere Anflutung zeigten. Des Weiteren waren das in diesen Organen initial erreichte maximale <sup>19</sup>F-Signal für PLGA-NPs und bNEs sowie das Plateau der bNEs höher als das der sNEs, obwohl die Partikel in Verdünnungen mit identischem <sup>19</sup>F-Gehalt injiziert wurden.

Die Translokation von Partikeln von einer Seite der Gewebearriere auf die andere ist ein Phänomen, das in vielen Geweben und Organen beobachtet wird. Die genauen Mechanismen – also z. B. ob ein trans- oder parazellulärer Transport oder eine rezeptormediierte Einwanderung innerhalb von Zellen stattfinden – sind häufig unbekannt<sup>232,264</sup>. Die in der vorliegenden Studie untersuchten Organe haben gemein, dass sie eine Endothelauskleidung aufweisen, die für einen vermehrten Übertritt von Nanopartikeln aus dem Blut in das Parenchym prädisponiert ist<sup>262</sup>. So besitzt die Milz in den Milzsinusoiden ein diskontinuierliches Endothel (Spaltenweite bis 5 µm)<sup>272</sup>. An diesen Spalten häufen sich zudem bevorzugt phagozytoseaktive Makrophagen an<sup>262,268,272,273</sup>, die die übergetretenen Nanopartikel unmittelbar phagozytieren können. In der Leber wird das Zytoplasma der flachen Endothelzellen zum einen durch eine meist große Zahl von Poren (Durchmesser bis zu 0,5 µm) durchbrochen, zudem liegt ebenfalls ein diskontinuierliches Endothel vor und eine Basalmembran fehlt. Außerdem besitzt die Leber eine Sonderform der endothelialen Wandauskleidung in Form von Kupfferzellen, die sich teilweise von

der Endothelwand lösen oder sich in die Sinusoide vorwölben und partikuläre Bestandteile direkt aus dem Blut phagozytieren können<sup>269</sup>.

Neben dem RES findet sich eine Anreicherung von Nanopartikeln auch in Lymphknoten<sup>110,198,247</sup>, Knochenmark und Lunge, die ebenfalls reich an Makrophagen sind, sowie in den Nieren, auch wenn die Aufnahme in diese Organe nicht so stark ist wie die in Milz und Leber<sup>115,198,232,274</sup>. Auch die Endothelien des Knochenmarkes, die diskontinuierlich sind (Weite der Endothelfenster: ca. 85-150 nm), dünn und keine Basalmembran aufweisen, ermöglichen einen leichten Übertritt von Nanopartikeln ins Gewebe<sup>275</sup>. Zudem wird eine transzelluläre Passage von Partikeln vom Blutgefäßsystem ins Knochenmark beobachtet<sup>275</sup>. Die in der vorliegenden Studie beobachtete vermehrte Akkumulation der 226 bzw. 299 nm großen Nanopartikel im Gegensatz zu den 83 nm großen Nanopartikeln im Knochenmark ließe sich mit einer transzellulären Aufnahme erklären, die den Übertritt der Partikel unabhängig machen würde von der durch die Endothelweite vorgegebenen Größenlimitation. Die Anreicherung von Nanopartikeln in Nieren, aber auch im Herz war in einer Studie an Goldnanopartikeln für Partikel im Bereich 18-200 nm unabhängig von der Partikelgröße<sup>262</sup>. In Lymphknoten fand sich hingegen eine vermehrte Anreicherung von SPIOs mit einem geringeren Durchmesser <50 nm<sup>262</sup>. Auch die Wände der Sinusräume in den Lymphknoten besitzen Lücken, durch die Lymphozyten ebenso wie zirkulierende Antigene – oder auch Nanopartikel – ins retikuläre Gewebe eintreten können<sup>273</sup>. Übereinstimmend mit Daten aus der Literatur<sup>262</sup> wurde in der vorliegenden Studie gezeigt, dass Nanopartikel mit einem Durchmesser von 83 nm, anders als Nanopartikeln über 200 nm, in das Parenchym der Lymphknoten übertreten, was auf eine Größenlimitation für den Übertritt von Partikeln über das Endothel hindeutet. So könnten insbesondere die hochendothelialen Venolen mit ihren spezialisierten Adhäsionsmolekülen und dichten tight junctions<sup>276–278</sup> verhindern, dass Nanopartikel oberhalb einer bestimmten Größe in das Parenchym gelangen. Ein weiterer Faktor, welcher die Unterschiede in der Gewebeverteilung beeinflussen könnte ist das  $\zeta$ -Potential, welches sich zwischen den verwendeten Partikeln unterscheidet: -43 mV für die bNEs, -23 mV für die PLGA-NPs. So zeigte sich, dass z. B. die hepatische Clearance neben der Größe und Form der Partikel wesentlich von deren Oberflächenladung abhängt und auch die Bindung durch Zellen des RES hängt von der Ladung der Partikel ab<sup>232,262,279</sup>.

Fasst man die Ergebnisse aus den Untersuchungen zur Bluthalbwertszeit und Gewebeverteilung der vorliegenden Studie zusammen, so ist offenbar die Partikelgröße der entscheidende Faktor sowohl für die vaskuläre Halbwertszeit als auch für die Gewebeverteilung. Oberflächenladung und Hüllsubstanz der eingesetzten Partikel besitzen offenbar nur eine untergeordnete Rolle, da PLGA-NPs und bNEs trotz diesbezüglicher Unterschiede, bei vergleichbarer Größe, eine ähnliche Gewebeverteilung aufweisen.

#### 4.1.4 Nanopartikelkonzentration, Phagozytose und Opsonierung beeinflussen die zelluläre Aufnahme von Nanopartikeln

Für die zelluläre Partikelaufnahme (Endozytose) kommen, abhängig von der Größe der Partikel, verschiedene Mechanismen in Frage. Die Endozytose kann in Phagozytose (Partikel über 250 nm), rezeptor-medierte Endozytose und Pinozytose (Flüssigkeit, kleine Partikel) eingeteilt werden<sup>7,280</sup>. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde genauer untersucht, durch welche Mechanismen PFCs und PLGA-Nanopartikel von Zellen aufgenommen werden. Hierbei zeigte sich, dass sowohl PFCs als auch PLGA-Nanopartikel konzentrationsabhängig aufgenommen wurden. Eine Aufnahme in nennenswertem Ausmaß erfolgte nur bei physiologischer Körpertemperatur. Während PFCs in Gegenwart von Serum besser aufgenommen wurden, wiesen PLGA-NPs in der Gegenwart von Plasmabestandteilen eine verminderte Aufnahme auf. Die Endozytose beider Arten von Partikeln konnte durch Inhibition der Phagozytose reduziert werden, während die Blockade der Clathrin-medierten Endozytose und von Fc-Rezeptoren keine Effekte auf die Aufnahme der Partikel durch Blutzellen hatte.

Die Beobachtung, dass PFCs und PLGA-NPs zwar bei 37 °C, nicht jedoch bei 4 °C, also einer Temperatur, bei der keine ATP-verbrauchenden Prozesse mehr stattfinden aufgenommen werden, stimmt mit den Ergebnissen weiterer Autoren überein<sup>7</sup>. In der vorliegenden Studie fand sich jedoch auch bei niedrigen Temperaturen immer noch ein geringer Prozentsatz an Zellen, welcher Partikel aufnahm. Eine Ursache hierfür könnte zum einen ein passives Anhaften der Partikel an der Zelloberfläche sein. Ein solches ist insbesondere als Grund für das starke Signal der bNEs in den Kulturzellen bei geringen Temperaturen anzunehmen, da dieses auf Sedimentation der großen Nanopartikel zurückzuführen sein könnte. Als weiterer Grund für eine geringe, aber dennoch detektierbare Partikelaufnahme bei niedrigen Temperaturen wird eine energieunabhängige Aufnahme der Partikel in tiefe, mit Clathrin ausgekleidete Vertiefungen an der Zelloberfläche diskutiert, die sich in der Durchflusszytometrie wie eine Partikelaufnahme darstellt, jedoch von einer vollständigen, energieabhängigen Endozytose zu unterscheiden ist<sup>281</sup>.

Eine effektive Phagozytose bzw. Entfernung von Nanopartikeln aus dem Blutstrom findet nur bei Opsonierung der Partikel durch Plasmabestandteile<sup>163,239,282,283</sup>, wie z. B. Komplementfaktoren<sup>163,254</sup> statt. Hiermit übereinstimmend wurden PFCs in Gegenwart von Plasmabestandteilen besser von Monozyten aufgenommen als nach Entfernung des Plasmas. In verschiedenen *in vitro* Studien wurde jedoch beobachtet, dass die Phagozytose von Nanopartikeln in der Gegenwart von Serum vermindert ist<sup>284,285</sup>. Hiermit stimmt überein, dass die Aufnahme der PFCs durch Neutrophile sowie der PLGA-NPs durch Monozyten und Neutrophile in der Gegenwart von Plasmabestandteilen stattdessen reduziert war. Eine mögliche Erklärung für die bessere Partikelaufnahme in der Abwesenheit von Plasmabestandtei-

len könnte sein, dass durch diese Strukturen an der Partikeloberfläche, wie Zuckerreste maskiert werden, so dass weniger Phagozytose stattfindet als ohne Opsonierung. Die Aufnahme der opsonierten Partikel wird offenbar nicht über Fc-Rezeptoren vermittelt, was mit Daten anderer Autoren übereinstimmt<sup>163</sup>.

In vorangehenden Studien wurde beobachtet, dass die Aufnahme von PFCs über Clathrin-medierte Endozytose erfolgt<sup>7</sup>. Um abzuklären, ob für die PFCs und PLGA-NPs eine Clathrin-medierte Endozytose oder eine Phagozytose als Aufnahmemechanismus in Frage kommen, wurde in der vorliegenden Studie die Clathrin-medierte Endozytose durch Chlorpromazin inhibiert. Chlorpromazin bewirkt eine Aggregation von Clathrin und Adaptorproteinen und deren Aufnahme in Endosomen, was die Clathrin-abhängige Endozytose blockiert<sup>286</sup>. Bei der Verwendung von Chlorpromazin in der vorliegenden Studie konnte keine Reduktion der Partikelaufnahme festgestellt werden. Dieser Mechanismus scheint somit nicht an der Aufnahme der sNEs und PLGA-NPs beteiligt zu sein. Um zu überprüfen, ob stattdessen Phagozytose eine Rolle bei der Aufnahme der sNEs und PLGA-NPs spielt, wurde Cytochalasin D verwendet. Dieses inhibiert die Kontraktion des Aktinskelettes, welches für die Phagozytose benötigt wird, und blockiert diese dadurch. Interessanterweise wurde die Aufnahme von sNEs, jedoch nicht die der PLGA-NPs (Durchmesser 226 nm) durch Cytochalasin D inhibiert. Die PFCs liegen mit einem Durchmesser von 83 nm unter der angegebenen unteren Grenze für die Phagozytose (250 nm). Dies ist jedoch in Einklang mit einer weiteren Studie, in der ebenfalls die Aufnahme kleiner (100 nm) Nanopartikel durch Cytochalasin D inhibiert werden konnte<sup>287</sup>. Auch aus weiteren Studien ist eine aktive, rezeptor-medierte Phagozytose als Aufnahmemechanismus von PFCs mit einer Größe von 133-226 nm durch Monozyten und Makrophagen bekannt<sup>163,179</sup>. Damit scheint der primäre Mechanismus der Aufnahme der hier verwendeten PFCs, nicht jedoch der der PLGA-NPs die Phagozytose zu sein.

#### 4.1.5 PFCs und PLGA-Nanopartikel zeigen keine zytotoxischen Effekte

*Intravenöse* Emulsionen müssen, wie alle *parenteralen* Produkte pharmakopöischen Anforderungen entsprechen<sup>140,288</sup>. Dies dient dazu, reproduzierbare Eigenschaften zu gewährleisten und toxische Effekte auf den Empfängerorganismus *in vivo* auszuschließen. Für PFCs, ebenso wie für PLGA-Nanopartikel werden ausschließlich Bestandteile eingesetzt, die bekanntermaßen biokompatibel sind: Die verwendeten Perfluorkarbone sind aufgrund ihrer chemischen Struktur biologisch und chemisch inert<sup>125,130,289</sup>. Für die Lecithine, welche in der vorliegenden Studie als Quelle der Phospholipide dienen, die die Hüllsubstanzen der PFCs darstellen sind keine Inkompatibilitäten bekannt<sup>141</sup>. Lecithine werden zudem vom menschlichen Körper vollständig metabolisiert<sup>140,288</sup>. PLGA ist ebenfalls biokompatibel<sup>290-295</sup> und wird im Körper durch Esterhydrolyse<sup>123,296</sup> vollständig zu Lactat und Glykolsäure abgebaut, welche entweder unverändert über die Nieren exkretiert oder im Körper über den Zitratzyklus vollständig abgebaut und schließlich als CO<sub>2</sub> und Wasser ausgeschieden werden<sup>171,233,234</sup>.



Für die hier verwendeten PFCs und PLGA-Nanopartikel gibt es jedoch noch keine systematischen Studien zu möglichen akuten zytotoxischen Effekten auf Kulturzellen, Blutimmunzellen und primäre Zellen aus Leber und Milz. Zudem war eine Hypothese für die schnelle Elimination der PLGA-NPs aus dem Körper, dass diese möglicherweise zytotoxische Effekte besitzen könnten. Dies würde zu einer schnellen Freisetzung der Nanopartikel aus den apoptotischen Zellen, gefolgt von erneuter Aufnahme durch Phagozyten führen. Die mehrfache Aufnahme und Freisetzung durch phagozytische Zellen könnte eine schnellere Degradation des umhüllenden PLGAs bewirken, was zu schnellerer Freisetzung des PFCs führen würde. In der vorliegenden Studie fanden sich weder bei durchflusszytometrischen noch bei morphologischen Untersuchungen der Zellen Hinweise auf akute zytotoxische Effekte der PFCs oder PLGA-Nanopartikel. Von unseren Kooperationspartnern wurde zudem Milz- und Lebergewebe von Mäusen, denen hoch dosierte PLGA-NPs verabreicht worden waren histologisch untersucht. Auch hier fanden sich keine Hinweise auf zytotoxische Effekte<sup>236</sup>. Das Fehlen akuter zytotoxischer Effekte stimmt mit Ergebnissen früherer Studien anderer Autoren überein, in denen PFCs und PLGA-Nanopartikel auf toxische Effekte untersucht wurden: In verschiedenen Studien konnte weder eine verminderte Vitalität, entzündliche Aktivierung noch ein Funktionsverlust von kultivierten Makrophagen<sup>179</sup>, Monozyten<sup>163</sup>, T-Zellen<sup>224,248,297,298</sup>, NK-Zellen<sup>224,299,300</sup>, DCs<sup>248,265,301,302</sup> oder von neuronalen oder hämatopoetischen Stammzellen<sup>244,303–307</sup> detektiert werden. Lediglich in einzelnen Studien wurde in verschiedenen Zelllinien<sup>161,288</sup> und Blutimmunzellen<sup>163,223</sup> eine geringe Zunahme der Apoptoserate mit zunehmenden Dosen beobachtet. Für PLGA-ummantelte Perfluorkarbon-Nanopartikel wurden minimale entzündliche Effekte auf humane DCs<sup>123,130</sup> und kultivierte Makrophagen<sup>308</sup> beobachtet. Zudem fanden sich in geringem Maße entzündliche Reaktionen an PLGA-Membranen anhaftender Zellen<sup>291</sup>. In der vorliegenden Studie wurden weder für PFCs noch für die PLGA-Nanopartikel akute zytotoxische Reaktionen beobachtet. Allerdings wurden hier ausschließlich die Apoptoserate sowie morphologische Veränderungen der Zellen betrachtet. Entzündliche Reaktionen, wie eine erhöhte Zytokinproduktion wurden hingegen nicht untersucht. Entsprechend ist nicht auszuschließen, dass die Zellen auch bei der Verwendung der hier eingesetzten Nanopartikel einen leicht entzündlichen Phänotyp aufweisen, der aber offenbar keine sichtbaren klinischen Effekte hervorruft.

## 4.2 Einfluss von sterilen und nicht-sterilen Entzündungsprozessen auf die zelluläre Aufnahme und Gewebeverteilung von PFCs

Es ist bekannt, dass PFCs nach der i. v. Injektion von phagozytotischen Zellen im peripheren Blut aufgenommen werden<sup>118,120,170</sup>, die in der Folge in Entzündungsherde einwandern, so dass die inflammatorischen Foci mit hoher Sensitivität und Spezifität als sogenannte „hot spots“ hintergrundfrei mittels <sup>19</sup>F-MRT dargestellt werden können<sup>97,123</sup>. Zwar gibt es bereits zahlreiche Studien, in denen das <sup>19</sup>F-Signal in Entzündungsherden mittels <sup>19</sup>F-MRT untersucht wurde, jedoch existiert noch keine systematische Charakterisierung des <sup>19</sup>F-Signals in verschiedenen peripheren Organen<sup>110</sup> unter entzündlichen Bedingungen. Zudem ist aktuell noch nicht bekannt, welcher Anteil der PFCs, die das <sup>19</sup>F-Signal im Entzündungsherd erzeugen, in der Peripherie von zur Phagozytose fähigen Zellen aufgenommen und von diesen zum Entzündungsherd transportiert wird. So könnte ein gewisser Teil der injizierten PFCs frei im Blut den Entzündungsherd erreichen, das entzündliche, permeable Endothel durchtreten und erst lokal im Entzündungsherd von residenten Immunzellen aufgenommen werden.

### 4.2.1 Die zelluläre Partikelaufnahme ist unter entzündlichen Bedingungen gesteigert

Das Wissen über die zelluläre Aufnahme von Nanopartikeln unter entzündlichen Bedingungen ist zurzeit noch begrenzt. Es ist bekannt, dass die Aufnahme von Mikropartikeln in der Gegenwart von LPS erhöht ist<sup>309,310</sup>. Allerdings gibt es bisher nur eine einzige Studie, in der die *in vivo* Aufnahme von Nanopartikeln durch Immunzellen nach der i. v. Injektion von LPS in Mäusen untersucht wurde. Hier fand sich in verschiedenen Organen eine verstärkte Kollokalisierung von Polystyrol-Nanopartikeln mit Neutrophilen<sup>311</sup>. Bisher gibt es jedoch keine Daten zur zellulären Aufnahme von PFCs durch *in vitro* mit LPS-stimulierte Zellen. Ebenso sind die Daten zur zellulären Aufnahme von PFCs unter entzündlichen Bedingungen begrenzt. Auf diesem Gebiet fand sich eine Studie, in der Nienhaus et al.<sup>163</sup> *in vitro* keine Veränderung der Aufnahme von PFCs durch aus dem Blut von MI-Patienten isolierte Monozyten, verglichen mit Zellen aus dem Blut gesunder Probanden beobachten konnten. Genauere Kenntnisse auf diesem Gebiet sind von großem Interesse, da nur so die Entstehung des <sup>19</sup>F-Signals im Körper unter entzündlichen Bedingungen erklärt werden kann.

Um zu untersuchen, ob die zelluläre Aufnahme der PFCs, die das <sup>19</sup>F-Signal im Entzündungsherd erzeugen, vorrangig durch periphere Blutimmunzellen oder auch durch lokale Immunzellen im Entzündungsherd erfolgt, wurde die PFC-Aufnahme durch aus peripherem Blut in Gegenwart eines Entzündungsprozesses oder direkt aus dem Entzündungsherd gewonnene Immunzellen ermittelt. Zur genaueren Untersuchung der Mechanismen der zellulären PFC-Aufnahme unter entzündlichen Bedingungen, wurde zusätzlich die Aufnahme von PFCs durch *in vitro* mit LPS oder dem Akute-Phase Protein CRP stimulierte kultivierte und primäre Zellen untersucht. Hierbei zeigte sich *in vivo* eine stärkere PFC-Auf-

nahme insbesondere durch direkt aus dem Entzündungsherd isolierte Immunzellen, verglichen mit unstimulierten Kontrollzellen. Die Stimulation von Zellen mit Entzündungsmediatoren *in vitro* führte hingegen nicht zu einer wesentlichen Steigerung der Partikelaufnahme.

Bei Untersuchung der Aufnahme von PFCs durch Immunzellen in der vorliegenden Studie zeigte sich, dass eine verstärkte Aufnahme von PFCs durch aus dem Blut stammende Immunzellen bei MI nur bei einer frühen Blutentnahme 5-6 h post OP detektiert werden konnte. Möglicherweise sind die für die erhöhte Partikelaufnahme erforderlichen entzündlichen Stimuli bei MI nur in den ersten Stunden nach der Ischämie vorhanden. Dies könnte erklären, warum Nienhaus et al. bei Probenahme 3 Tage nach MI keine Unterschiede hinsichtlich der PFC-Aufnahme zwischen entzündlichem und nicht-entzündlichem Zustand detektieren konnten. In der vorliegenden Studie konnte zudem gezeigt werden, dass vor allem Neutrophile, erst an zweiter Stelle gefolgt von Monozyten in der perakuten Phase der Entzündungsreaktion eine deutlich erhöhte Partikelaufnahme aufweisen. Hieraus könnte der Schluss gezogen werden, dass das <sup>19</sup>F-Signal im Entzündungsherd zu diesem sehr frühen Zeitpunkt vor allem durch Neutrophile, bzw. durch die in diesem Zelltyp enthaltenen PFCs erzeugt wird. Dies stimmt damit überein, dass Neutrophile der erste Zelltyp sind, der bei akuter Entzündung in das entzündete Gewebe einwandert, und somit zu diesem Zeitpunkt in diesem den größten Anteil an Immunzellen darstellen<sup>14</sup>. Es ist zu vermuten, dass bei der Injektion von PFCs zu späteren Zeitpunkten Monozyten als dominierender Zelltyp<sup>31,40,41</sup> die Zellsubpopulation darstellen, die vorrangig das <sup>19</sup>F-Signal im „hot spot“ erzeugt.

Eine weitere interessante Beobachtung war, dass die Aufnahme der Partikel durch Immunzellen, die direkt aus den Entzündungsherden (Matrigel mit LPS) isoliert worden waren deutlich stärker war als die Aufnahme durch Leukozyten des peripheren Blutes. Dies könnte mit einer stärkeren Stimulation der lokalen Immunzellen durch das lokale entzündliche Milieu im Entzündungsherd zu erklären sein. Hierzu könnten z. B. erhöhte lokale Level an Zytokinen<sup>312</sup>, Chemokinen<sup>313</sup> oder z. B. die extrazelluläre Matrix (ECM)<sup>314,315</sup> beitragen.

Um die Mechanismen, die an der erhöhten Phagozytose von PFCs unter entzündlichen Bedingungen beteiligt sind genauer zu untersuchen, wurden Zellen (kultivierte Makrophagen, Blutimmunzellen, primäre *Splenozyten*) *in vitro* mit Entzündungsmediatoren (LPS oder CRP) stimuliert. Lipopolysaccharid (Endotoxin, LPS)<sup>210</sup> ist ein Bestandteil der äußeren Membran der meisten Gram-negativen Bakterien. Es setzt sich aus einem hydrophilen Polysaccharid und einer hydrophoben Komponente (Lipid A) sowie aus O-Antigen Wiederholungen zusammen<sup>211</sup>. Es entfaltet seine Wirkung durch die Aktivierung von Toll-Like-Rezeptoren<sup>316</sup>, insbesondere von TLR-4<sup>317</sup>. Zudem spielt auch CD14- „signaling“<sup>318,319</sup> eine wichtige Rolle. Die Effekte von LPS auf den Organismus beinhalten eine Aktivierung<sup>320,321</sup> von Monozyten/Makrophagen sowie Neutrophilen<sup>322,323</sup>, so die Steigerung der phagozytotischen Aktivität dieser

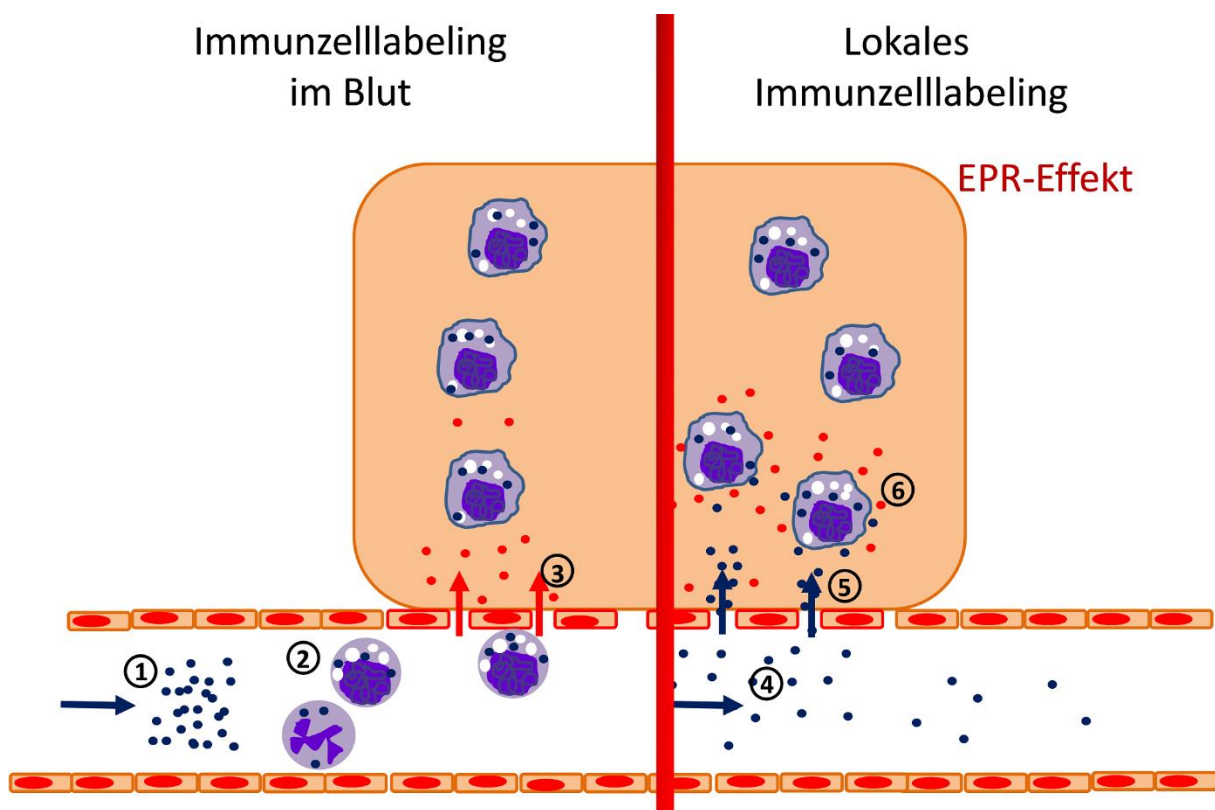
Zellen. Dies geschieht über eine durch TLR4 medierte Reorganisation des filamentären Aktins im Verlauf des Phagozytoseprozesses<sup>324,325</sup>. Bei der *in vitro* Stimulation von Zellen mit LPS zeigte sich in der vorliegenden Studie jedoch keine Steigerung der PFC-Aufnahme. Dies könnte darin begründet sein, dass in den genannten Studien anderer Autoren größere Partikel (Mikropartikel) verwendet wurden, z. B. mit IgG opsonierte Thrombozyten oder Schaferythrozyten sowie Latexbeads, deren vermehrte Aufnahme in primäre und kultivierte Makrophagen<sup>309,310,326–328</sup>, Neutrophile<sup>322,329</sup>, Astrozyten und Mikroglia<sup>330,331</sup> bei LPS-Stimulation gezeigt werden konnte. Ebenso fand sich eine erhöhte Phagozytose solcher Partikel durch LPS-stimulierte Monozyten *in vivo*<sup>310</sup>. Jedoch gibt es auch Studien, in denen eine ausbleibende Stimulation der Phagozytose durch LPS berichtet wird<sup>332</sup>. So war in einer Studie nach dem Einatmen von LPS die Phagozytose durch Alveolarmakrophagen in der broncho-alveolären Lavageflüssigkeit sogar vermindert<sup>333</sup>. Offenbar spielen also bestimmte Eigenschaften, z. B. die Größe der Partikel eine Rolle bezüglich der LPS-medierten zellulären Aufnahme dieser Partikel.

Als weiterer Entzündungsmediator wurde CRP zur Stimulation der PFC-Aufnahme *in vitro* eingesetzt, da es bekanntermaßen eine die Phagozytose steigernde Aktivität besitzt<sup>212,334,335</sup>. CRP ist ein Akute Phase Protein<sup>336</sup>, das vor allem von Kupferzellen<sup>337</sup> der Leber produziert wird<sup>338</sup>. In gewissem Maße wird es zudem von Makrophagen<sup>339</sup> und Untergruppen von Lymphozyten<sup>340,341</sup> sezerniert. Die Produktion von CRP wird als Teil der angeborenen Immunantwort auf Infektion und Gewebeverletzung<sup>342,343</sup> innerhalb kurzer Zeit (24 – 48 h) hochreguliert<sup>344,345</sup>; nach Wegfall des Stimulus sinken die CRP-Werte aber auch schnell wieder. Hierdurch ist es ein sensitiver<sup>359</sup> und spezifischer<sup>360</sup> Marker für Entzündungsprozesse. Die Steigerung der Phagozytose durch CRP erfolgt durch dessen Bindung an Phosphocholin, welches unter anderem an der Oberfläche geschädigter oder toter Säugerzellen exponiert wird<sup>212,213</sup>. An Phosphocholin gebundenes CRP aktiviert zum einen den klassischen Signalweg des Komplementsystems, was zu einer Steigerung der Phagozytose der das CRP bindenden Strukturen führt<sup>378</sup>. Ebenso vermittelt CRP die Phagozytose<sup>382,383</sup> über die Bindung an Fc-Rezeptoren<sup>353,354</sup>. Letzterer Weg spielt bei der Stimulation der Phagozytose jedoch nur eine untergeordnete Rolle: So zeigte sich in einer Studie von Gershov et al.<sup>334</sup>, dass CRP in der Abwesenheit von Serum die Phagozytose nicht steigern kann. In der vorliegenden Studie wurde bei der Stimulation sowohl von kultivierten Makrophagen als auch von primären Immunzellen mit CRP eine leichte Steigerung der Partikelaufnahme nach einer Stimulationsdauer von 24 h beobachtet.

Die nur geringe (CRP) oder sogar fehlende (LPS) Steigerung der zellulären PFC-Aufnahme nach *in vitro* Stimulation durch Entzündungsmediatoren legt nahe, dass offenbar komplexe Mechanismen für die vermehrte Aufnahme von PFCs durch Immunzellen, welche aus Tieren mit Entzündungsherd gewonnen wurden verantwortlich sind. Die Beobachtung, dass im Matrigel/LPS-Modell das LPS ausschließlich im Entzündungsherd, nicht jedoch im peripheren Blut nachzuweisen ist<sup>170</sup>, deutet ebenso auf indirekte

Mechanismen, wie durch eine Steigerung der Zytokinproduktion<sup>355–358</sup> medierte, statt auf eine direkte Stimulation durch LPS hin. Die geringe Stimulation der zellulären PFC-Aufnahme durch CRP legt nahe, dass dieses einer der Faktoren sein könnte, die an der erhöhten Partikelaufnahme durch entzündlich stimulierte Zellen beteiligt sind. Die mögliche Bedeutung des CRP wird dabei unterstrichen durch die hohen Level dieses Akute Phase Proteins im Blut unter entzündlichen Bedingungen.

Der Übertritt von Nanopartikeln über ein permeables Endothel in das Interstitium und ihre Anreicherung im Gewebe aufgrund reduzierten Lymphabflusses wird als EPR-Effekt („enhanced permeability and retention“) bezeichnet. Der EPR-Effekt findet sich zum einen in Tumorgewebe, jedoch auch in entzündlichen Regionen<sup>272</sup>. Die Hypothese, die aufgrund der in dieser Studie beobachteten starken PFC-Aufnahme durch direkt aus den Entzündungsherden gewonnene Immunzellen aufgestellt wurde, war, dass PFCs nicht nur in der Peripherie von phagozytotischen Zellen aufgenommen werden, um mit diesen in den Entzündungsherd zu gelangen. Vielmehr könnte ein Teil der injizierten Nanopartikel frei im Blutstrom zu den entzündlichen Regionen transportiert werden, das entzündliche, durch die Sezernierung proinflammatorischer Zytokine (TNF, IL-1, -6, VEGF) fenestrierte und somit vermehrt permeable Gefäßendothel passieren<sup>232</sup> und erst lokal von stimulierten residenten Immunzellen aufgenommen werden<sup>7</sup> (**Abbildung 4.2**).



**Abbildung 4.2: Ursprung des <sup>19</sup>F-Signals im Entzündungsherd auf zellulärer Ebene.** Schematische Darstellung der Wege, auf denen es zu einer Beladung von Immunzellen mit PFCs kommen könnte. **A.**: Die PFCs könnten nach i. v. Injektion (1.) vorrangig in der Peripherie von phagozytotischen Zellen aufgenommen werden (2.) und mit diesen in den Entzündungsherd gelangen

(3.). **B.**: EPR-Effekt: Die PFCs könnten zudem frei im Blut zum Entzündungsherd gelangen (4.), durch das entzündliche, vermehrt permeable Endothel in den Entzündungsherd eintreten (5.) und erst lokal von phagozytotischen Zellen aufgenommen werden (6.).

### 4.2.2 Lokale Entzündungsreaktionen bewirken nur geringe Veränderungen des <sup>19</sup>F-Signals in peripheren Organen

Es ist bereits aus zahlreichen Studien bekannt, dass sich nach der i. v. Injektion von PFCs über ein <sup>19</sup>F-Signal die Ansammlung von phagozytotischen Zellen in Entzündungsherden nachweisen lässt<sup>110</sup>. Bisher ist jedoch noch nicht untersucht worden, ob eine lokale Entzündungsreaktion Effekte auf das <sup>19</sup>F-Signal in peripheren Organen, wie Milz, Leber, Knochenmark und Lymphknoten besitzt. Es findet sich lediglich eine einzige Studie, in der die Anreicherung von Polystyrol-Nanopartikeln bei systemischer Entzündung in verschiedenen Organen untersucht wurde. Hierbei wurde eine vermehrte Anreicherung der Nanopartikel in der Milz und eine reduzierte Anreicherung in der Leber beobachtet<sup>311</sup>. Die Akkumulation in der Milz erklärt sich zum einen durch die entzündlich bedingte erhöhte vaskuläre Permeabilität, die in der genannten Studie ausschließlich in der Milz beobachtet wurde<sup>311</sup>. Das starke Herausfiltern der Nanopartikel durch die Milz wird wiederum für die reduzierte Partikelakkumulation in der Leber verantwortlich gemacht. Um systemische Effekte von lokalen Entzündungsreaktionen zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Studie zwei verschiedene Entzündungsmodelle gewählt: Der Myokardinfarkt (MI) als Modell für eine sterile Entzündung, sowie das Matrigel/LPS-Modell als Beispiel für eine nicht-sterile Entzündung. Bei der Messung des <sup>19</sup>F-Signals in Blut, Leber, Milz, Knochenmark und Lymphknoten in den beiden Entzündungsmodellen zeigte sich eine geringe Reduktion der Signalintensität in Blut und Milz zu frühen Messzeitpunkten im MI-Modell und eine erhöhte Signalintensität in Milz (nicht signifikant) und Leber nach der Implantation von Matrigel/LPS. In beiden Modellen fand sich eine nicht-signifikante Reduktion des <sup>19</sup>F-Signals in den Lymphknoten unter entzündlichen Bedingungen.

Für diese Veränderungen kommen verschiedene Erklärungen in Betracht. Zum einen könnte es zu einer entzündlich bedingten Aktivierung der Immunzellen mit verstärkter PFC-Aufnahme durch die Leukozyten auch in den untersuchten peripheren Organen kommen<sup>311</sup>. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist das Auftreten eines „enhanced permeability and retention effect“ (EPR)<sup>272</sup>, d. h. einer erhöhten vaskulären Permeabilität<sup>311,359</sup> zusammen mit einer reduzierten Perfusion der Peripherie, was eine Akkumulation der Nanopartikel in den Geweben bewirkt<sup>272</sup>. Die dritte mögliche Erklärung für Veränderungen im <sup>19</sup>F-Signal in der Peripherie sind entzündlich bedingte rein quantitative Veränderungen der Zahl der Immunzellen in den untersuchten Organen - insbesondere der Makrophagen, Monozyten und Neutrophilen als den Immunzellen, die hauptsächlich für die Aufnahme der PFCs verantwortlich sind. Solche quantitativen Veränderungen der Zellpopulationen entstehen z. B. durch die entzündlich bedingte Leerung von Leukozytenreservepools aufgrund erhöhten Bedarfes im Entzündungsherd, oder durch Zytokin-mediierter Leukozytenretention.

Im Anschluss an MI ist das Auftreten einer Monozytose beschrieben<sup>39,360,361</sup>, was im Widerspruch zum beobachteten reduzierten <sup>19</sup>F-Signal im Blut nach MI ist. Eine mögliche Erklärung für das reduzierte Signal könnte der massive Bedarf an Immunzellen im Herzen aufgrund des innerhalb von Stunden nach MI auftretenden vollständigen Absterbens der residenten Gewebemakrophagen im Herzen<sup>35,362</sup> sein. Die lokalen Makrophagen werden in der Folge bereits unmittelbar nach MI für eine Dauer von mehreren Tagen durch täglich tausende myeloischer Zellen aus dem Blutpool ersetzt, die ins Herz rekrutiert werden<sup>362,363</sup>. Dies sind zum einen Neutrophile als erste, bereits sehr früh nach MI ins Herz einwandernde Zellpopulation, zudem in der Folge einwandernde Monozyten und Lymphozyten<sup>35,36,361,363</sup>. Die Zahl der Makrophagen im Herzen erholt sich erst nach vier Tagen, und erst zwei Wochen nach MI wird die lokale Makrophagenpopulation im Herzen, welche sich im Zustand der Homöostase selbst erneuert<sup>35-37</sup> wieder unabhängig von der Rekrutierung von Blutmonozyten<sup>35,36,362,364</sup>. Diese massive Rekrutierung von Immunzellen aus dem Blut ins ischämische Herzgewebe könnte in einer reduzierten Menge an Immunzellen im Blut resultieren, was ein reduziertes <sup>19</sup>F-Signal im Blut im Entzündungszustand erklären würde.

In der Milz wurde im Matrigel/LPS-Modell unter entzündlichen Bedingungen ein tendenziell stärkeres <sup>19</sup>F-Signal beobachtet als unter Kontrollbedingungen. Dies stimmt mit der von Chen et al. bei *Septikämie* beobachteten vermehrten Akkumulation von Nanopartikeln in der Milz überein, welche auf die erhöhte Permeabilität der vaskulären Endothelien in diesem Organ zurückgeführt wurde<sup>311,359</sup>. Zudem ist bekannt, dass es bei *Septikämie* zu einer Einwanderung von Neutrophilen in die Milz kommt<sup>39,365</sup>. In der gesunden Milz machen Neutrophile lediglich 1-2 % der Zellen aus<sup>366</sup>. Die Akkumulation von Neutrophilen in der Milz bei *Septikämie* ist jedoch so massiv, dass sie in einer *Splenomegalie* resultiert<sup>367,368</sup>. Eine *Splenomegalie* wird auch in der vorliegenden Studie beobachtet, in der sich, wenn auch lediglich lokal, LPS im Körper findet. Um eine Einwanderung von Neutrophilen als Ursache der *Splenomegalie* nachzuweisen, müsste eine histologische Aufarbeitung der anfallenden Milzen erfolgen. Im MI-Modell wurde in der vorliegenden Studie hingegen im entzündlichen Zustand eine Reduktion des <sup>19</sup>F-Signals in der Milz beobachtet. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Milz bei MI eine wichtige *extramedulläre* Quelle in das Herz einwandernder zirkulierender Monozyten ist<sup>361,362,364,369</sup>. Die Milz scheint ca. die Hälfte der myeloischen Zellen (40-70 % der Monozyten), welche innerhalb des ersten Tages in das ischämische Myokard einwandern, beizusteuern<sup>370,371</sup>. In gesundem Zustand machen die Monozyten 3,5-5 % der Zellen der Milz aus<sup>366</sup>. Die Rekrutierung von Monozyten aus der Milz ins Herz bei MI geht mit einer deutlichen Reduktion<sup>39</sup> der Zahl der Monozyten in der Milz um bis zu 58 % einher<sup>372,373</sup>. Zudem ist eine Reduktion der Größe der Milz bei MI beschrieben<sup>39,361</sup>, wie sie auch in der vorliegenden Studie gefunden wurde. Ob eine Reduktion der Zahl der Monozyten in der Milz in der

vorliegenden Studie die Ursache für die geringere Größe der Milz bei MI ist, müsste anhand histologischer Gewebeaufarbeitung untersucht werden. Erst innerhalb von einer Woche nach MI<sup>362</sup> wird durch *extramedulläre Hämatopoese*<sup>362</sup> die ursprüngliche Zellzahl in der Milz wieder erreicht<sup>362</sup>.

In der Gegenwart von LPS wurde in der Leber in der vorliegenden Studie eine stärkere <sup>19</sup>F-Signalintensität beobachtet, verglichen mit den Kontrolltieren. In der Studie von Chen et al.<sup>311</sup> wurde hingegen keine vermehrte Akkumulation von Nanopartikeln in der Leber unter entzündlichen Bedingungen beobachtet, ebenso wenig wie eine erhöhte Gefäßpermeabilität in diesem Organ gefunden wurde. Als Erklärung für das stärkere <sup>19</sup>F-Signal in der Leber unter entzündlichen Bedingungen käme z. B. eine vermehrte Aufnahme von PFCs durch lokale entzündlich stimulierte Kupfferzellen – diese umfassen 2,1 % der Leberzellen<sup>374</sup> und phagozytieren bekanntermaßen den größten Teil der PFCs in der Leber<sup>171</sup> – oder durch Leukozyten in Frage. Letztere – sowohl Neutrophile als auch Monozyten – sind nur unter entzündlichen Bedingungen in nennenswerter Menge im Lebergewebe vorhanden<sup>375</sup>. Weitere mögliche Erklärungen für das stärkere <sup>19</sup>F-Signal in der Leber unter entzündlichen Bedingungen finden sich, wenn andere Entzündungsmodelle als eine LPS-induzierte Entzündung betrachtet werden. So sind für den Fall myokardialer ischämischer Verletzung verschiedene Effekte auf die Leber bekannt<sup>376,377</sup>. Unter anderem wird durch erhöhte periphere Level an IL-6, welches im ischämischen Myokard vermehrt produziert wird, eine Leukozytenretention in der Leber befördert<sup>377</sup>. Es könnte daher spekuliert werden, dass erhöhte Zytokinlevel auch im Matrigel/LPS-Modell<sup>355–358</sup> eine vermehrte Retention von Leukozyten in der Leber bedingen und dadurch für die beobachtete <sup>19</sup>F-Signalverstärkung in diesem Organ verantwortlich sind.

In den Lymphknoten fand sich in der vorliegenden Studie eine tendenzielle Reduktion des <sup>19</sup>F-Signals unter entzündlichen Bedingungen, sowohl im Matrigel/LPS- als auch im MI-Modell. Lymphknoten bestehen vor allem aus B- und T-Lymphozyten<sup>378,379</sup>, in den Marksinus finden sich zudem Makrophagen<sup>380,381</sup>. Die Makrophagen – also die Zellen, die vermutlich die meisten PFCs aufnehmen – dissoziieren unter entzündlichen Bedingungen aus noch unbekanntem Gründen aus den Lymphknoten<sup>381</sup>, was das schwächere <sup>19</sup>F-Signal im entzündlichen Zustand in beiden Entzündungsmodellen erklären könnte. Um dies zu beweisen, müssten jedoch histologische Untersuchungen durchgeführt werden.



## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Die frühe Detektion und verlässliche Beurteilung von lokalen Entzündungsprozessen mit nicht-invasiven Bildgebungstechniken ist von großer Bedeutung für präklinische Studien ebenso wie für die klinische Anwendung. Zu diesem Zweck wurden unter anderem verschiedene MRT-Techniken entwickelt, welche es ermöglichen, indirekt oder direkt Entzündungsprozesse in lebenden Organismen darzustellen. Eine der direkten Methoden ist die  $^{19}\text{F}$ -MRT.  $^{19}\text{F}$  ist das einzige stabile Isotop des Fluors, welches eine natürliche Häufigkeit von 100 % besitzt, im Körper jedoch nur in Spuren vorhanden ist. Daher kann  $^{19}\text{F}$  als „tracer“ Agens eingesetzt werden, wofür üblicherweise Perfluorkarbon-Nanoemulsionen (PFCs) verwendet werden. Perfluorkarbone sind synthetische Komponenten aus mit Fluor gesättigten Kohlenstoff-basierten Molekülen<sup>122,123</sup>. PFCs setzen sich aus einem in eine Einzelschicht aus Lipiden eingekapselten Perfluorkarbon zusammen. Hierdurch stellen sie eine biokompatible Formulierung der Perfluorkarbone dar, die in reiner Form stark hydrophob und lipophob sind und daher unmischbar mit Körperflüssigkeiten. Nach ihrer *intravenösen* Verabreichung in den Körper werden PFCs von phagozytischen Immunzellen im peripheren Blut aufgenommen, welche später unter anderem in entzündlichen „hot spots“ akkumulieren, in denen sie mit hoher Sensitivität und Spezifität ohne natürlichen Hintergrund mit  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT dargestellt werden können. Alternativ zur Emulgierung mit Lipiden (PFCs) können Perfluorkarbone auch in PLGA-Nanopartikel (PLGA = „poly(lactic-co-glycolic acid)“) eingekapselt werden. Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit war es, neue Erkenntnisse über die Faktoren zu erlangen, welche das biologische Verhalten der PFCs beeinflussen. Zu diesem Zweck wurde die Bedeutung der Formulierung von Perfluorkarbonen ebenso wie der Einfluss von Entzündungsprozessen auf die zelluläre Aufnahme und Gewebeverteilung von PFCs untersucht.

Sowohl für klinische Anwendungen als auch für präklinische Studien wird ein  $^{19}\text{F}$ - „tracer“ benötigt, der eine hohe Sensitivität besitzt, nicht toxisch ist und in einer akzeptablen Zeit aus dem Körper ausgeschieden wird. Ein „tracer“ mit hoher Sensitivität ist der Perfluor-15-kronen-5-ether (PFCE), da er 20  $^{19}\text{F}$ -Isotope in identischer chemischer Umgebung besitzt. Jedoch hat dieser eine biologische Halbwertszeit von mehr als 250 Tagen<sup>192</sup>. Bisher wurden keine Untersuchungen zur Bedeutung verschiedener Formulierungen von Perfluorkarbonen auf die Akkumulation in und Ausscheidung aus Körpergeweben sowie zur zellulären Aufnahme von Perfluorkarbonen durchgeführt. Daher wurden in dieser Arbeit systematisch die physikochemischen Eigenschaften, die zelluläre Aufnahme sowie die Gewebeverteilung von PFCs und PLGA-Nanopartikeln analysiert. Die Analyse wurde mit PFCs mit einem Durchmesser von 83 bzw. 299 nm und „multicore“ (226 nm) sowie „core shell“ (165 nm) PLGA Nanopartikeln (PLGA-NPs und -NCs) durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die PLGA-NPs und PLGA-NCs eine stärkere zelluläre Aufnahme besitzen verglichen mit PFCs identischer Größe, möglicherweise aufgrund von Unterschieden in der Hülle der Partikel (Zuckerstrukturen). Die Akkumulationskinetiken in Leber und Milz

waren von der Größe der Nanopartikel abhängig, nicht jedoch von der Art der Verkapselung. PLGA-NPs zeigten jedoch eine außergewöhnlich schnelle Entfernung aus der Leber, im Gegensatz zu der sehr langen Gewebelbhalbwertszeit der PFCs. Experimente, die in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Professorin M. Srinivas (RadboudUMC, Nijmegen, Niederlande) durchgeführt wurden zeigten, dass dieses Verhalten in der einzigartigen „multicore“ Struktur der PLGA-NPs begründet ist. Hierdurch konnte demonstriert werden, dass nicht allein das Molekulargewicht, der Dampfdruck und die Lipophilie verantwortlich sind für die Entfernung des jeweiligen Perfluorkarbons aus dem Körper, sondern, dass auch die Formulierung des Perfluorkarbons einen wesentlichen Einfluss hat auf seine Gewebelbhalbwertszeit. Mit den PLGA-NPs wurde erstmalig eine Formulierung des PFCE mit seinen vorteilhaften Bildgebungseigenschaften gefunden, welche wiederholte Injektionen mit dem Ziel einer longitudinalen Darstellung von Entzündungsprozessen erlaubt, wie sie z. B. für klinische Anwendungen erforderlich ist.

Eine Voraussetzung zur korrekten Interpretation der  $^{19}\text{F}$ -Bilder, die während der  $^{19}\text{F}$ -Entzündungsbildung angefertigt werden ist ein tiefgreifendes Wissen über das Verhalten von PFCs unter entzündlichen Bedingungen. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass die Darstellung von Entzündungsprozessen mittels  $^{19}\text{F}$ -MRT möglich ist, bisher ist jedoch noch keine systematische Untersuchung des  $^{19}\text{F}$ -Signals in peripheren Geweben oder der Aufnahme von PFCs durch Immunzellen unter verschiedenen entzündlichen Bedingungen erfolgt. Zu diesem Zweck wurden in der vorliegenden Arbeit ein murines Modell einer sterilen Entzündung (Myokardinfarkt/MI) oder einer nicht-sterilen Entzündung (Matrigel/LPS-Modell) verwendet.

Um mehr über die PFC-Aufnahme unter entzündlichen Bedingungen in Erfahrung zu bringen, wurde die PFC-Aufnahme durch Immunzellen im entzündlichen und nicht-entzündlichen Zustand zwischen den beiden Modellen verglichen. Hierfür wurden Unterschiede zwischen der PFC-Aufnahme durch periphere Blutimmunzellen, welche aus Tieren mit Entzündungsprozess isoliert wurden und der Aufnahme durch lokale Immunzellen, welche aus den Entzündungsherden stammten untersucht. Die Aufnahme von PFCs durch Neutrophile, welche nach MI oder Matrigel/LPS-Implantation aus dem peripheren Blut isoliert wurden war stärker verglichen mit der durch Zellen, welche aus Kontrollen isoliert wurden. Bemerkenswerterweise war die Aufnahme von PFCs durch Monozyten oder Lymphozyten nur geringgradig erhöht oder identisch unter entzündlichen und Kontrollbedingungen. Eine weitere interessante Beobachtung war, dass die Aufnahme von PFCs durch Zellen, welche direkt aus den Entzündungsherden isoliert wurden stärker war verglichen mit der durch periphere Blutimmunzellen, welche aus Tieren mit einem Entzündungsherd isoliert wurden. Dies deutet darauf hin, dass die entzündlichen „hot spots“ die hauptsächliche Stelle und - zumindest in akuten Entzündungsprozessen - Neutrophile

der Hauptzelltyp der PFC-Aufnahme nach i. v. Applikation sind. Um weitere Einblicke in die Mechanismen der gesteigerten PFC-Aufnahme unter entzündlichen Bedingungen zu erhalten, wurde der Einfluss der Entzündungsmediatoren LPS und CRP auf kultivierte und primäre Zellen *in vitro* untersucht. Die Stimulation isolierter Neutrophiler *in vitro* mit LPS oder CRP steigerte nicht oder nur in geringem Maße die PFC-Aufnahme, was darauf hindeutet, dass die starke Aufnahme von PFCs durch Immunzellen, welche unter entzündlichen Bedingungen beobachtet werden kann von einer komplexen entzündlichen Umgebung abhängig ist.

Das  $^{19}\text{F}$ -Signal in Blut und verschiedenen peripheren Organen, von denen eine PFC-Anreicherung bekannt ist (Leber, Milz, Knochenmark, Lymphknoten)<sup>110</sup> wurde nach der Auslösung einer Entzündung mit  $^{19}\text{F}$ -MRT untersucht. Verglichen mit Kontrollen war das  $^{19}\text{F}$ -Signal in Blut und Organen unter entzündlichen Bedingungen fast unverändert. Ein geringgradig schwächeres  $^{19}\text{F}$ -Signal wurde in Blut und Milz früh nach MI detektiert, ein stärkeres  $^{19}\text{F}$ -Signal in Milz (nicht signifikant) und Leber im Matri-gel/LPS-Modell, während das Signal in den Lymphknoten unter entzündlichen Bedingungen in beiden Modellen tendenziell schwächer war. Eine Entzündung scheint somit nur eine geringe Bedeutung für die Gewebeverteilung von PFCs zu besitzen.

Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass, mit dem Finden eines  $^{19}\text{F}$ - „tracers“ mit hoher Sensitivität und akzeptabler biologischer Halbwertszeit die breite Anwendung in präklinischen Studien und sogar eine Translation dieser Bildgebungstechnik in die Klinik in der nahen Zukunft realistisch erscheinen. Zudem zeigte sich, dass, auch wenn aufgrund der Komplexität der zugrundeliegenden Prozesse immer noch einiges an Forschung im Feld der Entzündungsbildgebung mit  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT erforderlich ist, ein gewisses basales Wissen über die Mechanismen existiert, die für die Signal-generierung auf zellulärer Ebene verantwortlich sind.

## 6 Summary and outlook

Early detection and reliable assessment of local inflammatory processes with non-invasive imaging techniques are of increasing importance for preclinical studies as well as for a clinical setting. For this purpose, e. g. several MRI techniques have been developed, which allow to indirectly or directly visualize inflammatory processes in the living organism. One of the direct methods is based on  $^{19}\text{F}$  MRI.  $^{19}\text{F}$  is the sole stable isotope of fluorine, which has a natural abundance of 100 % but is found in the body only in amounts of traces. Therefore,  $^{19}\text{F}$  can be used as a tracer agent, wherefore usually perfluorocarbon nanoemulsions (PFCs) are employed. Perfluorocarbons are synthetic components of fluorine-saturated carbon-based molecules<sup>122,123</sup>. PFCs are composed of a perfluorocarbon encapsulated by a single layer of phospholipids and hereby provide a biocompatible formulation of the perfluorocarbons, which in a pure form are highly hydrophobic and lipophobic and, therefore, immiscible with body fluids. After their *intravenous* introduction into the body, PFCs are taken up by phagocytic immune cells in the peripheral blood, which later-on accumulate, amongst others, in inflammatory “hot spots” where they can be visualized with high sensitivity and specificity by  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$  MRI without any natural background. As an alternative to the emulsification with lipids (PFCs), perfluorocarbons can also be encapsulated by PLGA-nanoparticles (PLGA = poly(lactic-co-glycolic acid)). The overall aim of this thesis was to gain novel insights into the factors, which influence the biological behaviour of PFCs. For this purpose, the significance of the formulation of perfluorocarbons as well as the influence of inflammatory processes on the cellular uptake and biodistribution of PFCs was assessed.

Both for clinical applications as well as for preclinical studies, a  $^{19}\text{F}$  tracer is required, which has a high sensitivity, lacks toxicity and is excreted from the body within an acceptable time. A tracer with high sensitivity is the perfluoro-15-crown-5 ether (PFCE) as it contains 20  $^{19}\text{F}$  isotopes in identical chemical environments. However, PFCE has a biological half-life of more than 250 days<sup>192</sup>. Until now, no investigation on the impact of different formulations of perfluorocarbons on accumulation within and excretion from body tissues or on the cellular uptake of perfluorocarbons have been performed. Therefore, in this thesis, the physicochemical properties, the cellular uptake and the biodistribution of PFCs and PLGA-nanoparticles were systematically analysed. The analysis was done using PFCs of a diameter of 83 and 299 nm (sNE/bNE), respectively, and multicore (226 nm) as well as core shell (165 nm) PLGA nanoparticles (PLGA-NPs and -NCs). It could be demonstrated that PLGA-NPs and PLGA-NCs show a stronger cellular uptake compared to PFCs of similar size, probably due to differences in the envelop of the particles (sugar structures). The kinetics of accumulation in the liver and spleen were dependent on the nanoparticle size, but not on the mode of encapsulation. However, PLGA-NPs showed an unusual rapid clearance from the liver, which contrasted with the very long biological half-life of PFCs. Experiments performed in cooperation with the working group of professor M. Srinivas (RadboudUMC,

## Summary and outlook

Nijmegen, Netherlands) demonstrated that this behaviour is attributed to the unique multicore structure of the PLGA-NPs. With this, it could be shown for the first time that not only molecular weight, vapor pressure and lipophilia are responsible for the clearance of the respective perfluorocarbon from the body but that also the formulation of the perfluorocarbon can have a major impact on its biological half-life. With the PLGA-NPs, for the first time, a formulation of the PFCE with its advantageous imaging properties was found, which allows repeated injections with the purpose of longitudinal imaging of an inflammatory process as it is required for e. g. clinical applications.

A prerequisite for a proper interpretation of the images obtained during  $^{19}\text{F}$  inflammation imaging is a thorough knowledge about the behaviour of PFCs under inflammatory conditions. In several previous studies, it was shown that a visualization of inflammatory processes with  $^{19}\text{F}$  MRI is feasible but to date no systematic investigation on the  $^{19}\text{F}$  signal in peripheral tissues or on the uptake of PFCs by immune cells under different inflammatory conditions has been performed. For this purpose, a murine model of sterile inflammation (myocardial infarction/MI) or of non-sterile inflammation (Matrigel/LPS model) was employed.

To find out more about the PFC uptake under inflammatory conditions PFC uptake by immune cells in the inflamed and non-inflamed state was compared for the two models. To this purpose, differences between the PFC uptake by peripheral blood immune cells isolated from animals with inflammatory processes and uptake by local immune cells derived from the inflammatory foci were investigated. Uptake of PFCs by neutrophils isolated from the peripheral blood after MI or Matrigel/LPS implantation was stronger compared to cells isolated from controls. Of note, cellular uptake of PFCs by monocytes or lymphocytes was only marginally increased or identical under inflammatory or control conditions. Interestingly, the uptake of PFCs by cells isolated directly from the inflammatory foci was stronger compared with that by peripheral blood immune cells isolated from animals with inflammatory foci. This hints at the inflammatory “hot spots” as major site of and, at least in an acute inflammatory process the neutrophils as main cell type responsible for PFC uptake after i. v. application. To gain more insights into the mechanisms behind the increased PFC uptake under inflammatory conditions, the impact of inflammation mediators LPS and CRP on cultured and primary cells was assessed *in vitro*. Stimulation of isolated neutrophils *in vitro* with LPS or CRP did not or only slightly increase PFC uptake indicating that the strong uptake of PFCs by immune cells, which can be observed under inflammatory conditions depends on a complex inflammatory environment.

The  $^{19}\text{F}$  signal in the blood and several peripheral organs, of which an accumulation of PFCs is known (liver, spleen, bone marrow, lymph nodes)<sup>110</sup> after the induction of inflammation was assessed with  $^{19}\text{F}$  MRI. Compared to controls, the  $^{19}\text{F}$  signal in blood and organs under inflammatory conditions was largely similar. A slightly weaker  $^{19}\text{F}$  signal was detectable in the blood and spleen early after MI, and

## Summary and outlook

a stronger  $^{19}\text{F}$  signal could be found in the spleen (non-significant) and liver in the Matrigel/LPS model while the signal was slightly weaker in the lymph nodes under inflammatory conditions in both models. Inflammation, thus, seems to have only minor impact on the biodistribution of PFCs.

Taken together, in this thesis, it could be shown that, with the finding of a  $^{19}\text{F}$  tracer with high sensitivity and acceptable biological half-life, also the broad applicability in preclinical studies and even the translation of this imaging technique to the clinics in the near future seem realistic. Besides, it could be shown that, although still a lot of research is required in the field of inflammation imaging with  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$  MRI due to the complex underlying processes, some basic knowledge about the mechanisms behind the signal generation on the cellular level exist.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Rabi, I. I., Zacharias, J. R., Millman, S. & Kusch, P. A New Method of Measuring Nuclear Magnetic Moment. *Phys. Rev.* **53**, 318 (1938).
2. Bloch F, Hansen WW, and P. M. Nuclear Induction. *Phys. Rev.* **738**, 127 (1946).
3. Purcell, E. M., Torrey, H. C. & Pound, R. V. Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid. *Phys. Rev.* **69**, 37–38 (1946).
4. Damadian, R. Tumor Detection by Nuclear Magnetic Resonance. *Science (80- )*. **171**, 1151–1153 (1971).
5. Lauterbur, P. C. Image formations by induced local interactions: examples employing nuclear magnetic resonance. *Nature* **242**, 190–191 (1973).
6. Lauterbur, P. C. Magnetic Resonance Zeugmatography. *Pure Appl. Chem.* **40**, 149–157 (1974).
7. Bouvain, P. Visualisierung spezifischer Zelltypen mittels nicht- invasiver 19 F-MR-Bildgebung. (Heinrich Heine Universität Düsseldorf, 2018).
8. Siebert, J. & Ueltschi, G. 8 Bildgebende Diagnostik in der Chirurgie. in *Lehrbuch der Allgemeinen Chirurgie für Tiermediziner* 108–122 (2004).
9. Chang, A. E. *et al.* Magnetic resonance imaging versus computed tomography in the evaluation of soft tissue tumors of the extremities. *Ann. Surg.* **205**, 340–348 (1987).
10. Weishaupt, D., Köchli, V. D. & Marincek, B. *Wie funktioniert MRI?* (Springer Medizin Verlag., 2013).
11. Bruker BioSpin GmbH. *topspin AVANCE Beginners Guide*. (2008).
12. Ackermann, M. R. 3 Akute Entzündung. in *Pathologie der Haustiere - Allgemeine, spezielle und funktionelle Veterinärpathologie* (eds. McGavin, M. D. & Zachary, J. F.) 95–142 (2009).
13. Ward, P. A. 1 Acute and Chronic Inflammation. in *Fundamentals of Inflammation* (eds. Serhan, C. N., Ward, P. A. & Gilroy, D. W.) 1–16 (Cambridge University Press, 2010).
14. Cassatella, M. A. 4B Neutrophils II. in *Fundamentals of Inflammation* (eds. Serhan, C. N., Ward, P. A. & Gilroy, D. W.) 49–64 (Cambridge University Press, 2010).
15. Nourshargh, S. & Alon, R. Leukocyte Migration into Inflamed Tissues. *Immunity* **41**, 694–707 (2014).
16. Middleton, J., Patterson, A. M., Gardner, L., Schmutz, C. & Ashton, B. A. Leukocyte extravasation: Chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood* **100**, 3853–3860 (2002).
17. Sadik, C. D., Kim, N. D. & Luster, A. D. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol.* **32**, 452–460 (2011).
18. Kolaczowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 159–175 (2013).
19. Faurschou, M. & Borregaard, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* **5**, 1317–1327 (2003).
20. Smith, J. A. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J. Leukoc. Biol.* **56**, 672–686 (1994).
21. Simon, H.-U. Neutrophil apoptosis pathways and their modifications in inflammation. *Immunol. Rev.* **193**, 101–110 (2003).
22. Scher, J. U., Abramson, S. B. & Pillinger, M. H. 4A Neutrophils I. in *Fundamentals of Inflammation* (eds. Serhan, C. N., Ward, P. A. & Gilroy, D. W.) 39–48 (Cambridge University Press, 2010).
23. Wright, H. L., Moots, R. J., Bucknall, R. C. & Edwards, S. W. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology* **49**, 1618–1631 (2010).
24. Mócsai, A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J. Exp. Med.* **210**, 1289–1299 (2013).
25. Dahlgren, C. & Karlsson, A. Respiratory burst in human neutrophils. *J. Immunol. Methods* **232**, 3–14 (1999).
26. Sampson, A. P. The role of eosinophils and neutrophils in inflammation. *Clin. Exp. Allergy* **30 Suppl 1**, 22–7 (2000).
27. Phillipson, M. & Kubes, P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nat. Med.* **17**, 1381–1390 (2011).
28. Savill, J. S. *et al.* Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil

## Literaturverzeichnis

- leads to its recognition by macrophages. *J. Clin. Invest.* **83**, 865–875 (1989).
29. Petrone, W. F., English, D. K., Wong, K. & McCord, J. M. Free radicals and inflammation: Superoxide-dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 1159–1163 (1980).
  30. Brüne, B. *et al.* Redox control of inflammation in macrophages. *Antioxidants Redox Signal.* **19**, 595–637 (2013).
  31. Ackermann, M. R. 4 Chronische Entzündung und Wundheilung. in *Pathologie der Haustiere - Allgemeine, spezielle und funktionelle Veterinärpathologie* (eds. McGavin, M. D. & Zachary, J. F.) 143–180 (2009).
  32. Gomez Perdiguero, E. *et al.* Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* **518**, 547–551 (2015).
  33. Schulz, C. *et al.* A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science (80-. ).* **336**, 86–90 (2012).
  34. Ginhoux, F. & Jung, S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 392–404 (2014).
  35. Heidt, T. *et al.* Differential Contribution of Monocytes to Heart Macrophages in Steady-State and after Myocardial Infarction. *Circ Res* **115**, 284–295 (2014).
  36. Epelman, S. *et al.* Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. *Immunity* **40**, 91–104 (2014).
  37. Molawi, K. *et al.* Progressive replacement of embryo-derived cardiac macrophages with age. *J. Exp. Med.* **211**, 2151–2158 (2014).
  38. Teh, Y. C., Ding, J. L., Ng, L. G. & Chong, S. Z. Capturing the fantastic voyage of monocytes through time and space. *Front. Immunol.* **10**, 1–9 (2019).
  39. Swirski, F. K. *et al.* Identification of Splenic Reservoir Monocytes and Their Deployment to Inflammatory Sites. *Science (80-. ).* **325**, 612–616 (2009).
  40. Fujiwara, N. & Kobayashi, K. Macrophages in inflammation. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy* **4**, 281–286 (2005).
  41. Fox, S. & Rossi, A. G. 8 Macrophages. in *Fundamentals of Inflammation* (eds. Serhan, C. N., Ward, P. A. & Gilroy, D. W.) 96–106 (Cambridge University Press, 2010).
  42. Shi, C. & Pamer, E. G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 762–774 (2011).
  43. Ingersoll, M. A., Platt, A. M., Potteaux, S. & Randolph, G. J. Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation. *Trends Immunol.* **32**, 470–477 (2011).
  44. Wynn, T. A. & Barron, L. Macrophages: Master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin. Liver Dis.* **30**, 245–257 (2010).
  45. Jetten, N. *et al.* Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo. *Angiogenesis* **17**, 109–118 (2014).
  46. Reinherz, E. L. & Schlossman, S. F. The characterization and function of human immunoregulatory T lymphocyte subsets. *Pharmacol. Rev.* **34**, 17–22 (1982).
  47. Trinchieri, G. Biology of Natural Killer Cells. *Adv. Immunol.* **47**, 187–376 (1989).
  48. Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. & Ugolini, S. Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* **9**, 503–510 (2008).
  49. Hoffman, W., Lakkis, F. G. & Chalasani, G. B cells, antibodies, and more. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **11**, 137–154 (2016).
  50. Hussell, T., Cavanagh, M., Wissinger, E. & Findlay, E. G. 9 Lymphocytes. in *Fundamentals of Inflammation* (eds. Serhan, C. N., Ward, P. A. & Gilroy, D. W.) 107–125 (Cambridge University Press, 2010).
  51. Arpin, C. *et al.* Generation of memory B cells and plasma cells in vitro. *Science* **268**, 720–2 (1995).
  52. Slifka, M. K., Antia, R., Whitmire, J. K. & Ahmed, R. Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity* **8**, 363–372 (1998).
  53. Reinherz, E. L. & Schlossman, S. F. Regulation of the Immune Response — Inducer and Suppressor T-Lymphocyte Subsets in Human Beings. *N. Engl. J. Med.* **303**, 370–373 (1980).
  54. Snyder, P. W. 5 Immunsystem. in *Pathologie der Haustiere - Allgemeine, spezielle und funktionelle Veterinärpathologie* (eds. McGavin, M. D. & Zachary, J. F.) 181–230 (Elsevier GmbH., 2009).



## Literaturverzeichnis

55. Pahwa, R., Singh, A. & Jialal, I. Chronic Inflammation. *StatPearls - NCBI Bookshelf* (2019). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493173/>. (Accessed: 15th January 2020)
56. Wylezinski, Gray, Polk, Harmata & Spurlock. Illuminating an Invisible Epidemic: A Systemic Review of the Clinical and Economic Benefits of Early Diagnosis and Treatment in Inflammatory Disease and Related Syndromes. *J. Clin. Med.* **8**, 493 (2019).
57. Stenvinkel, P. *et al.* Impact of inflammation on epigenetic DNA methylation - A novel risk factor for cardiovascular disease? *J. Intern. Med.* **261**, 488–499 (2007).
58. Nicklas, B. J. *et al.* Diet-induced weight loss, exercise, and chronic inflammation in older, obese adults: a randomized controlled clinical trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**, 544–551 (2004).
59. Salminen, A., Hyttinen, J. M. T. & Kaarniranta, K. AMP-activated protein kinase inhibits NF- $\kappa$ B signaling and inflammation: Impact on healthspan and lifespan. *J. Mol. Med.* **89**, 667–676 (2011).
60. Choy, E., Ganeshalingam, K., Semb, A. G., Szekanecz, Z. & Nurmohamed, M. Cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: Recent advances in the understanding of the pivotal role of inflammation, risk predictors and the impact of treatment. *Rheumatol. (United Kingdom)* **53**, 2143–2154 (2014).
61. Sartori, A. C., Vance, D. E., Slater, L. Z. & Crowe, M. The Impact of Inflammation on Cognitive Function in Older Adults: Implications for Health Care Practice and Research. *J. Neurosci Nurs.* **44**, 206–217 (2012).
62. Farzana, F., Renoir, T. & Hannan, A. J. Chapter 5 - The Impact of Inflammation on Brain Function and Behavior in Rodent Models of Affective Disorders. in *Inflammation and Immunity in Depression* 85–102 (Academic Press, 2018). doi:10.1016/B978-0-12-811073-7.00005-2
63. Haroon, E., Raison, C. L. & Miller, A. H. Psychoneuroimmunology meets neuropsychopharmacology: Translational implications of the impact of inflammation on behavior. *Neuropsychopharmacology* **37**, 137–162 (2012).
64. Jiang, N. M., Cowan, M., Moonah, S. N. & Petri, W. A. The Impact of Systemic Inflammation on Neurodevelopment. *Trends Mol. Med.* **24**, 794–804 (2018).
65. Zhao, Y., Ling, F., Wang, H.-C. & Sun, X.-H. Understanding the Impact of Inflammation on Hematopoietic Stem Cells. *Blood* **116**, 2629–2629 (2010).
66. Walsh, D. A. & McWilliams, D. F. Mechanisms, impact and management of pain in rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology* **10**, 581–592 (2014).
67. Burckhardt, C. S. The Impact of Arthritis on Quality of Life. *Nurs. Res.* **34**, 11–18 (1985).
68. Kosinski, M. *et al.* Health-related quality of life in early rheumatoid arthritis: Impact of disease and treatment response. *Am. J. Manag. Care* **8**, 231–240 (2002).
69. Bazzichi, L. *et al.* Quality of life in rheumatoid arthritis: Impact of disability and lifetime depressive spectrum symptomatology. *Clin. Exp. Rheumatol.* **23**, 783–788 (2005).
70. Lönnfors, S. *et al.* IBD and health-related quality of life - Discovering the true impact. *J. Crohn's Colitis* **8**, 1281–1286 (2014).
71. Schneider, M. A. & Fletcher, P. C. 'I feel as if my IBS is keeping me hostage!' Exploring the negative impact of irritable bowel syndrome (IBS) and inflammatory bowel disease (IBD) upon university-aged women. *Int. J. Nurs. Pract.* **14**, 135–148 (2008).
72. Floyd, D. N., Langham, S., Séverac, H. C. & Levesque, B. G. The Economic and Quality-of-Life Burden of Crohn's Disease in Europe and the United States, 2000 to 2013: A Systematic Review. *Dig. Dis. Sci.* **60**, 299–312 (2015).
73. Hall, T. C. *et al.* The socio-economic impact of chronic pancreatitis: A systematic review. *J. Eval. Clin. Pract.* **20**, 203–207 (2014).
74. Willis, D., Moore, A. R., Frederick, R. & Willoughby, D. A. Heme oxygenase: A novel target for the modulation of inflammatory response. *Nat. Med.* **2**, 87–90 (1996).
75. Bernatsky, S. *et al.* Economic impact of juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Care Res.* **57**, 44–48 (2007).
76. Reginster, J.-Y. The prevalence and burden of arthritis. *Rheumatology* **41**, 3–6 (2002).
77. Pugner, K. M., Scott, D. I., Holmes, J. W. & Hieke, K. The costs of rheumatoid arthritis: an international long-term view. *Semin. Arthritis Rheum.* **29**, 305–320 (2000).
78. Mehta, F. Report: Economic implications of inflammatory bowel disease and its management. *Am. J. Manag. Care* **22**, s51–s60 (2016).

## Literaturverzeichnis

79. Wouters, E. F. M. Economic analysis of the Confronting COPD survey: An overview of results. *Respir. Med.* **97**, S3–S14 (2003).
80. Foo, J. *et al.* Continuing to confront COPD international patient survey: Economic impact of COPD in 12 countries. *PLoS One* **11**, 1–15 (2016).
81. van Boven, J. F. M., Vegter, S., van der Molen, T. & Postma, M. J. COPD in the Working Age Population: The Economic Impact on Both Patients and Government. *COPD J. Chronic Obstr. Pulm. Dis.* **10**, 629–639 (2013).
82. Rollin, E., Dhuyvetter, K. C. & Overton, M. W. The cost of clinical mastitis in the first 30 days of lactation: An economic modeling tool. *Prev. Vet. Med.* **122**, 257–264 (2015).
83. Seegers, H., Fourichon, C. & Beaudeau, F. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet. Res.* **34**, 475–491 (2003).
84. Nielsen, C. Economic impact of mastitis in dairy cows. (Department of Animal Breeding and Genetics, Swedish University of Agricultural Sciences, 2009).
85. Schepers, J. A. & Dijkhuizen, A. A. The economics of mastitis and mastitis control in dairy cattle: a critical analysis of estimates published since 1970. *Prev. Vet. Med.* **10**, 213–224 (1991).
86. Hogeveen, H., Huijps, K. & Lam, T. Economic aspects of mastitis: New developments. *N. Z. Vet. J.* **59**, 16–23 (2011).
87. Gifford, C. A. *et al.* Impacts of inflammation on cattle growth and carcass merit. *J. Anim. Sci.* **90**, 1438–1451 (2012).
88. Temme, S., Bönner, F., Schrader, J. & Flögel, U. 19F magnetic resonance imaging of endogenous macrophages in inflammation. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* **4**, 329–343 (2012).
89. Ahrens, E. T., Young, W.-B., Xu, H. & Pusateri, L. K. Rapid quantification of inflammation in tissue samples using perfluorocarbon emulsion and fluorine-19 nuclear magnetic resonance. *Biotechniques* **50**, 229–234 (2011).
90. Temme, S. Darstellung von Entzündungsprozessen mittels nichtinvasiver 19F-Magnetresonanztomographie. (2019).
91. Fraser, D. D. *et al.* Magnetic resonance imaging in the idiopathic inflammatory myopathies. *J. Rheumatol.* **18**, 1693–700 (1991).
92. Brück, W. *et al.* Inflammatory central nervous system demyelination: Correlation of magnetic resonance imaging findings with lesion pathology. *Ann. Neurol.* **42**, 783–793 (1997).
93. Shoenuit, J. P. *et al.* Comparison of magnetic resonance imaging and endoscopy in distinguishing the type and severity of inflammatory bowel disease. *J. Clin. Gastroenterol.* **19**, 31–5 (1994).
94. Ahlström, H., Feltelius, N., Nyman, R. & Hällgren, R. Magnetic resonance imaging of sacroiliac joint inflammation. *Arthritis Rheum.* **33**, 1763–1769 (1990).
95. Carr, D. H. *et al.* Gadolinium-DTPA as a Contrast Agent in MRI. *Am. J. Roentgenol.* **143**, 215–224 (1984).
96. Ahrens, E. T. & Bulte, J. W. Tracking immune cells in vivo using magnetic resonance imaging. *Nat Rev Immunol* **13**, 755–763 (2013).
97. Balducci, A., Helfer, B. M., Ahrens, E. T., O’Hanlon, C. F. & Wesa, A. K. Visualizing arthritic inflammation and therapeutic response by fluorine-19 magnetic resonance imaging (19F MRI). *J. Inflamm. (Lond)*. **9**, 1–10 (2012).
98. Weinmann, H. J. Contrast-Enhanced Imaging : Animal NMR Using. *Ajr* **142**, 625–630 (1984).
99. Marckmann, P. *et al.* Nephrogenic systemic fibrosis: Suspected causative role of gadodiamide used for contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**, 2359–2362 (2006).
100. Thomsen, H. S. *et al.* Nephrogenic systemic fibrosis and gadolinium-based contrast media: updated ESUR Contrast Medium Safety Committee guidelines. *Eur. Radiol.* **23**, 307–318 (2013).
101. Perazella, M. A. Current Status of Gadolinium Toxicity in Patients with Kidney Disease. *Clin J Am Soc Nephrol* **4**, 461–469 (2009).
102. Gulani, V., Calamante, F., Shellock, F. G., Kanal, E. & Reeder, S. B. Gadolinium deposition in the brain: summary of evidence and recommendations. *Lancet Neurol.* **16**, 564–570 (2017).
103. Guo, B. J., Yang, Z. L. & Zhang, L. J. Gadolinium Deposition in Brain: Current Scientific Evidence and Future Perspectives. *Front. Mol. Neurosci.* **11**, 1–12 (2018).
104. Choi, J. W. & Moon, W.-J. Gadolinium Deposition in the Brain: Current Updates. *Korean J. Radiol.* **20**, 134–147 (2019).
105. Beckmann, N. *et al.* In vivo visualization of macrophage infiltration and activity in inflammation using magnetic resonance imaging. **1**, 272–298 (2009).

## Literaturverzeichnis

106. Simon, G. H. *et al.* Ultrasmall superparamagnetic 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).
107. Schmitz, S. A. *et al.* Magnetic resonance imaging of atherosclerotic plaques using superparamagnetic iron oxide particles. *J. Magn. Reson. Imaging* **14**, 355–361 (2001).
108. Neuwelt, A. *et al.* Iron-based superparamagnetic nanoparticle contrast agents for MRI of infection and inflammation. *Am. J. Roentgenol.* **204**, W302–W313 (2015).
109. Yilmaz, A. *et al.* Magnetic resonance imaging (MRI) of inflamed myocardium using iron oxide nanoparticles in patients with acute myocardial infarction — Preliminary results. *Int. J. Cardiol.* **163**, 175–182 (2013).
110. Flögel, U. *et al.* In vivo monitoring of inflammation after cardiac and cerebral ischemia by fluorine magnetic resonance imaging. *Circulation* **118**, 140–148 (2008).
111. Liu, W. & Frank, J. A. Detection and Quantification of Magnetically Labeled Cells by Cellular MRI. *Eur J Radiol* **70**, 258–264 (2009).
112. Holland, G. ., Bottomley, P. . & Hinshaw, W. . 19F magnetic resonance imaging. *J. Magn. Reson.* **28**, 133–136 (1977).
113. Heidelberger, E. & Lauterbur, P. C. Gas phase 19F NMR zeugmatography: a new approach to lung ventilation imaging. in *First Annual Meeting of the Society of Magnetic Resonance in Medicine* (1982).
114. Hahn, T. *et al.* Visualization and quantification of intestinal transit and motor function by real-time tracking of 19F labeled capsules in humans. *Magn. Reson. Med.* **66**, 812–820 (2011).
115. Srinivas, M., Heerschap, A., Ahrens, E. T., Figdor, C. G. & de Vries, I. J. M. 19F MRI for quantitative in vivo cell tracking. *Trends Biotechnol.* **28**, 363–370 (2010).
116. Wahsner, J., Gale, E. M., Rodríguez-Rodríguez, A. & Caravan, P. Chemistry of MRI contrast agents: Current challenges and new frontiers. *Chem. Rev.* **119**, 957–1057 (2019).
117. Kaneda, M. M., Caruthers, S., Lanza, G. M. & Samuel, A. Perfluorocarbon Nanoemulsions for Quantitative Molecular Imaging and Targeted Therapeutics. *Ann Biomed Eng.* **37**, 1922–1933 (2009).
118. Ahrens, E. T. & Zhong, J. In vivo MRI cell tracking using perfluorocarbon probes and fluorine-19 detection. *NMR Biomed.* **26**, 860–71 (2013).
119. Kadayakkara, D. K., Ranganathan, S., Young, W.-B. & Ahrens, E. T. Assaying macrophage activity in a murine model of inflammatory bowel disease using fluorine-19 MRI. *Lab. Invest.* **92**, 636–45 (2012).
120. Ebner, B. *et al.* Early Assessment of Pulmonary Inflammation By 19F MRI In Vivo. *Circ Cardiovasc Imaging* **3**, 202–210 (2010).
121. Hull, W. E. & Flögel, U. Kernspinresonanz am Institut für Molekulare Kardiologie. Available at: <https://www.nmr.uni-duesseldorf.de/sets/fluor.html>. (Accessed: 27th February 2020)
122. Flaim, S. F. Pharmacokinetics and side effects of perfluorocarbon-based blood substitutes. *Artif. Cells. Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* **22**, 1043–54 (1994).
123. Swider, E. *et al.* Design of triphasic poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles containing a perfluorocarbon phase for biomedical applications. *RSC Adv.* **8**, 6460–6470 (2018).
124. Mayenfels, F. G. *Fluorcarbonhaltige Nanoemulsionen zur Anwendung in der 1 H/ 19 F-Magnetresonanztomographie.* (2012).
125. Krafft, M. P. Fluorocarbons and fluorinated amphiphiles in drug delivery and biomedical research. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **47**, 209–228 (2001).
126. Díaz-López, R., Tsapis, N. & Fattal, E. Liquid perfluorocarbons as contrast agents for ultrasonography and 19F-MRI. *Pharm. Res.* **27**, 1–16 (2010).
127. Grapentin, C., Barnert, S. & Schubert, R. Monitoring the Stability of Perfluorocarbon Nanoemulsions by Cryo-TEM Image Analysis and Dynamic Light Scattering. *PLoS One* **10**, 1–12 (2015).
128. Grapentin, C. *et al.* Optimization of perfluorocarbon nanoemulsions for molecular imaging by 19F MRI. *Nanomedicine* 268–286 (2014).
129. Ruiz-Cabello, J., Barnett, B. P., Bottomley, P. A. & Bulte, J. W. M. Fluorine (19F) MRS and MRI in biomedicine. *NMR Biomed.* **24**, 114–129 (2011).
130. Srinivas, M. *et al.* PLGA-encapsulated perfluorocarbon nanoparticles for simultaneous visualization of distinct cell populations by 19F MRI. *Nanomedicine* **10**, 2339–2348 (2015).

## Literaturverzeichnis

131. Riess, J. G. Oxygen Carriers ("Blood Substitutes") Raison d'Être, Chemistry, and Some Physiology Blut ist ein ganz besonderer Saft 1. *Chem. Rev.* **101**, 2797–2920 (2001).
132. Hammerschmidt, D. E., Vercellotti, G. M. & Gregory Vercellotti, F. M. Limitation of Complement Activation by Perfluorocarbon Emulsions: Superiority of Lecithin-Emulsified Preparations. *Biomater. Artif. Cells Artif. Organs* **16**, 431–438 (1988).
133. Clark, L. C. & Gollan, F. Survival of Mammals Breathing Organic Liquids Equilibrated with Oxygen at Atmospheric Pressure. *Science (80-. )*. **152**, 1755–1756 (1966).
134. Ke, H. *et al.* Gold Nanoshelled Liquid Perfluorocarbon Nanocapsules for Combined Dual Modal Ultrasound/CT Imaging and Photothermal Therapy of Cancer. *small* **10**, 1220–1227 (2014).
135. Long, D. M. *et al.* Efficacy and Toxicity Studies with Radiopaque Perfluorocarbon. *Radiology* **105**, 323–332 (1972).
136. Schwarz, R., Schuurmans, M., Seelig, J. & Künnecke, B. 19F-MRI of perfluorononane as a novel contrast modality for gastrointestinal imaging. *Magn. Reson. Med.* **41**, 80–86 (1999).
137. Barnett, B. P. *et al.* Use of perfluorocarbon nanoparticles for non-invasive multimodal cell tracking of human pancreatic islets. *Contrast Media Mol. Imaging* **6**, 251–259 (2011).
138. Rapoport, N., Gao, Z. & Kennedy, A. Multifunctional Nanoparticles for Combining Ultrasonic Tumor Imaging and Targeted Chemotherapy. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **99**, 1095–1106 (2007).
139. Wretling, A. Development of Fat Emulsions. *J. Parenter. Enter. Nutr.* **5**, 230–235 (1981).
140. *Nanotechnology in Drug Delivery.* (Springer, 2009).
141. Schmidt, P. C. & Lang, S. *Pharmazeutische Hilfsstoffe : Eigenschaften, Anwendung und Handelsprodukte.* (Govi-Verlag, 2015).
142. Utrecht, F. E. G., Zetten, R. O. J. J., Assen, K. F. G. & Den Bosh, A. B. Biopolymer nanoparticles. *US 6677686*, 6 (2004).
143. Crucho, C. I. C. & Barros, M. T. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. *Mater. Sci. Eng. C* **80**, 771–784 (2017).
144. Gentile, P., Chiono, V., Carmagnola, I. & Hatton, P. V. An overview of poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 3640–3659 (2014).
145. Swider, E. *et al.* Customizing poly(lactic-co-glycolic acid) particles for biomedical applications. *Acta Biomater.* **73**, 38–51 (2018).
146. Erbetta, C. D. C. *et al.* Synthesis and Characterization of Poly(D,L-Lactide-co-Glycolide) Copolymer. *J. Biomater. Nanobiotechnol.* **3**, 208–225 (2012).
147. Olsen, D. *et al.* Recombinant collagen and gelatin for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **55**, 1547–1567 (2003).
148. Conn, J., Oyasu, R., Welsh, M. & Beal, J. M. Vicryl (polyglactin 910) synthetic absorbable sutures. *Am. J. Surg.* **128**, 19–23 (1974).
149. Bala, I., Hariharan, S. & Kumar, M. R. PLGA Nanoparticles in Drug Delivery: The State of the Art; *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **21**, 387–422 (2004).
150. Danhier, F. *et al.* PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *J. Control. Release* **161**, 505–522 (2012).
151. Figdor, C. G. *et al.* Customizable, multi-functional fluorocarbon nanoparticles for quantitative in vivo imaging using 19F MRI and optical imaging. *Biomaterials* **31**, 7070–7077 (2010).
152. Diou, O. *et al.* Long-circulating perfluorooctyl bromide nanocapsules for tumor imaging by 19FMRI. *Biomaterials* **33**, 5593–5602 (2012).
153. Bonetto, F. *et al.* A large-scale 19F MRI-based cell migration assay to optimize cell therapy. *NMR Biomed.* **25**, 1095–1103 (2012).
154. Pisani, E. *et al.* Polymeric Nano/Microcapsules of Liquid Perfluorocarbons for Ultrasonic Imaging: Physical Characterization. *Langmuir* **22**, 4397–4402 (2006).
155. Cosco, D., Fattal, E., Fresta, M. & Tsapis, N. Perfluorocarbon-loaded micro and nanosystems for medical imaging: A state of the art. *J. Fluor. Chem.* **171**, 18–26 (2015).
156. Swider, E. & Srinivas, M. Spinning to a different beat: 19F agents for "hot-spot" cellular MR imaging. in *Design and Applications of Nanoparticles in Biomedical Imaging* (eds. Bulte, J. W. M. & Modo, M. M. J.) 153–170 (Springer, 2016). doi:10.1007/978-3-319-42169-8\_7

## Literaturverzeichnis

157. Wu, W. Parenteral nanoemulsions - composition, preparation and cellular uptake. (2007).
158. Bouvain, P. *et al.* Dissociation of 19F and fluorescence signal upon cellular uptake of dual-contrast perfluorocarbon nanoemulsions. *Magn. Reson. Mater. Physics, Biol. Med.* **32**, 133–145 (2018).
159. Cruz, L. J. *et al.* Targeted nanoparticles for the non-invasive detection of traumatic brain injury by optical imaging and fluorine magnetic resonance imaging. *Nano Res.* **9**, 1276–1289 (2016).
160. O'Hanlon, C. E., Amede, K. G., O'hear, M. R. & Janjic, J. M. NIR-labeled perfluoropolyether nanoemulsions for drug delivery and imaging. *J. Fluor. Chem.* **137**, 27–33 (2012).
161. Balducci, A. *et al.* A novel probe for the non-invasive detection of tumor-associated inflammation. *Oncoimmunology* **2**, e23034 (2013).
162. Patel, S. K., Patrick, M. J., Pollock, J. A. & Janjic, J. M. Two-color fluorescent (near-infrared and visible) triphasic perfluorocarbon nanoemulsions. *J. Biomed. Opt.* **18**, 101312 (2013).
163. Nienhaus, F. *et al.* Magnetic Resonance Imaging : First Results in Monocytes of Patients with Stable Coronary Artery Disease and ST-Elevation Myocardial Infarction. *molecules* **24**, 1–16 (2019).
164. Delmas, T. *et al.* How To Prepare and Stabilize Very Small Nanoemulsions. *Langmuir* **27**, 1683–1692 (2011).
165. Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J. P., Ammoury, N. & Benita, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* **55**, R1–R4 (1989).
166. Gasparini, G., Holdich, R. G. & Kosvintsev, S. R. PLGA particle production for water-soluble drug encapsulation: Degradation and release behaviour. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **75**, 557–564 (2010).
167. Govender, T., Stolnik, S., Garnett, M. C., Illum, L. & Davis, S. S. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *J. Control. Release* **57**, 171–185 (1999).
168. Kluge, J., Fusaro, F., Casas, N., Mazzotti, M. & Muhrer, G. Production of PLGA micro- and nanocomposites by supercritical fluid extraction of emulsions: I. Encapsulation of lysozyme. *J. Supercrit. Fluids* **50**, 327–335 (2009).
169. Bilati, U., Allémann, E. & Doelker, E. Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Sci.* **24**, 67–75 (2005).
170. Temme, S. *et al.* Technical Advance: Monitoring the trafficking of neutrophil granulocytes and monocytes during the course of tissue inflammation by noninvasive 19F MRI. *J. Leukoc. Biol.* **95**, 689–697 (2014).
171. Jain, R. A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* **21**, 2475–2490 (2000).
172. Lanza, G. M. *et al.* 1H/19F Magnetic Resonance Molecular Imaging with Perfluorocarbon Nanoparticles. in *Current topics in developmental biology* **70**, 57–76 (2005).
173. Srinivas, M., Morel, P. A., Ernst, L. A., Laidlaw, D. H. & Ahrens, E. T. Fluorine-19 MRI for visualization and quantification of cell migration in a diabetes model. *Magn. Reson. Med.* **58**, 725–734 (2007).
174. Longmaid, H. E. *et al.* In vivo 19F NMR imaging of liver, tumor, and abscess in rats. Preliminary results. *Invest. Radiol.* **20**, 141–5 (1985).
175. Sotak, C. H. *et al.* A new perfluorocarbon for use in fluorine-19 magnetic resonance imaging and spectroscopy. *Magn. Reson. Med.* **29**, 188–195 (1993).
176. Nöth, U. *et al.* Perfluoro-15-crown-5-ether labelled macrophages in adoptive transfer experimental allergic encephalomyelitis. *Artif. Cells. Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* **25**, 243–54 (1997).
177. Rothe, M. *et al.* In vivo 19F MR inflammation imaging after myocardial infarction in a large animal model at 3 T. *Magn. Reson. Mater. Physics, Biol. Med.* **32**, 5–13 (2018).
178. Bönner, F. *et al.* Monocyte imaging after myocardial infarction with 19F MRI at 3 T: a pilot study in explanted porcine hearts. *Eur. Hear. J. - Cardiovasc. Imaging* **16**, 612–620 (2015).
179. Patel, S. K., Beaino, W., Anderson, C. J. & Janjic, J. M. Theranostic nanoemulsions for macrophage COX-2 inhibition in a murine inflammation model. *Clin. Immunol.* **160**, 59–70 (2015).
180. Shin, S. H., Kadayakkara, D. K. & Bulte, J. W. M. In Vivo 19F MR Imaging Cell Tracking of Inflammatory Macrophages and Site-specific Development of Colitis-associated Dysplasia. *Radiology* **282**, 194–201 (2017).
181. Shin, S. H., Park, S. H., Kim, S. W., Kim, M. & Kim, D. Fluorine MR Imaging Monitoring of Tumor Inflammation after High-Intensity Focused Ultrasound Ablation. *Radiology* **287**, 476–484 (2018).
182. Bönner, F. *et al.* Multifunctional MR monitoring of the healing process after myocardial infarction. *Basic Res. Cardiol.* **109**,

## Literaturverzeichnis

- 430 (2014).
183. Ye, Y. X. *et al.* Monitoring of monocyte recruitment in reperfused myocardial infarction with intramyocardial hemorrhage and microvascular obstruction by combined fluorine 19 and proton cardiac magnetic resonance imaging. *Circulation* **128**, 1878–1888 (2013).
184. Jacoby, C. *et al.* Visualization of immune cell infiltration in experimental viral myocarditis by 19F MRI in vivo. *Magn. Reson. Mater. Physics, Biol. Med.* **27**, 101–106 (2014).
185. van Heeswijk, R. B. *et al.* Selective in vivo visualization of immune-cell infiltration in a mouse model of autoimmune myocarditis by fluorine-19 cardiac magnetic resonance. *Circ. Cardiovasc. Imaging* **6**, 277–84 (2013).
186. van Heeswijk, R. B. *et al.* Fluorine MR Imaging of Inflammation in Atherosclerotic Plaque in Vivo. *Radiology* **275**, 421–9 (2015).
187. Morawski, A. M. *et al.* Quantitative 'magnetic resonance immunohistochemistry' with ligand-targeted 19F nanoparticles. *Magn. Reson. Med.* **52**, 1255–1262 (2004).
188. Vasudeva, K. *et al.* Imaging Neuroinflammation In Vivo in a Neuropathic Pain Rat Model with Near-Infrared Fluorescence and 19F Magnetic Resonance. *PLoS One* **9**, e90589 (2014).
189. Weise, G., Basse-Luesebrink, T. C., Wessig, C., Jakob, P. M. & Stoll, G. In vivo imaging of inflammation in the peripheral nervous system by 19F MRI. *Exp. Neurol.* **229**, 494–501 (2011).
190. Waiczies, H. *et al.* Visualizing brain inflammation with a shingled-leg radio-frequency head probe for 19F/1H MRI. *Sci. Rep.* **3**, 1280 (2013).
191. Günden-Silber, T., Temme, S., Jacoby, C. & Flögel, U. Chapter 14 Biomedical 19F MRI Using Perfluorocarbons. *Preclin. MRI Methods Protoc. Methods Mol. Biol.* **1718**, 235–257 (2018).
192. Jacoby, C. *et al.* Probing different perfluorocarbons for in vivo inflammation imaging by 19F MRI: Image reconstruction, biological half-lives and sensitivity. *NMR Biomed.* **27**, 261–271 (2014).
193. Flögel, U. *et al.* Noninvasive detection of graft rejection by in vivo 19F MRI in the early stage. *Am. J. Transplant.* **11**, 235–244 (2011).
194. Hitchens, T. K. *et al.* 19F MRI detection of acute allograft rejection with in vivo perfluorocarbon labeling of immune cells. *Magn. Reson. Med.* **65**, 1144–53 (2011).
195. Flögel, U. *et al.* Selective activation of adenosine A2A receptors on immune cells by a CD73-dependent prodrug suppresses joint inflammation in experimental rheumatoid arthritis. *Sci. Transl. Med.* **4**, 1–8 (2012).
196. Hertlein, T. *et al.* Visualization of abscess formation in a murine thigh infection model of *Staphylococcus aureus* by 19F-magnetic resonance imaging (MRI). *PLoS One* **6**, 1–9 (2011).
197. Zhong, J., Mills, P. H., Hitchens, T. K. & Ahrens, E. T. Accelerated fluorine-19 MRI cell tracking using compressed sensing. *Magn. Reson. Med.* **69**, 1683–90 (2013).
198. Makela, A. V & Foster, P. J. Imaging macrophage distribution and density in mammary tumors and lung metastases using fluorine-19 MRI cell tracking. *Magn. Reson. Med.* **80**, 1138–1147 (2018).
199. Ratner, A. V *et al.* Detection of tumors with 19F magnetic resonance imaging. *Invest. Radiol.* **23**, 361–4 (1988).
200. Makela, A. V., Gaudet, J. M. & Foster, P. J. Quantifying tumor associated macrophages in breast cancer: A comparison of iron and fluorine-based MRI cell tracking. *Sci. Rep.* **7**, 1–9 (2017).
201. Jones, S. A. *et al.* C-reactive protein: a physiological activator of interleukin 6 receptor shedding. *J. Exp. Med.* **189**, 599–604 (1999).
202. Temme, S. *et al.* Noninvasive Imaging of Early Venous Thrombosis by 19F Magnetic Resonance Imaging With Targeted Perfluorocarbon Nanoemulsions. *Circulation* **131**, 1405–1414 (2015).
203. Dower Ian Sabroe, S. K., Jones, E. C., Usher, L. R. & B, M. K. Lipopolysaccharide Responses Critical Role for Monocytes in Leukocyte Human Peripheral Blood Granulocytes: A Toll-Like Receptor (TLR)2 and TLR4 in. *J. Immunol.* **168**, 4701–4710 (2002).
204. Muta, T. & Takeshige, K. Essential roles of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein for activation of toll-like receptor (TLR)2 as well as TLR4 Reconstitution of TLR2-and TLR4-activation by distinguishable ligands in LPS preparations. *Eur. J. Biochem.* **268**, 4580–4589 (2001).
205. Corning. Matrigel Matrix | Extracellular Matrix | Corning. Available at: <https://www.corning.com/emea/de/products/life-sciences/products/surfaces/matrigel-matrix.html>. (Accessed: 29th February 2020)

## Literaturverzeichnis

206. Temme, S., Grapentin, C., Güden-Silber, T. & Flögel, U. Active Targeting of Perfluorocarbon Nanoemulsions. in *Fluorine Magnetic Resonance Imaging* 97–133 (2016).
207. Koshkina, O. *et al.* Multicore Liquid Perfluorocarbon-Loaded Multimodal Nanoparticles for Stable Ultrasound and 19 F MRI Applied to In Vivo Cell Tracking. *Adv. Funct. Mater.* **29**, 1–14 (2019).
208. Gustafson, H. H., Holt-Casper, D., Grainger, D. W. & Ghandehari, H. Nanoparticle Uptake: The Phagocyte Problem. *Nano Today* **10**, 487–510 (2015).
209. Sosale, N. G., Spinler, K. R., Alvey, C. & Discher, D. E. Macrophage engulfment of a cell or nanoparticle is regulated by unavoidable opsonization , a species- specific ‘ Marker of Self ’ CD47 , and target physical properties. *Curr. Opin. Immunol.* **35**, 107–112 (2015).
210. Wang, X. & Quinn, P. J. Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. *Prog. Lipid Res.* **49**, 97–107 (2010).
211. Wang, X. & Quinn, P. J. Endotoxins: Lipopolysaccharides of Gram-Negative Bacteria. in *Endotoxins: Structure, Function and Recognition* 3–25 (Springer, Dordrecht, 2010). doi:10.1007/978-90-481-9078-2\_1
212. Newling, M. *et al.* C-Reactive Protein Promotes Inflammation through Fc  $\gamma$ R-Induced Glycolytic Reprogramming of Human Macrophages Melissa. *J. Immunol.* **203**, 000–000 (2019).
213. Bodman-Smith, K. B. *et al.* C-reactive protein-mediated phagocytosis and phospholipase D signalling through the high-affinity receptor for immunoglobulin G (Fc $\gamma$ RI). *Immunology* **107**, 252–260 (2002).
214. Wolbink, G. J., Brouwer, M. C., Buysmann, S., ten Berge, I. J. & Hack, C. E. CRP-mediated activation of complement in vivo: assessment by measuring circulating complement-C-reactive protein complexes. *J. Immunol.* **157**, 473–9 (1996).
215. Shrivastava, A. K., Singh, H. V., Raizada, A. & Singh, S. K. C-reactive protein, inflammation and coronary heart disease. *Egyptian Heart Journal* **67**, 89–97 (2015).
216. Dibra, A. *et al.* Predictive value of basal C-reactive protein levels for myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction is dependent on the type of reperfusion treatment. *Eur. Heart J.* **24**, 1128–1133 (2003).
217. Tomoda, H. & Aoki, N. Prognostic value of C-reactive protein levels within six hours after the onset of acute myocardial infarction. *Am. Heart J.* **140**, 324–328 (2000).
218. Calabrò, P., Golia, E. & Yeh, E. T. H. Role of C-reactive protein in acute myocardial infarction and stroke: possible therapeutic approaches. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **13**, 4–16 (2012).
219. DEDOBLEER, C., MELOT, C. & RENARD, M. C-reactive protein increase in acute myocardial infarction. *Acta Cardiol.* **59**, 291–296 (2004).
220. Vanhaverbeke, M. *et al.* C-reactive protein during and after myocardial infarction in relation to cardiac injury and left ventricular function at follow-up. *Clin. Cardiol.* **41**, 1201–1206 (2018).
221. Berton, G. *et al.* C-reactive protein in acute myocardial infarction: association with heart failure. *Am. Heart J.* **145**, 1094–1101 (2003).
222. O’Hanlon, C. F., Fedczyna, T., Eaker, S., Shingleton, W. D. & Helfer, B. M. Integrating a 19F MRI Tracer Agent into the Clinical Scale Manufacturing of a T-Cell Immunotherapy. *Contrast Media Mol. Imaging* **2017**, 9548478 (2017).
223. Fink, C. *et al.* 19F-perfluorocarbon-labeled human peripheral blood mononuclear cells can be detected in vivo using clinical MRI parameters in a therapeutic cell setting. *Sci. Rep.* **8**, 590 (2018).
224. Chapelin, F., Capitini, C. M. & Ahrens, E. T. Fluorine-19 MRI for detection and quantification of immune cell therapy for cancer. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* **6**, 1–11 (2018).
225. Lin, W., Bailey, W. & Lagow, R. J. The First Perfluoro Crown Ethers. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1350–1352 (1985).
226. Tirotta, I. *et al.* A superfluorinated molecular probe for highly sensitive in vivo 19F-MRI. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 8524–8527 (2014).
227. Schweighardt, F. K. & Rubertone, J. A. PERFLUORO-CROWNETHERS IN FLUORINE MAGNETIC RESONANCE MAGING. *Geothermics* **14**, 595–599 (1985).
228. Saba, T. M. Physiology and Physiopathology of the Reticuloendothelial System. *Arch. Intern. Med.* **126**, 1031 (1970).
229. Castro, O., Nesbitt, A. E. & Lyles, D. Effect of a perfluorocarbon emulsion (Fluosol-DA) on reticuloendothelial system clearance function. *Am. J. Hematol.* **16**, 15–21 (1984).
230. Spahn, D. R. Blood substitutes Artificial oxygen carriers: perfluorocarbon emulsions. *Crit. Care* **3**, R93–R97 (1999).
231. Srinivas, M. *et al.* In Vivo Cytometry of Antigen-Specific T Cells Using 19 F MRI. *Magn. Reson. Med.* **62**, 747–753 (2009).

## Literaturverzeichnis

232. Bourquin, J. *et al.* Biodistribution, Clearance, and Long-Term Fate of Clinically Relevant Nanomaterials. *Adv. Mater.* **30**, 1–31 (2018).
233. Cai, Q., Shi, G., Bei, J. & Wang, S. Enzymatic degradation behavior and mechanism of poly(lactide-co-glycolide) foams by trypsin. *Biomaterials* **24**, 629–38 (2003).
234. Mirakabad, F. S. T. *et al.* PLGA-Based Nanoparticles as Cancer Drug Delivery Systems. *Asian Pac J Cancer Prev* **15**, 517–535 (2014).
235. Alexander H. Staal, Katrin Becker, Sebastian Temme, Oya Tagit, Andor Veltien, N. Koen van Riessen, Uli Flögel, M. S. Fast clearing clinically applicable 19F MRI imaging agent (#267). in *14th European Molecular Imaging Meeting 19-22 March 2019* (2019).
236. Staal, A. H. J. *et al.* In Vivo Clearance of 19F MRI Imaging Nanocarriers is Strongly Influenced by Nanoparticle Ultrastructure. *Biomaterials* 116544 (2020). doi:10.1016/j.jns.2019.116544
237. dos Santos, T., Varela, J., Lynch, I., Salvati, A. & Dawson, K. A. Quantitative Assessment of the Comparative Nanoparticle-Uptake Efficiency of a Range of Cell Lines. *Small*. **7**, 3341–3349 (2011).
238. Waiczies, S. *et al.* Enhanced Fluorine-19 MRI Sensitivity using a Cryogenic Radiofrequency Probe: Technical Developments and Ex Vivo Demonstration in a Mouse Model of Neuroinflammation. *Sci. Rep.* **7**, 1–10 (2017).
239. Dobrovolskaia, M. a, Aggarwal, P., Hall, J. B. & Mcneil, S. E. Preclinical Studies To Understand Nanoparticle Interaction with the Immune System and Its Potential Effects on Nanoparticle Biodistribution. *Mol Pharm* **5**, 487–495 (2008).
240. Nel, A. E. *et al.* Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature Materials* **8**, 543–557 (2009).
241. Fang, C. *et al.* In vivo tumor targeting of tumor necrosis factor- $\alpha$ -loaded stealth nanoparticles: Effect of MePEG molecular weight and particle size. *Eur. J. Pharm. Sci.* **27**, 27–36 (2006).
242. Champion, J. A. & Mitragotri, S. Role of target geometry in phagocytosis. *PNAS* **103**, 4930–4934 (2006).
243. Wang, T., Bai, J., Jiang, X. & Nienhaus, G. U. Cellular Uptake of Nanoparticles by Membrane Penetration: A Study Combining Confocal Microscopy with FTIR Spectroelectrochemistry. *ACS Nano* **6**, 1251–1259 (2012).
244. Ruiz-Cabello, J. *et al.* In Vivo ‘Hot Spot’ MR Imaging of Neural Stem Cells using Fluorinated Nanoparticles. *Magn Reson Med.* **60**, 1506–1511 (2008).
245. Kwon, Y. J., Standley, S. M., Goh, S. L. & Fréchet, J. M. J. Enhanced antigen presentation and immunostimulation of dendritic cells using acid-degradable cationic nanoparticles. *J. Control. Release* **105**, 199–212 (2005).
246. Dobrovolskaia, M. A. & McNeil, S. E. Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nat. Nanotechnol.* **2**, 469–478 (2007).
247. Blanco, E., Shen, H. & Ferrari, M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nature Biotechnology* **33**, 941–951 (2015).
248. Janjic, J. M., Srinivas, M., Kadayakkara, D. K. K. & Ahrens, E. T. Self-delivering Nanoemulsions for Dual Fluorine-19 MRI and Fluorescence Detection. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 2832–2841 (2008).
249. Gonzales, C. *et al.* In-Vivo Detection and Tracking of T Cells in Various Organs in a Melanoma Tumor Model by 19F-Fluorine MRS/MRI. *PLoS One* **11**, e0164557 (2016).
250. Van Den Bos, E. J. *et al.* Improved Efficacy of Stem Cell Labeling for Magnetic Resonance Imaging Studies by the Use of Cationic Liposomes. *Cell Transplant.* **12**, 743–756 (2003).
251. Linehan, S. A. *et al.* Mannose receptor and its putative ligands in normal murine lymphoid and nonlymphoid organs: in situ expression of mannose receptor by selected macrophages. *J Exp Med* **189**, 1961–1972 (1999).
252. Smith, D. J., Kornbrust, E. S. & Lane, T. A. Phagocytosis of a fluorescently labeled perflubron emulsion by a human monocyte cell line. *Artif. Cells. Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* **22**, 1215–21 (1994).
253. Silva, M. T. & Correia-Neves, M. Neutrophils and macrophages: The main partners of phagocyte cell systems. *Front. Immunol.* **3**, 2008–2013 (2012).
254. Vonarbourg, A. *et al.* Evaluation of pegylated lipid nanocapsules versus complement system activation and macrophage uptake. *J. Biomed. Res. Part A* **78**, 620–628 (2006).
255. Bazile, D. *et al.* Stealth Me. PEG-PLA Nanoparticles Avoid Uptake by the Mononuclear Phagocytes System. *J. Pharm. Sci.* **84**, 493–498 (1995).
256. Hak, S., Garaiova, Z., Olsen, L. T., Nilsen, A. M. & de Lange Davies, C. The Effects of oil-in-Water Nanoemulsion



## Literaturverzeichnis

- Polyethylene Glycol Surface Density on Intracellular Stability, Pharmacokinetics, and Biodistribution in Tumor Bearing Mice. *Pharm. Res.* **32**, 1475–1485 (2015).
257. McNeil, S. E. Nanotechnology for the biologist. *J. Leukoc. Biol.* **78**, 585–594 (2005).
258. He, C., Hu, Y., Yin, L., Tang, C. & Yin, C. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials* **31**, 3657–3666 (2010).
259. Janjic, J. M. & Ahrens, E. T. Fluorine-containing nanoemulsions for MRI cell tracking. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology* **1**, 492–501 (2009).
260. Ahrens, E. T., Helfer, B. M., O’Hanlon, C. F. & Schirda, C. Clinical cell therapy imaging using a perfluorocarbon tracer and fluorine-19 MRI. *Magn. Reson. Med.* **72**, 1696–1701 (2014).
261. Schmieder, A. H., Caruthers, S. D., Keupp, J., Wickline, S. A. & Lanza, G. M. Recent Advances in 19Fluorine Magnetic Resonance Imaging with Perfluorocarbon Emulsions. *Eng. (Beijing, China)* **1**, 475–489 (2015).
262. Almeida, J. P. M., Chen, A. L., Foster, A. & Drezek, R. In vivo biodistribution of nanoparticles. *Nanomedicine* **6**, 815–835 (2011).
263. Ding, Z. *et al.* Epicardium-Derived Cells Formed After Myocardial Injury Display Phagocytic Activity Permitting In Vivo Labeling and Tracking. *Stem Cells Transl. Med.* **5**, 639–650 (2016).
264. Scheiermann, C., Frenette, P. S. & Hidalgo, A. Regulation of leucocyte homeostasis in the circulation. *Cardiovasc. Res.* **107**, 340–51 (2015).
265. Waiczies, H. *et al.* Perfluorocarbon particle size influences magnetic resonance signal and immunological properties of dendritic cells. *PLoS One* **6**, 1–9 (2011).
266. Ratner, A. V *et al.* 19F magnetic resonance imaging of the reticuloendothelial system. *Magn. Reson. Med.* **5**, 548–54 (1987).
267. Mattrey, R. F., Long, D. M., Multer, F., Mitten, R. & Higgins, C. B. Perfluorooctylbromide: a reticuloendothelial-specific and tumor-imaging agent for computed tomography. *Radiology* **145**, 755–8 (1982).
268. Cataldi, M., Vigliotti, C., Mosca, T., Cammarota, M. R. & Capone, D. Emerging role of the spleen in the pharmacokinetics of monoclonal antibodies, nanoparticles and exosomes. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 1–24 (2017).
269. Liebich, H.-G. 10 Verdauungsapparat (Apparatus digestorius). in *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere - Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis* (ed. Liebich, H.-G.) 187–238 (Schattauer, 2003).
270. Beck, M., Mandal, T., Buske, C. & Lindén, M. Serum Protein Adsorption Enhances Active Leukemia Stem Cell Targeting of Mesoporous Silica Nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **9**, 18566–18574 (2017).
271. Ratner, A. V *et al.* Detection of Acute Radiation Damage to the Spleen in Mice by Using Fluorine-19 MR Imaging. *AJR* **151**, 477–480 (1988).
272. Nehoff, H., Parayath, N. N., Domanovitch, L., Taurin, S. & Greish, K. Nanomedicine for drug targeting : strategies beyond the enhanced permeability and retention effect. *Int. J. Nanomedicine* **9**, 2539–2555 (2014).
273. Liebich, H.-G. 8 Immunsystem und lymphatische Organe (Organa lymphopoetica). in *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere - Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis* (ed. Liebich, H.-G.) 157–168 (Schattauer, 2003).
274. Zarif, L. *et al.* Biodistribution of mixed fluorocarbon-hydrocarbon dowl molecules used as stabilizers of fluorocarbon emulsions: a quantitative study by fluorine nuclear magnetic resonance (NMR). *Pharm. Res.* **11**, 122–7 (1994).
275. Sou, K., Goins, B., Oyajobi, B. O., Travi, B. L. & Phillips, W. T. Bone marrow-tagged liposomal carriers. *Expert Opin. Drug Deliv.* **8**, 317–328 (2011).
276. Girard, J. P. & Springer, T. A. High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunol. Today* **16**, 449–457 (1995).
277. Miyasaka, M. & Tanaka, T. Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 360–370 (2004).
278. Veerman, K., Tardiveau, C., Martins, F., Coudert, J. & Girard, J. P. Single-Cell Analysis Reveals Heterogeneity of High Endothelial Venules and Different Regulation of Genes Controlling Lymphocyte Entry to Lymph Nodes. *Cell Rep.* **26**, 3116–3131 (2019).
279. Da Silva-Candal, A. *et al.* Shape effect in active targeting of nanoparticles to inflamed cerebral endothelium under static and flow conditions. *J. Control. Release* **309**, 94–105 (2019).
280. Liebich, H.-G. 1 Zelle (Cellula). in *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere - Lehrbuch und Farbatlas für Studium und*

## Literaturverzeichnis

- Praxis* (ed. Liebich, H.-G.) 3–44 (Schattauer, 2003).
281. Schmid, S. L. & Carter, L. L. ATP is required for receptor-mediated endocytosis in intact cells. *J. Cell Biol.* **111**, 2307–2318 (1990).
282. Owens III, D. E. & Peppas, N. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **307**, 93–102 (2006).
283. Pham, C. T. N. *et al.* Application of a hemolysis assay for analysis of complement activation by perfluorocarbon nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **10**, 651–660 (2014).
284. Smith, P. J. *et al.* Cellular entry of nanoparticles via serum sensitive clathrin-mediated endocytosis, and plasma membrane permeabilization. *Int. J. Nanomedicine* **7**, 2045–2055 (2012).
285. Guarnieri, D., Guaccio, A., Fusco, S. & Netti, P. A. Effect of serum proteins on polystyrene nanoparticle uptake and intracellular trafficking in endothelial cells. *J. Nanoparticle Res.* **13**, 4295–4309 (2011).
286. Dutta, D. & Donaldson, J. G. Search for inhibitors of endocytosis: Intended specificity and unintended consequences. *Cell. Logist.* **2**, 203–208 (2012).
287. Qaddoumi, M. G. *et al.* The Characteristics and Mechanisms of Uptake of PLGA Nanoparticles in Rabbit Conjunctival Epithelial Cell Layers. *Pharm. Res.* **21**, 641–648 (2004).
288. Shin, S. H. *et al.* Tracking Perfluorocarbon Nanoemulsion Delivery by 19F MRI for Precise High Intensity Focused Ultrasound Tumor Ablation. *Theranostics* **7**, 562–572 (2017).
289. Riess, J. G. & Krafft, M. P. Advanced fluorocarbon-based systems for oxygen and drug delivery, and diagnosis. *Artif. Cells. Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* **25**, 43–52 (1997).
290. Anderson, J. M. & Shive, M. S. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **28**, 5–24 (1997).
291. Iwasaki, Y., Sawada, S., Ishihara, K., Khang, G. & Lee, H. B. Reduction of surface-induced inflammatory reaction on PLGA/MPC polymer blend. *Biomaterials* **23**, 3897–3903 (2002).
292. Li, D. *et al.* Enhanced Biocompatibility of PLGA Nanofibers with Gelatin/Nano-Hydroxyapatite Bone Biomimetics Incorporation. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **6**, 9402–9410 (2014).
293. Nitta, S., Numata, K., Nitta, S. K. & Numata, K. Biopolymer-Based Nanoparticles for Drug/Gene Delivery and Tissue Engineering. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 1629–1654 (2013).
294. Duclairoir, C., Orecchioni, A.-M., Depraetere, P., Osterstock, F. & Nakache, E. Evaluation of gliadins nanoparticles as drug delivery systems: a study of three different drugs. *Int. J. Pharm.* **253**, 133–144 (2003).
295. Kumari, A., Yadav, S. K. & Yadav, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **75**, 1–18 (2010).
296. Apeldoorn, A. A. van *et al.* Raman Imaging of PLGA Microsphere Degradation Inside Macrophages. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 13226–13227 (2004).
297. Kalos, M. & June, C. H. Adoptive T Cell Transfer for Cancer Immunotherapy in the Era of Synthetic Biology. *Immunity* **39**, 49–60 (2013).
298. Srinivas, M. *et al.* In Vivo Cytometry of Antigen-Specific T Cells Using 19F MRI. *Magn. Reson. Med.* **62**, 747–753 (2009).
299. Somanchi, S. S., Kennis, B. A., Gopalakrishnan, V., Lee, D. A. & Bankson, J. A. In Vivo (19)F-Magnetic Resonance Imaging of Adoptively Transferred NK Cells. *Methods Mol. Biol.* **1441**, 317–32 (2016).
300. Bouchlaka, M. N. *et al.* (19)F-MRI for monitoring human NK cells in vivo. *Oncoimmunology* **5**, e1143996 (2016).
301. Ahrens, E. T., Flores, R., Xu, H. & Morel, P. A. In vivo imaging platform for tracking immunotherapeutic cells. *Nat. Biotechnol.* **23**, 983–987 (2005).
302. Dewitte, H. *et al.* Design and evaluation of theranostic perfluorocarbon particles for simultaneous antigen-loading and 19F-MRI tracking of dendritic cells. *J. Control. Release* **169**, 141–149 (2013).
303. Boehm-Sturm, P., Mengler, L., Wecker, S., Hoehn, M. & Kallur, T. In Vivo tracking of human neural stem cells with 19F magnetic resonance imaging. *PLoS One* **6**, e29040 (2011).
304. Boehm-Sturm, P. *et al.* A multi-modality platform to image stem cell graft survival in the naïve and stroke-damaged mouse brain. *Biomaterials* **35**, 2218–2226 (2014).
305. Partlow, K. C. *et al.* <sup>19</sup>F magnetic resonance imaging for stem/progenitor cell tracking with multiple unique perfluorocarbon nanobeacons. *FASEB J.* **21**, 1647–1654 (2007).

## Literaturverzeichnis

306. Helfer, B. M. *et al.* 19F MRI Tracer Preserves In Vitro and In Vivo Properties of Hematopoietic Stem Cells. *Cell Transplant.* **22**, 87–97 (2013).
307. Genove, G., DeMarco, U., Xu, H., Goins, W. F. & Ahrens, E. T. A new transgene reporter for in vivo magnetic resonance imaging. *Nat. Med.* **11**, 450–454 (2005).
308. Nicolete, R., Santos, D. F. D. & Faccioli, L. H. The uptake of PLGA micro or nanoparticles by macrophages provokes distinct in vitro inflammatory response. *Int. Immunopharmacol.* **11**, 1557–1563 (2011).
309. Semple, J. W., Aslam, R., Kim, M., Speck, E. R. & Freedman, J. Platelet-bound lipopolysaccharide enhances Fc receptor – mediated phagocytosis of IgG-opsonized platelets. *Blood* **109**, 4803–4806 (2007).
310. Scheraga, R. G. *et al.* TRPV4 Mechanosensitive Ion Channel Regulates Lipopolysaccharide-Stimulated Macrophage Phagocytosis. *J. Immunol.* **196**, 428–436 (2016).
311. Chen, K.-H. *et al.* Nanoparticle distribution during systemic inflammation is size-dependent and organ-specific. *Nanoscale* **7**, 15863–15872 (2015).
312. Pechkovsky, D. V., Potapnev, M. P. & Zalutskaya, O. M. Different patterns of cytokine regulation of phagocytosis and bacterial killing by human neutrophils. *Int. J. Antimicrob. Agents* **7**, 33–40 (1996).
313. Ousman, S. S. & David, S. MIP-1 $\alpha$ , MCP-1, GM-CSF, and TNF- $\alpha$  Control the Immune Cell Response That Mediates Rapid Phagocytosis of Myelin from the Adult Mouse Spinal Cord. *J. Neurosci.* **21**, 4649–4656 (2001).
314. Brown, E. J. The Role of Extracellular Matrix in the Control of Phagocytosis Proteins. *J. Leukoc. Biol.* **39**, 579–591 (1986).
315. Xia, S. *et al.* Extracellular matrix protein tenascin C increases phagocytosis mediated by CD47 Loss of function in glioblastoma. *Cancer Res.* **79**, 2697–2708 (2019).
316. Janeway Jr, C. A. Approaching the Asymptote? Evolution and Revolution in Immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **54**, 1–13 (1989).
317. Murdock, J. L. & Núñez, G. TLR4: The Winding Road to the Discovery of the LPS Receptor. *J. Immunol.* **197**, 2561–2562 (2016).
318. Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J. & Mathison, J. C. CD14, a Receptor for Complexes of Lipopolysaccharide (LPS) and LPS Binding Protein. *Science (80-. )*. **249**, 1431–1433 (1990).
319. Hailman, E. *et al.* Lipopolysaccharide (LPS)-binding Protein Accelerates the Binding of LPS to CD14. *J. Exp. Med.* **179**, 269–277 (1994).
320. Morrison, D. C. & Ulevitch, R. J. The Effect of Bacterial Endotoxins on host mediation systems. *Am. J. Pathol.* **93**, 527–618 (1978).
321. Ding, A. & Nathan, C. F. Participation of the cytoskeleton in macrophage responses to LPS. in *Mononuclear Phagocytes* 472–477 (Springer Netherlands, 1992). doi:10.1007/978-94-015-8070-0\_61
322. Böhmer, R. H., Trinkle, L. S. & Staneck, J. L. Dose effects of LPS on neutrophils- in a whole blood flow cytometric assay of phagocytosis and oxidative burst. *Cytometry* **13**, 525–531 (1992).
323. Haslett, C., Guthrie, L. A., Kopaniak, M. M., Johnston, R. B. & Henson, P. M. Modulation of multiple neutrophil functions by preparative methods or trace concentrations of bacterial lipopolysaccharide. *Am. J. Pathol.* **119**, 101–110 (1985).
324. Honstetter, A. *et al.* Lipopolysaccharide from *Coxiella burnetii* Is Involved in Bacterial Phagocytosis, Filamentous Actin Reorganization, and Inflammatory Responses through Toll-Like Receptor 4. *J. Immunol.* **172**, 3695–3703 (2004).
325. Lynn, W. A., Liu, Y. & Golenbock, D. T. Neither CD14 nor serum is absolutely necessary for activation of mononuclear phagocytes by bacterial lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* **61**, 4452–4461 (1993).
326. Anand, R. J. *et al.* Toll-like receptor 4 plays a role in macrophage phagocytosis during peritoneal sepsis. *J. Pediatr. Surg.* **42**, 927–933 (2007).
327. Cooper, P. H., Mayer, P. & Baggiolini, M. Stimulation of phagocytosis in bone marrow-derived mouse macrophages by bacterial lipopolysaccharide: correlation with biochemical and functional parameters. *J. Immunol.* **133**, 913–922 (1984).
328. Takahashi, N. *et al.* *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide stimulates collagen phagocytosis by human gingival fibroblasts. *Oral Microbiol. Immunol.* **23**, 259–264 (2008).
329. Hayashi, F., Means, T. K. & Luster, A. D. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* **102**, 2660–2669 (2003).
330. Kalmár, B., Kittel, Á., Lemmens, R., Környei, Z. & Madarász, E. Cultured astrocytes react to LPS with increased cyclooxygenase activity and phagocytosis. *Neurochem. Int.* **38**, 453–461 (2001).

## Literaturverzeichnis

331. Abd-El-Basset, E. M. & Fedoroff, S. Dynamics of actin filaments in microglia during Fc receptor-mediated phagocytosis. *Acta Neuropathol.* **88**, 527–537 (1994).
332. Hughes, M. M., Field, R. H., Perry, V. H., Murray, C. L. & Cunningham, C. Microglia in the degenerating brain are capable of phagocytosis of beads asncd of apoptotic cells, but do not efficiently remove PrPSc, even upon LPS stimulation. *Glia* **58**, 2017–2030 (2010).
333. Sandstrom, T., Bjermer, L. & Rylander, R. Lipopolysaccharide (LPS) inhalation in healthy subjects increases neutrophils, lymphocytes and fibronectin levels in bronchoalveolar lavage fluid. *Eur. Respir. J.* **5**, 992–996 (1992).
334. Gershov, D., Kim, S., Brot, N. & Elkon, K. B. C-Reactive Protein Binds to Apoptotic Cells, Protects the Cells from Assembly of the Terminal Complement Components, and Sustains an Antiinflammatory Innate Immune Response. *J. Exp. Med.* **192**, 1353–1364 (2000).
335. Robey, F. A., Jones, K. D. & Steinberg, A. D. C-reactive protein mediates the solubilization of nuclear DNA by complement in vitro. *J. Exp. Med.* **161**, 1344–1356 (1985).
336. Pepys, M. B. & Hirschfield, G. M. C-reactive protein: a critical update. *J. Clin. Invest.* **111**, 1805–1812 (2003).
337. Egenhofer, C., Alsdorff, K., Fehsel, K., Kolb-bachofen, V. & Kolb-Bachofen, V. Membrane-associated C-reactive Protein on Rat Liver Macrophages Is Synthesized Within the Macrophages, Expressed as Neo-C-reactive Protein and Bound Through a C-reactive Protein-specific Membrane Receptor The acute-phase protein C-reactive protein (CRP) h. *HEPATOLOGY* **18**, 12–16 (1993).
338. Hurlimann, J., Thorbecke, G. J. & Hochwald, G. M. THE LIVER AS THE SITE OF C-REACTIVE PROTEIN FORMATION. *J Exp Med* **123**, 365–78 (1966).
339. Kolb-Bachofen, V., Puchta-Teudt, N. & Egenhofer, C. Expression of membrane-associated C-reactive protein by human monocytes: indications for a selectin-like activity participating in adhesion. *Glycoconj. J.* **12**, 122–127 (1995).
340. Kuta, A. E., Baum, L. L. & Meig, J. C-REACTIVE PROTEIN IS PRODUCED BY A SMALL NUMBER OF NORMAL HUMAN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES. *J Exp Med* **164**, 321–326 (1986).
341. Murphy, T. M., Baum, L. L. & Beaman, K. D. Extrahepatic Transcription of Human C-reactive Protein. *J Exp Med* **173**, 495–498 (1991).
342. Yamamoto, S. *et al.* CHANGES IN SERUM C-REACTIVE PROTEIN LEVELS IN DOGS WITH VARIOUS DISORDERS AND SURGICAL TRAUMAS. *Vet. Res. Commun.* **17**, 85–93 (1993).
343. Clos, T. W. Du & Mold, C. C-reactive protein An Activator of Innate Immunity and a Modulator of Adaptive Immunity. *Immunol. Res.* **30**, 261–277 (2004).
344. Ikeda, U. *et al.* Serum interleukin 6 levels become elevated in acute myocardial infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **24**, 579–584 (1992).
345. Ørn, S. *et al.* CLINICAL RESEARCH C-reactive protein, infarct size, microvascular obstruction, and left-ventricular remodelling following acute myocardial infarction. *Eur. Heart J.* **30**, 1180–1186 (2009).
346. JJ, M. & I., K. Serum C-Reactive Protein Levels in Disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **389**, 406–418 (1982).
347. Reindl, M. *et al.* Relation of inflammatory markers with myocardial and microvascular injury in patients with reperfused ST-elevation myocardial infarction. *Eur. Heart J.* **6**, 640–649 (2017).
348. Kushner, I., Broder, M. L. & Karp, D. Control of the Acute Phase Response SERUM C-REACTIVE PROTEIN KINETICS AFTER ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION. *J. Clin. Invest.* **61**, 235–242 (1978).
349. Nijmeijer, R. *et al.* C-reactive protein activates complement in infarcted human myocardium. *Am. J. Pathol.* **163**, 269–275 (2003).
350. Pepys, M. B. *et al.* Targeting C-reactive protein for the treatment of cardiovascular disease. *Nature* **440**, 1217–1221 (2006).
351. Mortensen, R. F. & Duszkiewicz, J. A. Mediation of CRP-dependent phagocytosis through mouse macrophage Fc-receptors. *J. Immunol.* **119**, 1611–6 (1977).
352. Mold, C., Baca, R. & Du Clos, T. W. Serum Amyloid P Component and C-Reactive Protein Opsonize Apoptotic Cells for Phagocytosis through Fcγ Receptors. *J. Autoimmun.* **19**, 147–154 (2002).
353. Bharadwaj, D., Stein, M.-P., Volzer, M., Mold, C. & Clos, T. W. Du. The Major Receptor for C-Reactive Protein on Leukocytes Is Fcγ Receptor II. *J. Exp. Med.* **190**, 585–590 (1999).
354. Terry W, D. C. & Carolyn, M. Pentraxins (CRP, SAP) in the process of complement activation and clearance of apoptotic bodies through Fcγ receptors. *Curr. Opin. Organ Transplant.* **16**, 15–20 (2012).

## Literaturverzeichnis

355. Van Deventer, S. J. H. *et al.* Experimental endotoxemia in humans: Analysis of cytokine release and coagulation, fibrinolytic, and complement pathways. *Blood* **76**, 2520–2526 (1990).
356. Hesse, D. G. *et al.* Cytokine appearance in human endotoxemia and primate bacteremia. *Surg. Gynecol. Obstet.* **166**, 147–53 (1988).
357. Wang, J. E. *et al.* Cytokine Modulation in Experimental Endotoxemia: Characterization of an ex vivo Whole Blood Model. *Eur. Surg. Res.* **32**, 65–73 (2000).
358. Rossol, M. *et al.* LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. *Crit. Rev. Immunol.* **31**, 379–446 (2011).
359. McCuskey, R. S., Urbaschek, R. & Urbaschek, B. The microcirculation during endotoxemia. *Cardiovasc. Res.* **32**, 752–763 (1996).
360. Dutta, P. *et al.* Myocardial infarction accelerates atherosclerosis. *Nature* **487**, 325–329 (2012).
361. Nahrendorf, M. & Swirski, F. K. Innate immune cells in ischaemic heart disease: Does myocardial infarction beget myocardial infarction? *Eur. Heart J.* **37**, 868–872 (2016).
362. Leuschner, F. *et al.* Rapid monocyte kinetics in acute myocardial infarction are sustained by extramedullary monocytopoiesis. *J. Exp. Med.* **209**, 123–37 (2012).
363. Frangogiannis, N. G. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ. Res.* **110**, 159–173 (2012).
364. Dutta, P. & Nahrendorf, M. Monocytes in myocardial infarction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **35**, 1066–1070 (2015).
365. Wise, R. The 'septic spleen' - a critical evaluation. *J. clin. Path.* **29**, 228–230 (1976).
366. Bio-Rad. Cell frequencies in common samples - Flow Cytometry analysis | Bio-Rad. Available at: <https://www.bio-rad-antibodies.com/flow-cytometry-cell-frequency.html>. (Accessed: 12th March 2019)
367. Feig, J. A. & Cina, S. J. Evaluation of characteristics associated with acute splenitis (septic spleen) as markers of systemic infection. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **125**, 888–891 (2001).
368. Fry, M. M. & McGavin, D. 13 Knochenmark, Blutzellen und lymphatische Gewebe. in *Pathologie der Haustiere - Allgemeine, spezielle und funktionelle Veterinärpathologie* 685–764 (2009).
369. Volkman, A. & Gowans, J. L. The Origin of Macrophages From Bone Marrow in the Rat. *Br. J. Exp. Pathol.* **46**, 62–70 (1965).
370. Serbina, N. V & Pamer, E. G. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat. Immunol.* **7**, 311–317 (2006).
371. Dewald, O. *et al.* CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circ. Res.* **96**, 881–889 (2005).
372. Van Der Laan, A. M. *et al.* Monocyte subset accumulation in the human heart following acute myocardial infarction and the role of the spleen as monocyte reservoir. *Eur. Heart J.* **35**, 376–385 (2014).
373. Leuschner, F. *et al.* ACE inhibition prevents the release of monocytes from their splenic reservoir in mice with myocardial infarction. *Circ Res* **107**, 1364–1373 (2010).
374. Bogdanos, D. P., Gao, B. & Gershwin, M. E. Liver Immunology. *Compr. Physiol.* **3**, 567–598 (2013).
375. McNamara, H. A. & Cockburn, I. A. The three Rs: Recruitment, Retention and Residence of leukocytes in the liver. *Clin. Transl. Immunol.* **5**, e123 (2016).
376. Liu, S. Q. *et al.* Endocrine protection of ischemic myocardium by FGF21 from the liver and adipose tissue. *Sci. Rep.* **3**, 1–11 (2013).
377. Liu, S. Q., Tefft, B. J., Zhang, B., Liu, C. & Wu, Y. H. Regulation of Hepatic Cell Mobilization in Experimental Myocardial Ischemia. *Cell. Mol. Bioeng.* **4**, 693–707 (2011).
378. Bode, U. *et al.* Dendritic cell subsets in lymph nodes are characterized by the specific draining area and influence the phenotype and fate of primed T cells. *Immunology* **123**, 480–490 (2008).
379. Henri, S. *et al.* The Dendritic Cell Populations of Mouse Lymph Nodes. *J. Immunol.* **167**, 741–748 (2001).
380. Bellomo, A., Gentek, R., Bajénoff, M. & Baratin, M. Lymph node macrophages: Scavengers, immune sentinels and trophic effectors. *Cellular Immunology* **330**, 168–174 (2018).
381. Louie, D. A. P. & Liao, S. Lymph Node Subcapsular Sinus Macrophages as the Frontline of Lymphatic Immune Defense. *Front. Immunol.* **10**, 347 (2019).

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Physikalische Grundlagen der Magnetresonanz. ....	9
Abbildung 1.2: Darstellung von Entzündungsprozessen mittels $^{19}\text{F}$ -MRT. ....	21
Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Untersuchung der Aufnahme von PFCs in primäre entzündliche Immunzellen in vitro. ....	43
Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Untersuchung der Aufnahme von PFCs in primäre entzündliche Immunzellen in vivo. ....	50
Abbildung 2.3: Aufbau des Grundfeldmagneten. ....	55
Abbildung 2.4: Probenkopf. ....	56
Abbildung 2.5: Schematische Darstellung des Ablaufs der in vivo Versuche zur Gewebeverteilung und -halbwertszeit mittels kombinierter $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT. ....	59
Abbildung 2.6: Schema der Entzündungsbildgebung mittels $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT. ....	62
Abbildung 3.1: Partikelcharakterisierung von PFCs und PLGA-Nanopartikeln mittels Photonenkorrelationspektroskopie und $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT. ....	67
Abbildung 3.2: Bluthalbwertszeit des $^{19}\text{F}$ -Signals nach i. v. Applikation von PFCs und PLGA-NPs. ...	68
Abbildung 3.3: Verlauf des $^{19}\text{F}$ -Signals von PFCs und PLGA-NPs im retikuloendothelialen System. .	70
Abbildung 3.4: Anreicherung der PFCs und PLGA-NPs in Knochenmark und Lymphknoten. ....	71
Abbildung 3.5: Aufnahme von PFCs und PLGA-Nanopartikeln in Zelllinien. ....	73
Abbildung 3.6: Aufnahme von PFCs und PLGA-Nanopartikeln durch murine Leukozyten. ....	75
Abbildung 3.7: Aufnahme von PFCs und PLGA-Nanopartikeln durch Zellen aus murinem Leber- und Milzgewebe. ....	78
Abbildung 3.8: Konzentrationsabhängige Aufnahme von PFCs und PLGA-Nanopartikeln durch Zelllinien. ....	79
Abbildung 3.9: $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT Untersuchungen der Aufnahme verschiedener Konzentrationen von PFCs und PLGA-Nanopartikeln. ....	80
Abbildung 3.10: Internalisation von PFCs und PLGA-NPs in CHO-Zellen - Konfokalmikroskopie. ....	81
Abbildung 3.11: Energieabhängigkeit der Partikelaufnahme durch Zelllinien. ....	82
Abbildung 3.12: Energieabhängigkeit der Partikelaufnahme durch murine Leukozyten. ....	83
Abbildung 3.13: Einfluss von Serumbestandteilen und der Bindung an Fc-Rezeptoren auf die Aufnahme von PFCs und PLGA-Nanopartikeln. ....	85
Abbildung 3.14: Einfluss der Clathrin-medierte Endozytose sowie der Phagozytose auf die Aufnahme von PFCs und PLGA-Nanopartikeln durch murine Leukozyten. ....	86
Abbildung 3.15: Vitalität von Zelllinien sowie primären Zellen nach Inkubation mit PFCs und PLGA-Nanopartikeln. ....	88
Abbildung 3.16: $^{19}\text{F}$ -Signal in Matrigel-Plugs und infarzierten Herzen. ....	91
Abbildung 3.17: Bluthalbwertszeit von PFCs. ....	92
Abbildung 3.18: Aufnahme von PFCs in Leber und Milz unter entzündlichen Bedingungen. ....	94
Abbildung 3.19: Aufnahme von PFCs in Knochenmark und Lymphknoten unter entzündlichen Bedingungen. ....	95
Abbildung 3.20: Größe der Milz unter entzündlichen Bedingungen. ....	96
Abbildung 3.21: Zusammensetzung der aus den Entzündungsherden isolierten Immunzellpopulationen. ....	98
Abbildung 3.22: Aufnahme von PFCs durch entzündlich stimulierte periphere Blutimmunzellen in vitro. ....	100
Abbildung 3.23: Aufnahme von PFCs durch aus den Entzündungsherden gewonnene Immunzellen in vitro. ....	101

<b>Abbildung 3.24: Aufnahme von PFCs durch entzündlich stimulierte periphere Blutimmunzellen in vivo.</b> .....	102
<b>Abbildung 3.25: Aufnahme von PFCs durch aus dem Entzündungsherd gewonnene Immunzellen in vivo.</b> .....	103
<b>Abbildung 3.26: Aufnahme von PFCs durch LPS-stimulierte Zellen.</b> .....	105
<b>Abbildung 3.27: Aufnahme von PFCs durch periphere Blutimmunzellen bei Inkubation in Kulturüberstand LPS-stimulierter RAW Makrophagen.</b> .....	106
<b>Abbildung 3.28: Aufnahme von PFCs durch CRP-stimulierte Zellen.</b> .....	108
<b>Abbildung 4.1: Hypothese zur schnellen Ausscheidung der PLGA-NPs.</b> .....	114
<b>Abbildung 4.2: Ursprung des <sup>19</sup>F-Signals im Entzündungsherd auf zellulärer Ebene.</b> .....	124

## 9 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1.1: Überblick über verschiedene MR-sensitive Kerne. ....</b>	<b>17</b>
<b>Tabelle 1.2: Gegenüberstellung von PFCs und PLGA-Nanopartikeln.....</b>	<b>19</b>



## 10 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
%w	„weight percent“ – Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
<sup>13</sup> C	13-Kohlenstoff Isotop
<sup>14</sup> N	14-Stickstoff Isotop
<sup>17</sup> O	17-Sauerstoff Isotop
<sup>19</sup> F	19-Fluor Isotop
<sup>1</sup> H	Proton
<sup>23</sup> N	23-Stickstoff Isotop
2D	2-dimensional
<sup>31</sup> P	31-Phosphor Isotop
3D	3-dimensional
A	Ampère
à	zu je
AG	Arbeitsgruppe
APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosintrophosphat
AU	„arbitrary units“ - beliebige Einheiten
B <sub>0</sub>	Stärke des Magnetfeldes [T]
Blocklsg.	Blockierlösung
bNEs	große Perfluorkarbon-Nanoemulsionen
BRD	„bovine respiratory disease“ – enzootische Bronchopneumonie
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CD	„cluster of differentiation“ – <i>internationales System für die Bezeichnung von Differenzierungsantigenen</i>
C-F-Bindung	Kohlenstoff-Fluor Bindung
CHO	„chinese hamster ovarian cells“ - <i>Zelllinie</i> „(confocal) laser scanning microscopy“ – (konfokale) Laserrastermikroskopie, Konfokal-
cLSM / LSM	mikroskopie
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COPD	„chronic obstructive pulmonary disease“ – chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomografie
Cy5 / Cy7	Cyanin 5 (7)
Cy5 PE	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(Cyanine 5)
d	<i>dies</i> - Tag
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol

## Abkürzungsverzeichnis

ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
d. h.	das heißt
DC	„dendritic cell“ – dendritische Zelle
DMEM	„dulbecco’s modified eagle’s medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid – Deoxyribonukleinsäure
DNase	<i>die DNA abbauendes Enzym</i>
EAE	Experimentelle allergische Enzephalomyelitis
ECM	„extracellular matrix“ – extrazelluläre Matrix
ebd.	ebenda
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EHS	Engelbret-Holm-Swarm (EHS) Sarkom
EMA	European Medicines Agency – Europäische Arzneimittel-Agentur
engl.	englisch
EPR	„enhanced permeability and retention“ – erhöhte Permeabilität und Geweberetention
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	<i>et alii</i> – und andere
etc.	usw., und so weiter
F-44E	Bis-perfluorobutylethylen
F4/80	<i>von Makrophagen exprimiertes Antigen</i>
FACS	„fluorescence-activated cell sorting“ – Durchflusszytometrie
FcR	„fragment crystallisable receptor“ – Fc-Rezeptor
FCS	„fetal calf serum“ – fetales Kälberserum
FDA	„united states food and drug administration“ – <i>behördliche Lebensmittelüberwachung und Arzneimittelzulassungsbehörde der vereinigten Staaten von Amerika</i>
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FLASH	„fast low angle shot“ – Gradientenecho mit Kleinwinkel Anregung
FOV	„field of view“ – Sichtfeld
FSC	„forward scatter“ – Vorwärtsstreulicht
g	Gramm
g	Gravitationsfeldstärke; <i>Erdbeschleunigung</i>
G-CSF	„granulocyte-colony stimulating factor“ – Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
ggf.	gegebenenfalls
GM-CSF	„granulocyte macrophage colony-stimulating factor“ – Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GMP	„good manufacturing practice“ – Gute Herstellungspraxis
h	<i>Hora</i> - Stunde
HeNe	Helium-Neon
HEPES	2-(4-(s-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Herst.	Hersteller
HHU	Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
HPPR	„high performance preamplifier“ – Vorverstärker
I	Kernspin
i. p.	intraperitoneal
i. v.	intravenös

## Abkürzungsverzeichnis

IBD	„inflammatory bowel disease“ – chronisch entzündliche Darmerkrankung
IFI	Inflammatorischer Index
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
	„increased pulmonary residual volume“ – Gesteigertes Lungenresidualvolumen
IPRV	aufgrund von Atemgastrapping
J774.2	<i>Name einer Zelllinie</i>
Jhd.	Jahrhundert
Katnr.	Katalognummer
kHz	Kilohertz
l	Liter
l/min	Liter pro Minute
LANUV	Landesamt für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz
Lipoid E80S	<i>Eiphospholipide mit 70% Phosphatidylcholingehalt</i>
LPS	Lipopolysaccharid
M	molar
MACS	„magnetic activated cell sorting“ – magnetisch aktiviertes Fluss-Sortieren
MFI	„mean fluorescence intensity“ – mittlere Fluoreszenzintensität
Mz	Megahertz
MHz/T	Megahertz/Tesla
MI	Myokardinfarkt
min	Minute
Mio.	Million
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
mm <sup>3</sup>	Kubikmillimeter
MR	Magnetresonanz
MRT	Magnetresonanztomografie
ms	Millisekunden
mV	Millivolt
mW	Milliwatt
M <sub>xy</sub>	Transversale Magnetisierung
M <sub>z</sub>	Längsmagnetisierung in Z-Richtung
N	normal
n	Stichprobenumfang
n. Chr.	nach Christus
N <sub>2</sub>	Stickstoff
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NC	Nanokapsel
nCRP	Natives CRP
NET	Neutrophile extrazelluläre Falle
ng	Nanogramm

## Abkürzungsverzeichnis

NIR	Nahinfrarot
NKs	Natürliche Killerzellen
NL	Niederlande
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NMR	„nuclear magnetic resonance“ – Kernspinnresonanz
NO	Stickstoffmonoxid
NP	Nanopartikel
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
p	p-Wert; statistische Signifikanz
PBS	„phosphate buffered saline“ – Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	„polymerase chain reaction“ – Polymerasekettenreaktion
PCS	„photon correlation spectroscopy“ – Photonenkorrelationsspektroskopie
PDI	Polydispersitätsindex
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglycol
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PET	Positronen-Emissions-Tomografie
PFCE	Perfluoro-15-crown-5 ether – Perfluoro-15-kronen-5-ether; Kronenether
PFC-NEs	Perfluorkarbon-Nanoemulsionen
PFCs	Perfluorkarbon-Nanoemulsionen
PFOB	Perfluoroktylbromid
pg	Pikogramm
PGA	Polyglycolsäure
PLA	„polylactic acid“ – Polylactide, Polymilchsäure
PLGA	„poly(lactic-co-glycolic acid)“ – Poly(lactid-co-glycolid), Poly (milch-co-glykolsäure)
PLGA-NC	PLGA-Nanokapseln
PLGA-NP	PLGA-Nanopartikel
PP	Polypropylen
PRINT	Particle replication in nonwetting templates
PS	Polystyrol
PTFE	Polytetrafluorethylen
QC25	<i>Quadraturspule mit einem inneren Durchmesser von 25 mm</i>
qRT-PCR	„quantitative real-time PCR“
QTR	<i>Quadraturspule</i>
rad	Radiant; <i>Winkelmaß</i>
	„rapid acquisition with relaxation enhancement“ – <i>Spin-Echo mit mehreren 180 °-Pulsen, pro Echo eine Rohdatenzeile</i>
RARE	
RAW264.7	<i>Name einer Zelllinie</i>
rel. mol	relative Molekülmasse
RES	retikuloendotheliales System
RF-System	Radiofrequenz-System; <i>Hochfrequenzsystem</i>
RNA	„ribonucleic acid“ – Ribonukleinsäure
ROI	„region of interest“ – Bereich von Interesse
ROS	„reactive oxygens species“ - reaktive Sauerstoffspezies

## Abkürzungsverzeichnis

rpm	„revolutions per minute“ – Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
SD	„standard deviation“ – Standardabweichung
sec	Sekunde
ser.	Serovar
sNEs	kleine Perfluorkarbon-Nanoemulsionen
SNR	„signal-to-noise ratio“ – Signal-Rausch-Verhältnis
s. o.	siehe oben
SPECT	„single photon emission tomography“ – Einzelphotonen-Emissionscomputertomografie
SPIO	„superparamagnetic iron oxide particles“ – superparamagnetische Eisenoxidpartikel
SSC	„side scatter“ - Seitenstreulicht
ssp.	Subspezies
Staph.	Staphylococcus
T	Tesla
T1	Longitudinale Relaxation
T2	Transversale Relaxation
T2*	Effektive T2
T75 / T175	<i>Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 75 bzw. 175 cm<sup>2</sup></i>
TE	„echo time“ - Echozeit
Th1	Typ1 Helferzellen
Th2	Typ2 Helferzellen
THP-1	<i>Name einer Zelllinie</i>
TLR	„toll-like receptor“ – Toll-artiger Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TR	„repetition time“ – Repetitionszeit
U/ml	„international units/ml“ – internationale Einheiten/ml
U-100 /U-40	„100 (40) international units“ – internationale Einheiten
USA	„united states of america“ – Vereinigte Staaten von Amerika
v. Chr.	vor Christus
VEGF	„vascular endothelial growth factor“ – vaskuläre endothelialer Wachstumsfaktor
vs.	<i>versus</i> – gegen(übergestellt)
w/w	Wasser in Wasser
WGA	„wheat germ agglutinin“ – Weizenkeim-Agglutinin
WHO	„world health organization“ – Weltgesundheitsorganisation
X-Verstärker	<i>Breitbandverstärker</i>
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben
ZNS	Zentrales Nervensystem
$\gamma_0$	Gyromagnetisches Verhältnis
$\omega_0$	Larmorfrequenz [MHz]

## 11 Anhang

### 11.1 Eigene Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

**Staal AHJ\***, **Becker K\***, **Tagit O**, **Cortenbach K**, **van Riessen NK**, **Koshkina O**, **Veltien A**, **Bouvain P**, **Heerschap A**, **Flögel U**, **Temme S#**, **Srinivas M#**. *In vivo* clearance of <sup>19</sup>F MRI imaging nanocarriers is strongly influenced by nanoparticle ultrastructure. *Biomaterials* 2020; In Press

#### **In Vorbereitung:**

**Straub T**, **Nave J**, **Bouvain P**, **Kistner J**, **Ding Z**, **Becker K**, **Marzoq A**, **Stepanow S**, **Dasa SSK**, **French BA**, **Hesse J**, **Köhler K**, **Flögel U**, **Schrader J#**, **Temme S#**. Active targeting of epicardium-derived progenitor cells (EPDC).

**Becker K**, **Bouvain P**, **Ding Z**, **Flögel U**, **Temme S**. Impact of sterile and non-sterile inflammation on cellular uptake and biodistribution of PFC nanoemulsions.

\* Haben zu gleichen Teilen zur Publikation beigetragen. # Geteilte Letztautorenschaft.

#### **Kongressbeiträge:**

**Becker K**, **Staal AHJ**, **Bouvain P**, **Srinivas M**, **Flögel U**, **Temme S**. Cellular uptake and biodistribution of nanoemulsions and PLGA nanoparticles containing perfluoro-15-crown-5 ether. 3rd GyMIC Molecular Imaging Symposium / MoBi 2019. Münster, 26.-27. September 2019 (Poster)

#### **Als Kongressbeitrag akzeptiert – zurückgezogen bei Umwandlung in eine online-Konferenz:**

**Becker K**, **Bouvain P**, **Ding Z**, **Flögel U**, **Temme S**. Impact of sterile and non-sterile inflammation on cellular uptake and biodistribution of PFCs. 15<sup>th</sup> European Molecular Imaging Meeting. Thessaloniki, 25.-28. August 2020 (Poster)

**Vorträge:**

**Becker K.** Investigation on the biodistribution and biological half-life as well as cellular uptake of  $^{19}\text{F}$  tracers under inflammatory and non-inflammatory conditions. Neurokolloquium der JLU Gießen. Gießen, 15. Oktober 2019

## 11.2 Danksagung

Zunächst gilt mein Dank Professor Schrader, der es mir freundlicherweise erlaubt hat, in seinem Institut meine Arbeit anzufertigen.

Vielen Dank an Professor Uli Flögel, für diese unfassbare Möglichkeit, viele guten Ideen und Hilfestellungen, die stets zur Verbesserung des Projektes beigetragen haben.

Dank an Professor Christoph Rummel für die Betreuung meiner Doktorarbeit von Seiten des Fachbereiches in Gießen und Professorin Christiane Herden für die Übernahme der Position einer Prüferin.

Ein riesiges Dankeschön an PD Dr. Sebastian Temme, der mir vom ersten bis zum letzten Tag mit großer Expertise und hervorragenden Ideen, mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Besonders wichtig war für mich zudem die produktive Zusammenarbeit mit Xander Staal. Thanks for sharing the project.

Vielen Dank an alle Kollegen aus der Molekularen Kardiologie, das beste Team, das man sich wünschen kann. Für Unterstützung bei Experimenten, zahlreiche Hilfestellungen, das Mäuse-Teilen und die sehr angenehme gemeinsame Zeit.

Ein Dank auch an Dr. Christine Quast für die Geduld und die vielen Freiräume bei der Gestaltung meiner Arbeitszeiten, die ich für die erfolgreiche Fertigstellung dieser Arbeit benötigt habe.

Danke an meine Familie für die Unterstützung. Insbesondere, stellvertretend, an Rebell, Tie, Benni und Jule, die mich so viele Jahre begleitet haben und immer noch begleiten.

Als Tierärztin werde ich hoffentlich nicht gleich für verrückt erklärt, wenn ich auch noch den Mäusen danke, die die Steine sind, aus denen diese Arbeit gebaut wurde.

Faithless is he that says farewell when the road darkens (J. R. R. Tolkien)



### 11.3 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Katrin Becker



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6880-6



9 17 8 3 8 3 5 19 6 8 8 0 6