

Aus dem Institut für molekulare Kardiologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor/Leiter: Univ.-Prof. Dr. J. Schrader

Darstellung pulmonaler Inflammation mittels der Perfluorcarbone  
PFD, PFOB sowie F-44E in der  $^{19}\text{F}$ -MR-Bildgebung:  
Vergleich der Sensitivitäten sowie der kinetischen Profile im Mäusemodell

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Patrick Behm

2016

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Jürgen Schrader

Zweitgutachter: PD Dr. med Ralf Westenfeld

## Zusammenfassung

In vorangegangenen Experimenten wurde anhand des *PFCE* (*Perfluor-15-crown-5 ether*) gezeigt, dass sich emulgierte *Perfluorcarbone* (*PFC*) prinzipiell zur spezifischen Darstellung von *pneumonischen* Prozessen mittels  $^{19}\text{F}$ -MR-Bildgebung eignen. Der dabei verwendete *PFCE* besitzt aufgrund seiner zyklischen Struktur zwar optimale Signaleigenschaften, hat jedoch eine biologische Halbwertszeit von vielen Monaten, so dass eine mögliche zukünftige humane Anwendung sowie eine zeitnahe Wiederverwendung nicht möglich sind. Es gibt jedoch andere *PFC*-Verbindungen die vollständig über die Lunge eliminiert werden.

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob sich tierexperimentell eine durch *LPS*-induzierte Pneumonie nach *intravenöser* Gabe der *Perfluorcarbone F-44E* (*trans-bis-perfluorbutyl ethylene*), *PFOB* (*Perfluoroktylbromid*) und *PFD* (*Perfluordekalin*) mittels  $^{19}\text{F}$ -MR-Bildgebung in einem 9.4 T-Tomographen darstellen lässt. Insbesondere sollen die Sensitivitäten bezüglich der einzelnen *PFC* verglichen werden. Weiterhin wurden die Halbwertszeiten von *F-44E*, *PFOB* und *PFD* im Plasma und Gewebe ermittelt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass im Modell der Maus die *Perfluorcarbone PFOB* und *PFD* nach wenigen Tagen, *F-44E* erst nach wenigen Wochen bei Dosierungen von ca. 5 bis 10 g/kg KG (Körpergewicht) komplett eliminiert werden. Eine Dosisreduktion von *F-44E* um etwa die Hälfte führt zu einer Verkürzung der Gewebahalbwertszeit in der Leber um ca. 70%. Aufgrund ihrer chemischen Struktur führen die verwendeten *PFC* in der konventionellen MR-Bildgebung zu Artefakten. Unter Verwendung der *CSI-Methode* (*CSI: Chemical Shift Imaging*) konnten jedoch mit allen drei Substanzen eine Entzündung der Lunge artefaktfrei mittels MRT dargestellt werden. Die mit Abstand höchsten Sensitivitätswerte zeigten sich für *F-44E*, gefolgt von *PFD* sowie *PFOB*.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass *F-44E* die am besten geeignete Substanz für die Darstellung entzündlicher Prozesse der Lunge darstellt. Es bleibt jedoch zukünftig zu klären, ob sich bei geringeren Dosierungen und damit verbunden kürzeren Halbwertszeiten ebenfalls ausreichende Sensitivitätswerte erreichen lassen. Bei dem bekannten guten Sicherheitsprofil von *PFC* im menschlichen Organismus ist eine humane Anwendung für das *Entzündungsimaging* in Zukunft denkbar.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>a.u.</b>	willkürliche Einheiten	<b>i.v.</b>	intravenös
<b>B<sub>0</sub></b>	Magnetfeldstärke	<b>kg</b>	Kilogramm
<b>CAP</b>	Community-Acquired Pneumonia	<b>KG</b>	Körpergewicht
<b>C</b>	Elementsymbol für Kohlenstoff (Carbon)	<b>KM</b>	Kontrastmittel
<b>°C</b>	Grad Celsius	<b>L<sup>-1</sup></b>	pro Liter
<b>CD-11b</b>	cluster of differentiation-11b	<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>Cl</b>	Chlorid	<b>mg</b>	Milligramm
<b>cm</b>	Zentimeter	<b>MHz</b>	Mega-Hertz
<b>cm<sup>2</sup></b>	Quadratzenimeter	<b>min</b>	Minute
<b>cm<sup>3</sup></b>	Kubikzentimeter	<b>µl</b>	Mikroliter
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid	<b>ml</b>	Milliliter
<b>CSI</b>	Chemical Shift Imaging	<b>mm</b>	Milimeter
<b>CT</b>	Computertomographie	<b>mmHg</b>	Millimeter-Quecksilbersäule
<b>d</b>	Day (Tag)	<b>mmol</b>	Millimol
<b>2D</b>	Zweidimensional	<b>mM</b>	millimolar
<b>3D</b>	Dreidimensional	<b>mol</b>	Einheitszeichen für Stoffmenge
<b>F</b>	Elementsymbol für Fluor	<b>MR-</b>	Magnetresonanz-
<b><sup>19</sup>F</b>	Fluor-Isotop	<b>MRI</b>	Magnetic Resonance Imaging
<b>F-44E</b>	trans-bis-perfluorbutyl ethylen	<b>MRT</b>	Magnetresonanztomographie
<b>FID</b>	free induction decay	<b>ms</b>	Millisekunden
<b>FOV</b>	Field of view	<b>n</b>	Anzahl
<b>FT</b>	Fourier Transformation	<b>N<sub>2</sub></b>	molekularer Stickstoff
<b>g</b>	Gramm	<b>N</b>	Stickstoff
<b>Gauge</b>	u.a. Maßeinheit für Kanülengrößen	<b>Na</b>	Natrium
<b>H</b>	Wasserstoff	<b>n.b.</b>	nicht bestimmt
<b>h</b>	Stunde	<b>nm</b>	Nanometer
<b>HAP</b>	Hospital-Acquired Pneumonia	<b>NMR</b>	Nuclear Magnetic Resonance
<b>Hz</b>	Hertz	<b>NMRI-</b>	ein bestimmter Mäusestamm (NMRI-Maus)
<b>Il</b>	Interleukin	<b>O</b>	Sauerstoff
		<b>O<sub>2</sub></b>	molekularer Sauerstoff

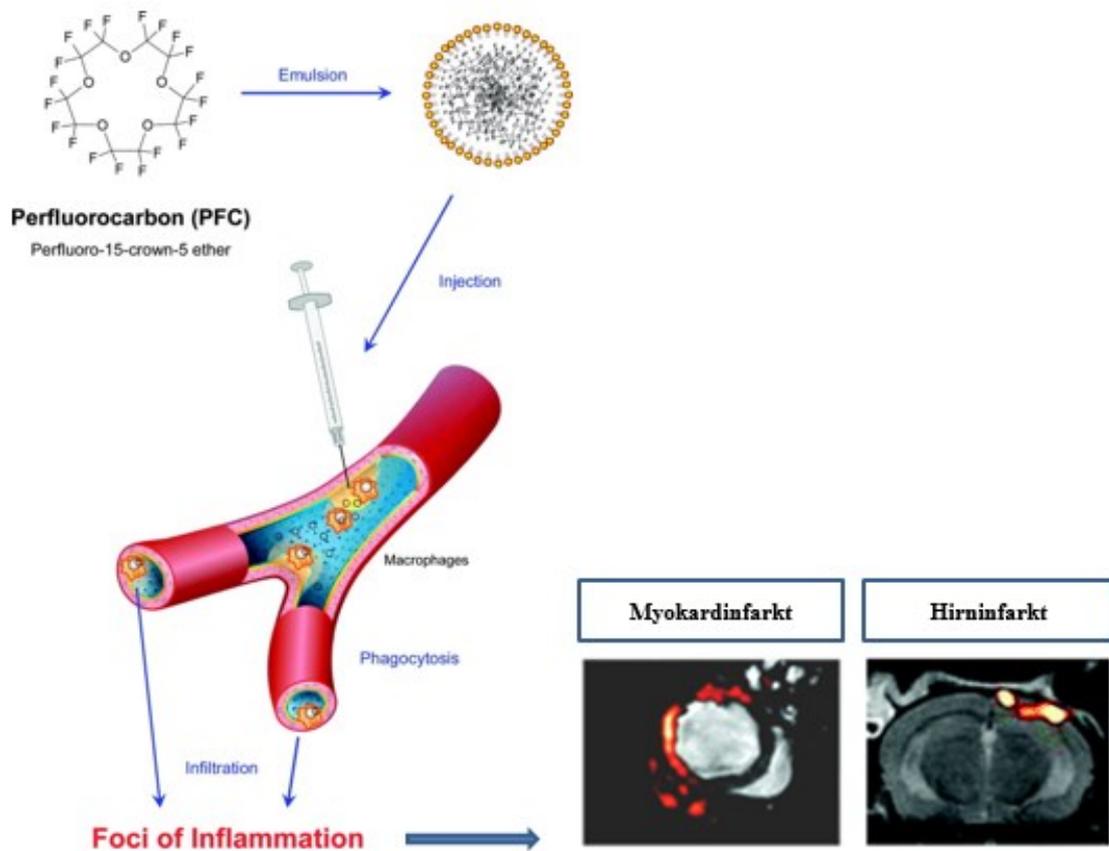
<b>P</b>	Phosphor
<b>PFC</b>	Perfluorcarbone
<b>PFCE</b>	Perfluor-15-kronen- ether
<b>PFD</b>	Perfluordekalin
<b>PFOB</b>	Perfluoroktylbromid
<b>ppm</b>	parts per million
<b>R</b>	Relaxivität
<b>RARE</b>	Rapide Acquisition with Relaxation Enhancement
<b>RES</b>	retikuloendotheliale System
<b>RF-</b>	Radiofrequenz-
<b>ROI</b>	Region Of Interest
<b>SNR</b>	Signal-to-noise ratio
<b>S/N</b>	Signal zu Rausch
<b>SPIO</b>	Superparamagnetic Iron Oxide
<b>T</b>	Tesla
<b>t<sub>1/2</sub></b>	Halbwertszeit
<b>TE</b>	Echozeit
<b>TNF</b>	Tumornekrosefaktor
<b>TLR</b>	Toll-like-Rezeptor
<b>TR</b>	Repetitionszeit (time of repetition)
<b>u.a.</b>	unter anderem
<b>U.S.A.</b>	United States of America
<b>Vol.</b>	Volumen
<b>w</b>	weight (Gewicht)

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Epidemiologische Bedeutung der Pneumonie .....	2
1.2	Diagnostik der Pneumonie .....	3
1.3	Magnetresonanzbildgebung .....	4
1.3.1	Physikalische Grundlagen .....	4
1.3.2	Chemical Shift Imaging (CSI) .....	7
1.3.3	MR-Kontrastmittel .....	8
1.4	Grundlagen der Perfluorcarbone .....	10
1.5	Grundlagen der Pharmakokinetik .....	12
1.6	Fragestellung .....	13
2	Material und Methoden .....	14
2.1	Versuchstiere .....	14
2.2	PFC-Emulsionen .....	14
2.3	Anästhesie und Vorbereitung der Versuchstiere für die MR-Messungen .....	15
2.4	Kinetische Untersuchungen .....	16
2.5	Pneumonieinduktion durch LPS-Instillation .....	17
2.6	Magnetresonanzuntersuchungen .....	18
2.6.1	Hardware .....	18
2.6.2	Protonen-Referenzbilder .....	19
2.6.3	Fluoriscans .....	20
2.6.4	Auswertung mittels CSI-Tool .....	22
2.7	Statistische Auswertung .....	26
3	Ergebnisse .....	27
3.1	Kinetische Untersuchungsreihen .....	27
3.1.1	Auswaschkinetik der F-44E-Emulsion .....	27
3.1.2	Auswaschkinetik der PFD-Emulsion .....	30
3.1.3	Auswaschkinetik der PFOB-Emulsion .....	32
3.2	Pneumoniemodell .....	34
3.2.1	Detektion mittels PFD-Emulsion .....	34
3.2.2	Detektion mittels F-44E-Emulsion .....	39
3.2.3	Detektion mittels PFOB-Emulsion .....	44
4	Diskussion und Schlussfolgerungen .....	48
4.1	Auswaschkinetik der Perfluorcarbone .....	48
4.2	Pneumoniemodell .....	52
5	Quellenverzeichnis .....	55
6	Danksagung .....	60

# 1 Einleitung

In nicht kontrastmittelgestützten MRT-Verfahren ist eine sichere Unterscheidung zwischen entzündlichen Prozessen, wie z.B. der Pneumonie, und anderen Konsolidierungsprozessen kaum bzw. gar nicht möglich. Durch Anwendung von Kontrastmitteln lässt sich die Spezifität des diagnostischen Verfahrens erhöhen. Ein Beispiel stellt die Applikation von *SPIOs* dar, welche als MR-Marker fungieren. Sie weisen eine hohe Affinität gegenüber dem mononukleären System auf und wandern so in das Entzündungsgebiet. Sie führen allerdings zu einer Dephasierung der magnetischen Momente der Protonen und somit zu einem negativen Kontrast [1]. Diese Eigenschaft stellt insbesondere in hypointensen Geweben, wie z.B. im Lungengewebe, ein Problem dar. Flögel et al. konnten bereits in tierexperimentellen Entzündungsmodellen wie Apoplex und Herzinfarkt zeigen, dass sich intravenös applizierter emulgierter *PFCE* zur spezifischen Darstellung von inflammatorischen Prozessen in der MR-Bildgebung (siehe Abbildung 1, nächste Seite) eignet [2]. Die emulgierten *PFC* werden von mononukleären Zellen, primär von *CD-11b*-positiven Zellen, aufgenommen und migrieren anschließend in das Entzündungsgebiet [2]. Mithilfe der MR-Bildgebung lassen sich diese dann im Positivkontrast darstellen [2]. Aufgrund ihres Potentials zur Zytokinliberierung, Sekretion von Sauerstoffradikalen sowie zur Phagozytose und Antigenpräsentation wird Monozyten, die zu den mononukleären Zellen gehören, eine wichtige Funktion im Kontext akuter pulmonaler Inflammation zugeschrieben [3,4]. In vorangegangenen Experimenten wurde mithilfe des *PFCE* gezeigt, dass sich emulgierte *PFC* zur spezifischen Darstellung von inflammatorischen pulmonalen Prozessen eignen [5]. Der dabei verwendete *PFCE* besitzt zwar optimale Signaleigenschaften, lagert sich jedoch längerfristig im Körper ab, so dass eine mögliche Anwendung im humanen Modell undenkbar erscheint. Von anderen *PFC* ist jedoch eine komplette pulmonale Elimination aus dem Organismus bekannt [6].



**Abb. 1 Darstellung inflammatorischer Prozesse mithilfe emulgierter PFC mittels MR-Bildgebung.**

Intravenös applizierte *PFC* werden von Makrophagen aufgenommen und wandern mit diesen in das Entzündungsgebiet (links). Flögel et al. konnten zeigen, dass sich diese eignen, mittels MR-Bildgebung ein Myokardinfarkt bzw. Hirninfarkt darzustellen (rechts). Jeweils dargestellt ist ein *Overlay*-Bild eines Protonenscans und des korrespondierenden Fluorscans, wobei das Fluorsignal rot kodiert ist. Es ist eine deutliche Akkumulation der *PFC* im Myokardinfarkt- bzw. Hirninfarkt-Gebiet zu erkennen. Abbildung modifiziert nach Flögel et al. [2].

## 1.1 Epidemiologische Bedeutung der Pneumonie

Die ambulant erworbene Pneumonie (*CAP: Community-Acquired Pneumonia*) gilt als die häufigste registrierte Infektionserkrankung weltweit [7]. Die Gesamthäufigkeit der *CAP* wird in Deutschland auf etwa 400.000 bis 600.000 Fälle pro Jahr geschätzt [8]. Bei stationär behandelten *CAP*-Fällen beträgt die Letalität 13.7 bis 14.4% mit einer deutlichen Altersabhängigkeit [9].

Wie aus der NIDEP 1-Studie hervorgeht, sind untere Atemwegsinfektionen, wozu die nosokomiale Pneumonie (*HAP: Hospital-Acquired Pneumonia*) gehört, die zweithäufigste Hospitalinfektion in den westlichen Industrieländern. Als wichtigster Risikofaktor für eine *HAP* wird die maschinelle Beatmung mit endotrachealer Intubation angesehen. Man geht von mindestens 40.000 nosokomialen Pneumonien pro Jahr in Deutschland aus [10]. Verlässliche Daten zur Letalität der *HAP* sind schwer zu ermitteln, da sie zum Teil durch viele Faktoren, wie z.B. der vorherrschenden Grunderkrankung, mit beeinflusst wird [10]. Diese epidemiologischen Daten betonen die Notwendigkeit der Forschung an diagnostischen Verfahren zur frühen und sicheren Erkennung pneumonischer Prozesse.

## **1.2 Diagnostik der Pneumonie**

Laut der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie soll bei Vorliegen eines klinischen Verdachts auf Pneumonie eine Röntgen-Thoraxaufnahme durchgeführt werden. Klinische Zeichen sind z.B. Tachypnoe, Dyspnoe, produktiver Husten, erhöhte Infektparameter sowie Rasselgeräusche in der Auskultation. Da die diagnostische Aussagekraft der klinisch erhobenen Befunde nur sehr begrenzt ist, wird in den Leitlinien zur sicheren Diagnostik ein Infiltrat im Röntgen-Bild gefordert [11,12]. Jedoch ist die Sensitivität und Spezifität des Infiltratnachweises ebenfalls begrenzt [13,14]. Eine CT-Diagnostik sollte bei unklaren Befunden bzw. bei therapierefraktären Verläufen erwogen werden. Allerdings differenzieren sowohl die CT-Bildgebung sowie das konventionelle Röntgenbild nicht sicher zwischen einem pneumonischen Infiltrat und anderen Ursachen einer Konsolidierung [15].

Das in dieser Arbeit verwendete diagnostische Verfahren basiert hingegen auf der MR-Bildgebung. Im Folgenden werden die Grundlagen dieser Bildgebungstechnik erläutert.

## 1.3 Magnetresonanzbildgebung

### 1.3.1 Physikalische Grundlagen

Etwa 2/3 der natürlich vorkommenden Isotope besitzen einen Atomkern, der einen Kernspin aufweist [1]. Der positiv geladene Atomkern dreht sich somit um sich selbst wie ein Kreisel, was aufgrund seiner Ladung zu einem magnetischen Dipolmoment  $\mu$  führt. Am einfachsten aufgebaut ist der Kern des Wasserstoffatoms. Es ist das am häufigsten vertretene Isotop in dem zu etwa 2/3 aus Wasser bestehenden menschlichen Körper. Das klinische *MRI (Magnetic Resonance Imaging)* nutzt daher primär Wasserstoffatome [1]. Weitere in der MRT genutzte Kerne sind die des Kohlenstoffs, des Fluors, des Natriums sowie des Phosphors. Durch Anlegen eines externen magnetischen Feldes kommt es zur Ausrichtung der Dipolmomente. Das Protonendipolmoment kann nur zwei Ausrichtungen einnehmen: der Winkel zwischen dem Dipolmomentvektor sowie der Magnetfeldachse beträgt entweder  $54.7^\circ$  oder  $123.3^\circ$  [1]. Das äußere Magnetfeld führt außerdem zur Präzessionsbewegung der Dipole um die Feldachse, wobei die Präzessionsfrequenz durch die Lamorgleichung bestimmt wird [16]:

$$\omega_0 = \gamma \times B_0$$

Dabei sind:

$\omega_0$  die Lamorfrequenz in Megahertz [MHz],

$\gamma$  das gyromagnetische Verhältnis (kernspezifische Konstante) [MHz/T],

$B_0$  die Stärke des Magnetfeldes in Tesla [T].

Wie bereits erwähnt kann sich das Dipolmoment im zeitlichen Mittel auf zwei verschiedene Arten ausrichten (parallel bzw. *Spin up* oder antiparallel bzw. *Spin down* zu  $B_0$ ). In einer Gruppe von Dipolmomenten überwiegt aufgrund eines niedrigen Energieniveaus minimal die *Spin up*-Ausrichtung. Dies führt zur Ausbildung einer geringen Nettomagnetisierung  $M_z$  in Richtung des Magnetfeldes [1]. Durch einen extern eingestrahlten Radiofrequenz(RF)-Puls (wobei die Frequenz des Impulses exakt der Lamorfrequenz entsprechen muss) kann das *Spin-System* aus der z-Richtung herausgekippt werden.

Bei richtiger Dauer und Stärke des RF-Pulses wird die Magnetisierung  $M_z$  in die  $xy$ -Ebene geklappt. In einer Empfangsspule wird hierdurch eine Wechselspannung induziert und ein elektrisches Signal abgegriffen. Die Signalstärke ist proportional zur Protonendichte und damit abhängig von der Zusammensetzung des untersuchten Gewebes [1]. Nach Abschalten des RF-Pulses kehrt durch longitudinale Relaxation das System in seine Gleichgewichtslage zurück. Die longitudinale Relaxation beschreibt das Zurückklappen der transversalen Magnetisierung in die  $z$ -Richtung. Die Zeit, nach der ca. 63% der Magnetisierung in  $z$ -Richtung wiederhergestellt ist, wird als  $T_1$ -Relaxationszeit bezeichnet. Unmittelbar nach der Anregung durch den RF-Puls präzedieren die *Spins* synchron in der  $xy$ -Ebene (Phasenkohärenz). Die sogenannte transversale Relaxation führt zum Verlust dieser Phasenkohärenz. Zum einen wird dies durch magnetische Wechselwirkungen der *Spins* untereinander hervorgerufen. Die dazugehörige Zeitkonstante lautet  $T_2$ . Zum anderen führen Inhomogenitäten des äußeren Magnetfeldes zur weiteren Dephasierung. Durch diese zusätzlichen Prozesse wird der Dephasierungsprozess nicht durch die  $T_2$ -Zeit, sondern die kürzere Zeitkonstante  $T_2^*$  bestimmt. Infolge der transversalen Relaxation wird nach dem Puls ein gedämpftes Signal detektiert ( $FID = free\ induction\ decay$ ). Für eine erneute Anregung ist ausschließlich der durch longitudinale Relaxation wieder in die  $z$ -Richtung zurückgeklappte Anteil von Bedeutung. Die Repetitionszeit beschreibt den zeitlichen Abstand zwischen zwei RF-Pulsen. Eine gezielte Wahl der Repetitionszeit ermöglicht es, Gewebe mit unterschiedlichen  $T_1$ -Zeiten voneinander abzugrenzen ( $T_1$ -Gewichtung). Möchte man hingegen Gewebe aufgrund unterschiedlicher  $T_2$ -Zeiten kontrastieren, kommen sogenannte *Spinecho*-Experimente zum Einsatz ( $T_2$ -Gewichtung) [1].

Um die erzeugten Signale zur bildmorphologischen Darstellung nutzen zu können, sind Techniken zur Ortskodierung notwendig. Grundlage hierfür sind überlagerte Gradientenfelder, so dass die Magnetfeldstärke ortsabhängig wird [1]. Zur Erzeugung von zweidimensionalen Schnittbildern (Tomographie) bedient man sich der Schichtselektion, der Frequenzkodierung sowie der Phasenkodierung. Ein in  $z$ -Richtung erzeugter Magnetfeldgradient bewirkt eine lineare Änderung von  $B_0$  in  $z$ -Richtung. Mit einem Anregungsimpuls einer bestimmten Frequenzbreite wird somit nicht die gesamte Probe, sondern eine definierte Schicht angeregt. Diese muss nun bezüglich ihrer zwei Dimensionen weiter aufgeschlüsselt werden. Bei der Frequenzkodierung nutzt man den durch den Gradienten erzeugten ortsabhängigen Unterschied der Larmorfrequenz während

der Detektion aus. Es wird also nicht eine einzige Frequenz, sondern ein ganzes Frequenzspektrum empfangen. Den unterschiedlichen Frequenzen entsprechen unterschiedliche Orte. Durch eine Fourier-Transformation (FT) lässt sich dann dem jeweiligen Ort entlang des Gradienten (z.B. x) eine Signalintensität zuordnen [1]. Um die bei einer 2-dimensionalen Bildgebung erforderliche zweite Richtung (y) ebenfalls aufzulösen, kommt die oben erwähnte Phasenkodierung zum Einsatz. Hierbei wird zwischen Anregung und Datenakquisition ein Gradient in y-Richtung eingeschaltet, der eine Phasenverschiebung der *Spins* bewirkt. Nach Abschalten des Gradienten präzedieren die *Spins* wieder in der Ausgangsgeschwindigkeit, jedoch verbleibt die Phasendifferenz. Hierdurch kann das Signal an jeder y-Position innerhalb der angeregten Schicht durch die individuelle Phase mithilfe der FT identifiziert werden. Bei der dreidimensionalen MR-Bildgebung wird nach der Objektorregung die Ortsinformation in zwei Richtungen durch die Phase sowie senkrecht dazu durch die Frequenz kodiert.

Im Folgenden sollen einige häufig verwendete Fachtermini der MR-Bildgebung erläutert werden:

- Signal-zu-Rausch-Verhältnis ( $SNR = \text{signal-to-noise ratio}$ ):

Sowohl Faktoren, die vom zu untersuchenden Objekt ausgehen (z.B. Atembewegungen bei lebenden Objekten), wie auch das natürlich entstehende statistische Rauschen können zum sogenannten Bildrauschen führen. Ziel sollte ein möglichst hohes SNR sein; das durch folgende Formel beschrieben wird:

$$SNR = \frac{A_{SIGNAL}}{\sigma_{Rauschen}}$$

wobei  $A_{SIGNAL}$  die Nutzsinalamplitude sowie  $\sigma_{Rauschen}$  die Rausch-Standardabweichung beschreiben.

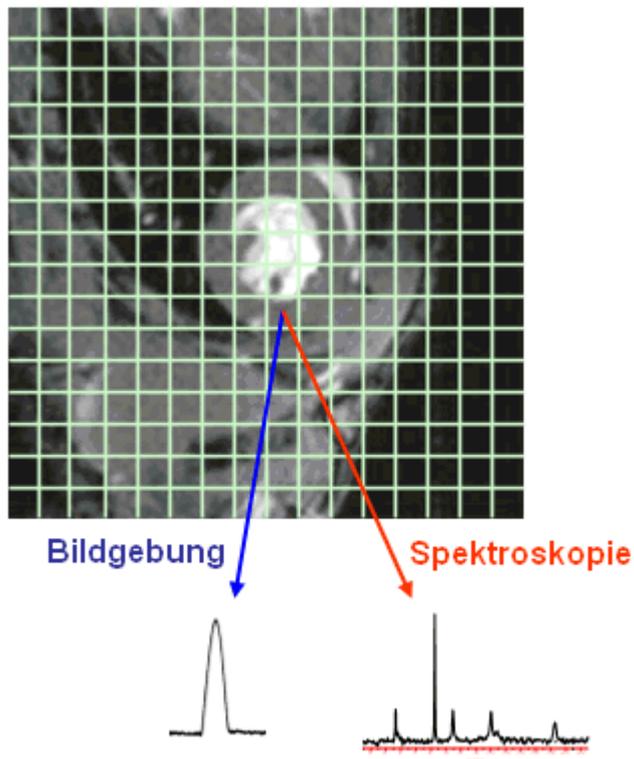
- *Voxel*: Durch die Dicke einer Schicht enthält jedes *Pixel* in der Matrix auch eine Volumeninformation und wird daher *Voxel* genannt.

- Bandbreite: Das Spektrum, welches bei der Frequenzkodierung erfasst wird, wird durch die Bandbreite beschrieben.

### 1.3.2 Chemical Shift Imaging (CSI)

Als *chemical shift* (chemische Verschiebung) wird das Phänomen bezeichnet, dass Isotope mit magnetischem Dipolmoment im externen Magnetfeld nicht nur eine definierte, sondern ein ganzes Spektrum von Resonanzfrequenzen aufweisen [17]. Grund für die unterschiedlichen Resonanzfrequenzen ist die jeweilige chemische Umgebung der Atomkerne. Im Wasser besitzt z.B. der Wasserstoffkern eine andere chemische Umgebung als in aliphatischen Verbindungen. Der *chemical shift* wird in ppm (*parts per million*) angegeben. Diese Größe beschreibt den relativen Abstand der Resonanzfrequenz der Probe von einem willkürlich definierten Referenzstandard. Die absolute Verschiebung ist hingegen von der externen Magnetfeldstärke abhängig [17]. Außerdem ist die maximale Breite des Frequenzbereichs abhängig vom jeweiligen Isotop: Beim  $^{19}\text{F}$ -Isotop umfasst sie einen Bereich von ca. 300 ppm, beim  $^{31}\text{P}$ -Isotop von ca. 320 ppm und für  $^1\text{H}$  einen Bereich von ca. 12 ppm [18].

Bei der *CSI*-Methode wird jedem Pixel ein *NMR*-Spektrum zugeordnet (siehe Abbildung 2, nächste Seite). Die in der Empfangsspule detektierte Frequenzinformation dient bei der Spektroskopie, entgegen dem Prinzip der konventionellen MR-Bildgebung, nicht der Ortskodierung. Sie enthält vielmehr die Information der chemischen Verschiebung der angeregten Kerne. Zur Ortskodierung bei der *2D-CSI-Methode* dienen daher ausschließlich Phasenkodierschritte, verbunden mit einer hohen Anzahl an benötigten Messzyklen. Daher wird bei dieser Methode, verglichen mit den herkömmlichen MR-Verfahren, meist eine kleinere Matrixgröße gewählt. Durch weitere Prozessierung (siehe Kapitel 2.6.4) kann dann ein zweidimensionales Bild generiert werden.



**Abb. 2 Prinzip der CSI-Methode**

Dargestellt ist ein MR-Protonenscan durch ein Mäuseherz. Im vorliegenden Beispiel besteht der Protonenscan aus  $256 \times 256$  (=65536) Pixeln. Das darauf gelegte hellgrüne Raster teilt den Scan in 256 Pixel. Für jedes dieser Pixel wird bei der CSI-Methode ein ganzes Spektrum (rechts unten in der Abbildung), im Gegensatz zum einheitlichen Signal in der konventionellen Bildgebung (links unten), detektiert.

### 1.3.3 MR-Kontrastmittel

Die in dieser Arbeit verwendeten Perfluorcarbone sind keine MR-Kontrastmittel (KM) im engeren Sinne. Da sie aber mit auf MR-Kontrastmittel basierenden Verfahren konkurrieren, soll im Folgenden kurz auf deren Wirkmechanismen eingegangen werden.

Der Bildkontrast in der MR-Bildgebung wird durch die Signalintensitätsdifferenz zweier Gewebe bestimmt. MR-Kontrastmittel erhöhen durch Veränderung der Gewebeeigenschaften den Kontrast. Hierbei kommen folgende Mechanismen in Frage [16]:

- Verschiebung der Larmorfrequenz bzw. Resonanzfrequenz
- Suszeptibilitätseffekte
- Veränderung der Protonendichte

➤ Veränderung der Relaxationszeiten

**Verschiebung der Larmorfrequenz bzw. Resonanzfrequenz**

Manche Kontrastmittel führen zu einer Verschiebung der Resonanzfrequenz und folglich zu einer Abnahme des Protonensignals.

**Suszeptibilitätseffekte**

Bedingt durch lokale Inhomogenitäten des Magnetfeldes kommt es zu einer Verstärkung des  $T_2^*$ -Effektes (siehe Kapitel 1.3.1) und damit zu einer Signalabnahme. KM, die über diesen Effekt wirken, sind daher negative KM. Als Beispiel sind die sogenannten *SPIOs* (superparamagnetischen Eisenoxid-Partikel) zu nennen, welche auch zu einer Änderung der Relaxations-Eigenschaften führen.

**Veränderung der Protonendichte**

Kontrastmittel können durch Verdrängung des vorliegenden Wassers die Protonendichte verändern. Als Beispiel ist Bariumsulfat zu nennen.

**Veränderung der Relaxationszeiten**

Die meisten MR-Kontrastmittel führen zu einer Beeinflussung der Relaxationszeiten ( $T_1$  bzw.  $T_2$ ). Je nach dominierendem Effekt unterscheidet man positive von negativen Kontrastmitteln. Bei den positiven KM überwiegt die Verkürzung der  $T_1$ -Relaxationszeit und es resultiert eine Signalzunahme in  $T_1$ -gewichteten Sequenzen. Hingegen überwiegt bei den negativen KM die Verkürzung der  $T_2$ -Relaxationszeit. Durch eine raschere Dephasierung und die damit verbundene Phaseninkohärenz führen diese KM, insbesondere in  $T_2$  gewichteten Sequenzen, zu einer Abnahme des MR-Signals. Die Relaxivität  $R$  beschreibt das Ausmaß der Relaxationsverkürzung, das durch ein KM hervorgerufen wird. Je höher der  $R$ -Wert ist, desto mehr tritt das KM mit dem umliegenden Gewebe in Wechselwirkung. Prinzipiell besteht eine Beziehung zwischen dem erzielten Effekt sowie der eingesetzten KM-Konzentration [16]:

$$\text{KM-Effekt} \sim \text{KM-Konzentration} \times \text{Relaxivität}$$

Dabei hängt die Konzentration am Wirkort von etlichen Faktoren ab. Neben der Ausgangskonzentration wird sie wesentlich von der Applikationsart sowie der

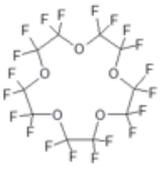
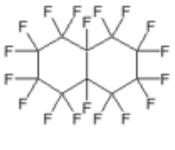
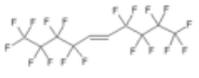
Bioverteilung bestimmt. Einschränkend zur oben aufgeführten Gleichung sind die Dosis-Wirkungskurven bei den MR-Kontrastmitteln nicht linear, sondern weisen ein Maximum bei optimaler KM-Konzentration auf. Darüber hinaus überwiegt bei niedrigen Konzentrationen der Einfluss auf die  $T_1$ -Relaxationszeit und bei hohen Konzentrationen der auf die  $T_2$ -Relaxationszeit [16].

## 1.4 Grundlagen der Perfluorcarbone

*Perfluorcarbone (PFC)* sind synthetische Verbindungen, die ausschließlich aus Kohlenstoff, Fluor und ggfs. einem weiteren Element bestehen, wie z.B. Brom beim *Perfluorocetyl bromid (PFOB)* [19]. Die C-F-Bindungen innerhalb der Perfluorcarbone sind durch sehr starke Bindungsenergien gekennzeichnet, wodurch Perfluorcarbone inert sind und eine hohe thermische sowie chemische Stabilität zeigen [19]. PFC sind wasserunlöslich und weisen eine hohe Löslichkeit für Gase ( $O_2$ ,  $CO_2$ ,  $N_2$  etc.) auf [19]. Sie können zyklisch sowie linear aufgebaut sein. Beispielsweise ist der *PFCE (Perfluoro-15-kronen-5-ether)* zyklisch aufgebaut, und dessen F-Atome besitzen allesamt die gleiche chemische und damit magnetische Umgebung. Folglich besitzen alle Fluoratome in der Magnetresonanz-Bildgebung die gleiche Resonanzfrequenz, und es resultiert ein einzelnes Signal (siehe Kapitel 2.6.4). Tabelle 1 (siehe nächste Seite) gibt einen Überblick über chemische Eckdaten der in dieser Arbeit verwendeten Perfluorcarbone. Allerdings lagert sich der Perfluoro-15-kronen-5-ether im Gegensatz zu anderen *PFC* längerfristig im retikuloendothelialen System (RES) ab [20]. Die Elimination von Perfluorcarbonen erfolgt fast ausschließlich über die Lunge [21-24]. Dabei gilt: die pulmonale Elimination ist proportional zum Dampfdruck und umgekehrt proportional zum Molekulargewicht [25]. Reine *PFC*-Flüssigkeiten sind mit Blut nicht mischbar, zur *intravenösen* Anwendung müssen sie daher in emulgierter Form vorliegen [19]. Nicht emulgierte *PFC* sind bei *intravasaler* Anwendung hochtoxisch. Möglicherweise kommt es hierbei zum Verstopfen der Kapillaren, zu Gasembolien und/oder zu induzierten intravasalen *Clotting-Phänomenen* [26]. In der medizinischen Forschung wurde bzw. wird das Einsatzpotential von *PFC* in der Glaskörper- bzw. Netzhautchirurgie, als intravenöse Sauerstoffträger, in der Flüssigkeitsbeatmung sowie als CT- bzw. MR-Kontrastmittel untersucht [27].

In der Magnetresonanzbildgebung können *PFC* durch Anregung der  $^{19}\text{F}$ -Kerne zu einem positiven Kontrast führen. Aufgrund eines praktisch fehlenden  $^{19}\text{F}$ -Hintergrundes im Organismus weist diese Methode eine hohe Spezifität auf.

Im Rahmen von Arzneimittelzulassungsverfahren der auf emulgierten Perfluorcarbonen basierenden Blutersatzstoffe *Oxyfluor<sup>TM</sup>* (Wirkstoff: *Perfluordichlorooctan*) und *Oxygent<sup>TM</sup>* (Wirkstoffe: *Perfluorooctylbromid* und *Perfluorodecylbromid*) ist ein umfassendes Sicherheitsprofil erstellt worden. Zumindest wurden bisher für die verwendeten Dosierungen (unter 2g/kg KG) keine längerfristigen bzw. schwerwiegenden Nebenwirkungen beschrieben [19]. Insbesondere gab es keine Hinweise auf hämodynamische Effekte sowie *renale*, *hepatische* oder *pulmonale* Organdysfunktionen [19]. Ein zum Teil beobachteter Körpertemperaturanstieg sowie aufgetretene grippeähnliche Symptome werden auf die Stimulation des Immunsystems zurückgeführt [19]. Darüber hinaus wurde je nach Dosierung ein milder transientser Thrombozytenabfall beschrieben [19].

	<b>PFCE</b> (Perfluor-15-kronen- ether)	<b>PFD</b> (Perfluordekalin)	<b>PFOB</b> (Perfluoroktylbromid)	<b>F-44E</b> (trans-bis-perfluorbutyl ethylen)
<b>Struktur- sowie Summenformel</b>	 <b>C<sub>10</sub>F<sub>20</sub>O<sub>5</sub></b>	 <b>C<sub>8</sub>F<sub>17</sub>Br</b>	 <b>C<sub>10</sub>F<sub>18</sub></b>	 <b>C<sub>10</sub>H<sub>2</sub>F<sub>18</sub></b>
<b>Siedepunkt (°C)</b>	<b>145</b>	<b>143</b>	<b>142</b>	<b>150</b>
<b>Molekulare Masse (g/mol)</b>	<b>580.072</b>	<b>498.962</b>	<b>462.078</b>	<b>464.094</b>
<b>Dampfdruck bei 37 °C (mmHg)</b>	<b>13.2</b>	<b>10.5</b>	<b>14.0</b>	<b>12.8</b>

**Tabelle 1: Chemische Eckdaten der Perfluorcarbone**

Die Tabelle stellt eine Übersicht über einige chemische Eckdaten [25] der in dieser Arbeit verwendeten *Perfluorcarbone* dar. Neben der Struktur bzw. Summenformel, sind der Siedepunkt (in °C), die Molekulare Masse (in g/mol) sowie der Dampfdruck (in mmHg bei 37°C) aufgeführt.

## 1.5 Grundlagen der Pharmakokinetik

Die Pharmakokinetik beschäftigt sich mit dem zeitlichen Konzentrationsverlauf eines Arzneimittels oder dessen Metaboliten in verschiedenen Organsystemen. Die Pharmakinetik schlüsselt sich in verschiedene Teilprozesse auf. Nach dem ADME Prinzip wird die Pharmakokinetik in Absorption, Distribution (Verteilung), Metabolismus und Exkretion eingeteilt [28, 29]: Unter Absorption versteht man die Aufnahme des Arzneistoffes vom Ort der Applikation in das Blut und sie wird durch die Resorptionsgeschwindigkeit bestimmt. Bei *intravasaler* Applikation spielt diese Größe folglich keine Rolle, die gesamte Arzneistoffmenge steht dem Organismus zur Verfügung und unterliegt nicht dem *hepatischen* First-Pass-Metabolismus. Nach der Aufnahme verteilt sich der Arzneistoff in Abhängigkeit von seinen Eigenschaften (Molekülgröße, Lipophilie, Ionisationsgrad etc.) in die einzelnen Kompartimente (Distribution). Man unterscheidet grundsätzlich drei verschiedene Kompartimente: den *intravasalen*, den *interstitiellen* sowie den *intrazellulären* Raum [28]. Bei vielen Arzneistoffen findet eine Proteinbindung, z.B. an Plasmaproteine, statt. Zwischen dem freien und gebundenen Anteil stellt sich ein Gleichgewicht ein, welches die weitere Kinetik mitbestimmt. Hydrophile Substanzen verteilen sich primär im Extrazellulärraum und werden *renal* eliminiert. Hingegen verteilen sich rein lipophile Substanzen in den lipophilen Räumen des Körpers wie den Fettzellen oder Zellmembranen. Amphiphile Substanzen reichern sich vor allem in Zellmembranen an. Darüberhinaus beeinflusst die Gewebedurchblutung die Verteilung des Arzneimittels. Zunächst kommt es zu einer Anreicherung in gut durchbluteten Organsystemen, dem folgt eine Umverteilung in die weniger durchbluteten Organe [28].

Die Elimination des Arzneistoffes findet durch Biotransformation (Metabolismus) und/oder Exkretion über die darauf spezialisierten Organe (v.a. Niere, Leber und Lunge) statt. Das Resultat der Biotransformation, für welche die Leber als Hauptort fungiert, ist meist der Verlust lipophiler Eigenschaften einer Substanz. Hierdurch wird die Ausscheidung der Substanz erleichtert. Man unterscheidet bei der Biotransformation zwischen Phase-I- und Phase-II-Reaktionen [28]. In der Phase I, auch als Funktionalisierungsreaktion bezeichnet, werden z.B. durch Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse funktionelle Gruppen in das Molekül gebracht. In Phase-II-Reaktionen werden meist nach durchgemachter Phase-I-Reaktion polare Gruppen an das Molekül gebracht (Konjugationsreaktion) und somit die *renale* bzw. *biliäre* Ausscheidung verbessert [28].

Im humanen Organismus kann als Faustregel gelten: Moleküle mit einer Molekülmasse von  $<300 \text{ g/mol}$  werden primär *renal* eliminiert, wohingegen Moleküle mit Molekülmassen von  $>500 \text{ g/mol}$  v.a. *biliär* ausgeschieden werden [28].

### **Pharmakokintischer Parameter: Halbwertszeit**

Die biologische Halbwertszeit bezeichnet die Zeit, in der die Menge einer in einem Organismus aufgenommenen Substanz auf die Hälfte abgefallen ist [30;31]. Die meisten Substanzen verhalten sich nach einer Kinetik erster Ordnung: die Geschwindigkeit der Elimination ist proportional zur Konzentration. Hiervon abzugrenzen ist die Kinetik nullter Ordnung, bei der die pro Zeiteinheit eliminierte Menge konstant ist. Als ein klassischer Vertreter dieser Eliminationsart ist Ethanol zu nennen.

Von der biologischen Halbwertszeit sind organspezifische Halbwertszeiten zu unterscheiden. Durch Umverteilungsprozesse kann in der Initialphase die Substanz-Konzentration in bestimmten Organen zunächst zunehmen. In dieser Arbeit wurden die organspezifischen Halbwertszeiten von der maximal erreichten Substanz-Konzentration aus berechnet.

## **1.6 Fragestellung**

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob sich tierexperimentell eine durch LPS-induzierte Pneumonie nach intravenöser Gabe der *Perfluorcarbone (PFC) F-44E, PFOB* und *PFD* mittels  $^{19}\text{F}$ -MR-Bildgebung in einem 9.4 T-Tomographen darstellen lässt. Insbesondere sollen die Sensitivitäten bezüglich der einzelnen Substanzen verglichen werden. Weiterhin wurden die Halbwertszeiten von *F-44E, PFOB* und *PFD* im Plasma und Gewebe ermittelt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden 8 bis 12 Wochen alte *NMRI-Mäuse*, bereitgestellt durch die Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, mit einem Körpergewicht von 20-30 g verwendet. Die Aktenzeichen hierzu lauten 8.87-50.10.34.08.296 sowie 50.05-230-77/06. Voraussetzung für die Durchführung der Tierversuche war eine erfolgreiche Teilnahme an einem Tierversuchskurs (Prüfung abgelegt am 09.03.2007 an der Tierversuchsanlage Uniklinikum Düsseldorf, Prüfer: Dr. A. Treiber).

### 2.2 PFC-Emulsionen

Tabelle 2 (siehe nächste Seite) gibt einen Überblick über die verwendeten Perfluorcarbon-Emulsionen, die in Kooperation mit dem Institut Charles Sadron der Universität Straßburg (Frankreich) hergestellt wurden. Die Emulsionen wurden mittels Hochdruck-Homogenisator (Microfluidizer M-110, Microfluidics Corp., Newton, Massachusetts, USA) präpariert und anschließend sterilisiert. Bei *PFD* (Novaliq, Heidelberg, Germany) sowie *PFOB* (AtoChem, Puteaux, Frankreich) kam ein isotonischer Hepes-Puffer (10 mM Hepes 2.5 % Glycerol (*w/w*) pH 7.4; Hepes = N 2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure) und bei *F-44E* (AtoChem, Puteaux, Frankreich) ein Phosphatpuffer ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ : 0.052 g;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 0.355 g; NaCl: 0.25 g) zum Einsatz. Als Emulgatoren wurden Lipoid S75 (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Deutschland) bzw. EYP (Lipoid GmbH) verwendet (siehe Tabelle 2). Lipoid S75 ist ein Sojalecithin und besteht primär aus den Phosphoglyceriden, Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin. Diese Phospholipide bestehen jeweils aus einem hydrophilen Kopf und zwei hydrophoben Kohlenwasserstoffketten. Hierdurch besitzen sie Grenzflächenaktivität und können als Emulgatoren fungieren.

	<b>PFOB 20 %</b>	<b>PFOB 40 %</b>	<b>PFD 20 %</b>	<b>PFD 40 %</b>	<b>F-44E 51.5 %</b>
<b>PFC-Fraktion (% w/w)</b>	20	40	20	40	51.5
<b>Emulgator</b>	Lipoid S75	Lipoid S75	Lipoid S75	Lipoid S75	EYP
<b>Pufferfraktion (% w/w)</b>	77.6	57.6	76	56	46
<b>mittlere Teilchengröße (nm)</b>	211	240	235	279	n.b.
<b>Dichte (g/cm<sup>3</sup>)</b>	1.14	1.28	1.16	1.3	1.29

**Tabelle 2: Überblick über die Zusammensetzung der PFC-Emulsionen**

Die Tabelle gibt einen Überblick über die Zusammensetzung der verwendeten *PFC-Emulsionen*. Neben der *PFC-Fraktion* (in % w/w), sind die *Puffer-Fraktion* (in % w/w), die *mittlere Teilchengröße* (in nm), die *Dichte der Teilchen* (in g/cm<sup>3</sup>) sowie die *Emulgatoren* aufgeführt (n.b. steht für nicht bestimmt).

### **2.3 Anästhesie und Vorbereitung der Versuchstiere für die MR-Messungen**

Die MR-Messungen wurden unter Narkose durchgeführt, wozu Isofluran als Inhalationsanästhetikum verwendet wurde, das eine gute hypnotische und muskelrelaxierende Wirkung besitzt. Zur Narkoseeinleitung erhielt die Maus über eine Atemmaske ein durch einen Verdampfer mit 2.5 Vol. % Isofluran angereichertes Stickstoff/Sauerstoff-Gasgemisch im Verhältnis 2:1. Um einem Körpertemperaturabfall entgegenzuwirken, wurde die Maus durch eine Rotlichtlampe erwärmt. Die Narkosetiefe wurde durch die Abschwächung der Reflexe abgeschätzt, und die Aufrechterhaltung der

Narkose erfolgte mit 1.5 Vol. % Isofluran (Stickstoff/Sauerstoff-Gasgemisch im Verhältnis 3:1). Dann wurde die Maus mittels Klebestreifen entsprechend im Probenkopf platziert, dass der jeweils zu untersuchende Körperabschnitt möglichst im Mittelpunkt des Sichtfeldes (*FOV=field of view*) lag. Eine im Bereich des Thorax platzierte Drucksonde ermöglichte sowohl die Überwachung der Atemfrequenz während des Experiments als auch atemgetriggerte Messungen. Anschließend wurde der Probenkopf mit der Maus vertikal in den Magneten eingeführt. Für konstante Temperaturbedingungen von 37°C sorgte ein mit dem Gradientenrohr verbundenes temperiertes Wasserkreislaufsystem.

## 2.4 Kinetische Untersuchungen

Mittels der *CSI-Methode* (siehe Kapitel 2.6.4) wurde der zeitliche Verlauf des Fluorsignals in den RES-Organen Leber und Milz betrachtet.

Jeweils vier Mäusen wurden 500 µl der 20 %-igen Emulsionen von *PFD* bzw. *PFOB* intravenös über die Schwanzvene verabreicht. Danach folgten Messungen am selben Tag (d0), sowie am ersten (d1), zweiten (d2), vierten (d4) und sechsten (d6) Tag nach Injektion.

Für die kinetischen Untersuchungen von *F-44E* wurden zwei verschiedene i.v.-Dosen (200 bzw. 500µl) einer 51.5 %-igen Emulsion verwendet (je vier Mäuse). Hier wurde der Signalverlauf über einen Zeitraum von insgesamt 45 Tagen detektiert.

Außerdem wurde die Kinetik von den 40%-igen Emulsionen von *PFD* und *PFOB* sowie von *F-44E* (51.5 %-ige Emulsion) im Gefäßsystem untersucht. Hierzu wurden jeweils vier Mäusen 500 µl der jeweiligen Emulsionen in die Schwanzvene appliziert. Für *PFOB* und *F-44E* wurden MRT-Messungen einen (d1), zwei (d2), drei (d3) und sechs (d6) Tage nach Injektion durchgeführt, für *PFD* an den Tagen eins bis drei (d1-d3). Der Verlauf des Fluorsignals wurde in den Herzventrikeln, repräsentativ für das Gefäßsystem, betrachtet.

Zur Ermittlung der <sup>19</sup>F-MR-Signale wurde eine axiale Schicht durch das jeweils betrachtete Organ (Leber, Milz bzw. Herzkammern) ausgewählt. In dieser Schicht wurde

dann die mittlere Signalintensität im jeweiligen Organ errechnet und hiervon das Hintergrundsignal subtrahiert bzw. das Signal zu Rausch-Verhältnis ermittelt.

## **2.5 Pneumonieinduktion durch LPS-Instillation**

Die im Folgenden beschriebene Methode wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. med. Bernd Ebner durchgeführt: Als Modell zur Induktion einer Pneumonie wurde die Instillation von Lipopolysaccharid LPS (Sigma, Taufkirchen, Germany) in phosphatgepuffertes isotoner Kochsalzlösung via eines *endotracheal* eingebrachten Tubus' gewählt. Bei dieser Methode wird, anders als in herkömmlich angewandten Methoden, kein LPS um die Maus vernebelt, welches diese dann einatmet. Stattdessen wird die Maus mittels eines intravenösen Verweilkatheters intubiert und eine LPS-Lösung über diesen Tubus eingebracht. Vorteile dieser Methode sind eine exakt berechenbare Dosisapplikation, die vergleichsweise geringen systemischen Nebenwirkungen durch das eingebrachte Lipopolysaccharid, sowie die zuverlässige Induktion einer Pneumonie. Hierzu wurde LPS von *Salmonella enteritidis* (Sigma) verwendet. Das eingebrachte Lipopolysaccharid führt zu einer Rekrutierung zirkulierender Monozyten. Durch die lokale Freisetzung von vielen Mediatoren führt dies dann zu einer Ödembildung im Gewebe und zum Übertritt von Plasmaproteinen und Zellen in den Alveolarraum. Hierzu wurde eine Insulinspritze mit LPS (1 mg/ml), umgerechnet auf 1.5 µl/g KG, befüllt. Die Maus wurde über ein offenes Beatmungssystem mit 2% Isofluran in Narkose versetzt. Nach Prüfung auf Schmerzreize wurde die Maus dann in eine Intubationsvorrichtung eingebracht, so dass von oben in die Mundhöhle eingesehen werden konnte. Die Maus wurde währenddessen weiter mit ca. 70% Stickstoff, ca. 30% Sauerstoff und ca. 2% Isofluran über die Nase beatmet. Durch transthorakale punktuelle Lichtapplikation wurde nach Öffnen der Schnauze die Stimmritze sichtbar. Diese wurde mittels eines 26-Gauge-Verweilkatheters intubiert, und der Führungsstab anschließend schnell gezogen. Die Maus atmete nun frei durch einen Tubus. Nach Prüfung der Tubuslage mit einem Wassertropfen im Endstück des Katheters, wurde mittels der vorbereiteten Insulinspritze die LPS-Lösung über den Tubus appliziert. Die Maus ventilierte dabei die eingebrachte LPS-Lösung selbst ein. Anschließend wurde der Tubus entfernt, und die Maus atmete noch für fünf Minuten das Narkosegasgemisch ein, bis die Lösung von der Lunge komplett absorbiert worden war.

Zur Detektion der Entzündungsreaktion wurden den Mäusen ca. 6 h nach Induktion der Pneumonie 500 µl der jeweils verwendeten *PFC-Emulsion* (*PFOB-*, *PFD-* bzw. *F44E-Emulsion*) intravenös über die Schwanzvene verabreicht (jeweils n=4). Hiernach folgten *CSI-Messreihen* (siehe Abschnitt 2.6.4).

## **2.6 Magnetresonanzuntersuchungen**

### **2.6.1 Hardware**

Die MR-Messungen erfolgten an einem vertikalen supraleitenden Oxford Spectrospin Magneten mit einer magnetischen Feldstärke von  $B_0 = 9.4$  Tesla und einer Bohrung von 89 mm (DRX 400 MHz Widebore-NMR der Firma Bruker Ettlingen, Deutschland).

Die Ansteuerung der Hochfrequenzspulen und des Gradientensystems wurde über eine Bruker AVANCE Konsole kontrolliert, welche mit einer graphischen Benutzeroberfläche ParaVision<sup>®</sup> 4 (Bruker BioSpin) auf einer Linux Workstation (Red Hat Enterprise Linux 3; der Firma Red Hat, Raleigh, USA) gesteuert wurde. Die Einstellung sämtlicher Sequenzparameter sowie die Rekonstruktion und graphische Darstellung der akquirierten MR-Datensätze erfolgte über die *Software* ParaVision<sup>®</sup>.

## 2.6.2 Protonen-Referenzbilder

Um Referenzbilder für die Fluormessungen zu erhalten, wurden bei jedem Experiment zunächst Protonenbilder aufgenommen. Hierzu wurde der MR-Tomograph manuell durch *Tuning* und *Matching* auf den Protonenkern abgestimmt.

Zur Orientierung wurde ein *Scan* mit folgenden Parametern aufgenommen: Gradientenechosequenz mit drei orthogonalen Schichten (*axial*, *coronal*, *sagittal*), TR = 120 ms, TE = 2.13 ms, FOV = 3.0×3.0 cm<sup>2</sup> bei 1 mm Schichtdicke, Matrix = 128×128.

Anschließend wurden Schichten in das jeweils zu betrachtende Areal gelegt. Bei den verschiedenen Versuchsreihen wurden hierzu unterschiedliche Protokolle verwendet:

➤ **F44E –Versuchsreihen:**

Gradientenechosequenz mit 8 bzw. 15 *axialen* Schichten, TR = 120 ms, TE = 1.919 ms, FOV = 2.56×2.56 cm<sup>2</sup> bei 2 mm bzw. 1 mm Schichtdicke, Matrix = 128×128.

➤ **PFD-Versuchsreihen:**

**Kinetische Untersuchungen**

Gradientenechoaufnahme mit einer *coronalen* Schicht, die durch Leber- und Milzgewebe verläuft; TR = 100 ms, TE = 3.031 ms, FOV = 3.00×3.00 cm<sup>2</sup> bei 1 mm Schichtdicke, Matrix = 128×128

**Pneumoniemodell**

Gradientenechosequenz mit 15 *axialen* Schichten, TR = 120 ms, TE = 1.919 ms, FOV = 2.56×2.56 cm<sup>2</sup> bei 1 mm Schichtdicke, Matrix = 128×128.

➤ **PFOB-Versuchsreihen:**

**Kinetische Untersuchungsreihe**

Gradientenechosequenz mit einer *coronalen* Schicht, die durch Leber- und Milzgewebe verläuft; TR = 175 ms, TE = 1.919 ms, FOV = 2.56×2.56 cm<sup>2</sup> bei 2 mm Schichtdicke, Matrix = 128×128.

### **Pneumoniemodell**

Gradientenechosequenz mit 15 *axialen* Schichten, TR = 120 ms, TE = 1.919 ms, FOV = 2.56×2.56 cm<sup>2</sup> bzw. 3.00×3.00 cm<sup>2</sup> bei 1 mm Schichtdicke, Matrix = 128×128.

### **2.6.3 Fluoroscans**

Analog zu den *Protonenscans* musste der Tomograph zunächst auf den Fluorkern abgestimmt werden. Nach Einstellen der substanzspezifischen Anregungsfrequenz wurden *Fluoroscans*, mit zu den Protonenreferenzbildern passenden geometrischen Einstellungen, durchgeführt. Für die einzelnen Versuchsreihen wurden folgende Protokolle verwendet:

➤ **F44E –Versuchsreihen:**

*CSI-Aufnahme* mit einer *axialen* Schicht, TR = 25 ms, TE = 0.855 ms, spektrale Bandbreite = 25000 Hz, FOV = 2.56×2.56 cm<sup>2</sup> bei 2 mm Schichtdicke, Matrix = 64×64

➤ **PFD-Versuchsreihen:**

**Kinetische Untersuchungsreihe**

*CSI-Aufnahme* mit einer *coronalen* Schicht, die durch Leber- und Milzgewebe verläuft, TR = 25 ms, TE = 1.140 ms, spektrale Bandbreite = 12500 Hz, FOV = 3.00×3.00 cm<sup>2</sup> bei 2.36 mm Schichtdicke, Matrix 64×64.

### **Pneumoniemodell**

*CSI-Aufnahme* mit einer *axialen* Schicht, TR = 25 ms, TE = 0.980 ms, spektrale Bandbreite 12500 Hz, FOV = 2.56×2.56 cm<sup>2</sup> bei 2 mm Schichtdicke, Matrix = 64×64.

➤ **PFOB-Versuchsreihen:**

**Kinetische Untersuchungsreihe**

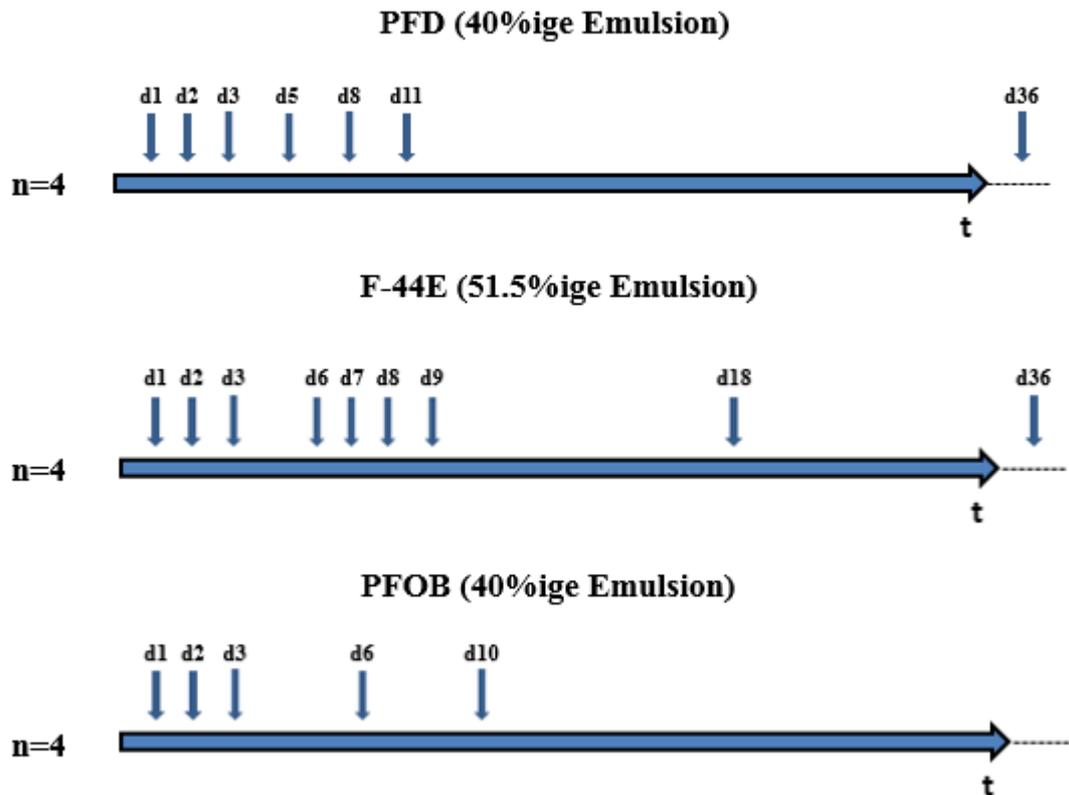
*CSI-Protokoll* mit einer *coronalen* Schicht, die durch Leber- und Milzgewebe verläuft, TR = 25 ms, TE = 0.576 ms, spektrale Bandbreite = 25000 Hz, FOV = 2.56×2.56 cm<sup>2</sup> bei 2 mm Schichtdicke, Matrix = 64×64.

**Pneumoniemodell**

*CSI-Protokoll* mit einer *axialen* Schicht, TR = 25 ms, TE = 0.830 ms, spektrale Bandbreite = 29761.9 Hz, FOV = 3.00×3.00 cm<sup>2</sup> bzw. 2.56×2.56 cm<sup>2</sup> bei 2 bis 6 mm Schichtdicke, Matrix = 64×64 bzw. 32×32.

Um die anatomische Lokalisation des Fluorsignals darstellen zu können, wurden der *Protonenscan* und der dazu passende *Fluorscan* übereinander gelegt (*Overlay*).

Abbildung 3 (siehe nächste Seite) zeigt die zeitliche Abfolge der *CSI-Messungen* nach Pneumonieinduktion (Tag 0 = d0) für die drei Substanzen *PFDF*, *F-44E* sowie *PFOB*.



**Abb. 3: Versuchsreihe des Pneumoniemodells**

Dargestellt ist schemenhaft die zeitliche Abfolge der *CSI-Messungen* nach Pneumonieinduktion (Tag 0 = d0) für die drei Substanzen *PFD*, *F-44E* sowie *PFOB*, wobei d für die Tage steht und n für die Anzahl der verwendeten Versuchstiere.

## 2.6.4 Auswertung mittels CSI-Tool

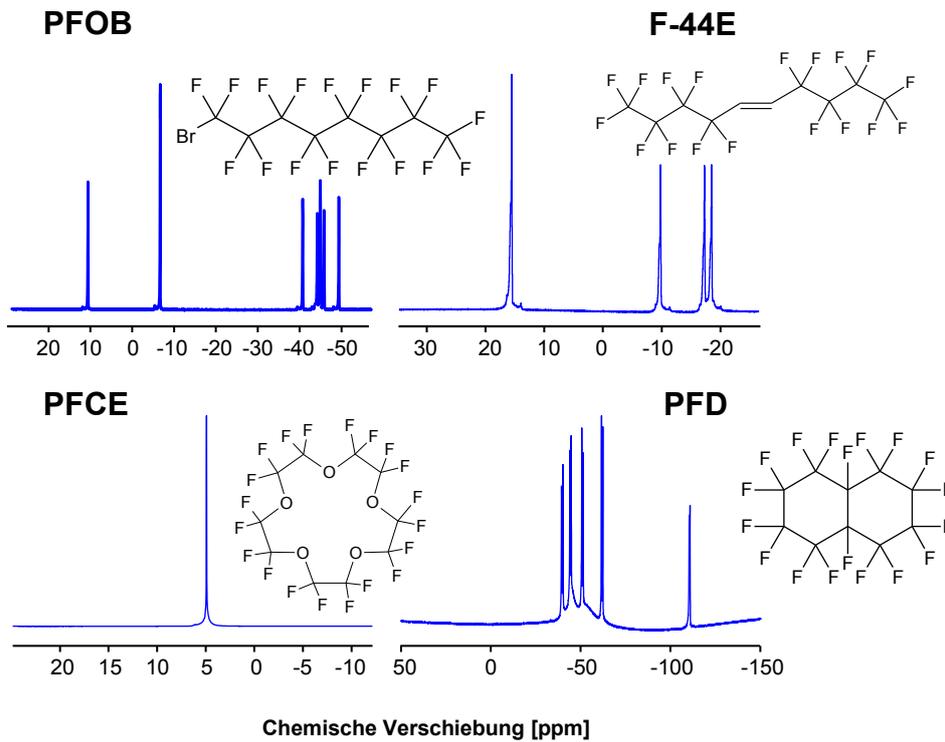
Die verwendeten Substanzen *PFOB*, *PFD* sowie *F44E* besitzen im Gegensatz zum Kronenether Fluoratome mit unterschiedlicher Anregungsfrequenz (siehe Abbildung 4, Seite 24). Diese Eigenschaft führt in der konventionellen Bildgebung zu Problemen bei der Ortskodierung. Daher wurde für diese Substanzen die oben beschriebene *CSI-Methode* (Kapitel 1.3.2) verwendet, die auf der MR-Spektroskopie basiert. Hierbei kam ein von Dr. Jacoby implementiertes Programm (*CSI-Tool*) zur Anwendung, das der Auswertung von BRUKER-CSI-Datensätzen dient und somit eine Ergänzung zur BRUKER-ParaVision®-Software darstellt. Ausgehend von einer Vielzahl von einzelnen Spektralaufnahmen wird

ein zweidimensionales Bild prozessiert. Jedes Spektrum repräsentiert dabei ein Pixel. Es werden Intervalle für die einzelnen Spektren definiert, innerhalb derer dann integriert wird. Zweck dieser Intervalldefinition ist es, ausschließlich das Signal der untersuchten Substanz zu integrieren. Die Summe dieser Integrale (Gesamtsignal) wird für jedes Pixel als Helligkeitswert dargestellt, und es resultiert eine so genannte *Integralmap*. Aus anderen Substanzen stammende Fluorsignale, z.B. durch aus der Inhalationsnarkose stammendes Isofluran, werden somit nicht berücksichtigt. Abbildung 5 (siehe Seite 25) illustriert die Auswertung der *CSI-Datensätze*.

Darüber hinaus bietet das Programm eine Vielzahl von *Post-Processing-Optionen*, wie die Verwendung von räumlichen Fenstern, das Glätten sowie die Ermittlung von Signal-zu-Rausch-Verhältnissen (SNR). Wird die Rohdatenmatrix mit Fensterfunktionen multipliziert führt dies zur Verbesserung des SNR bei gleichzeitiger Verschlechterung der Auflösung. Signal/Rausch-Verhältnisse erhält man durch die Definition von *ROIs* (von *Region Of Interest*) im Bereich des Signals sowie des Hintergrunds (siehe Abbildung 6, Seite 26).

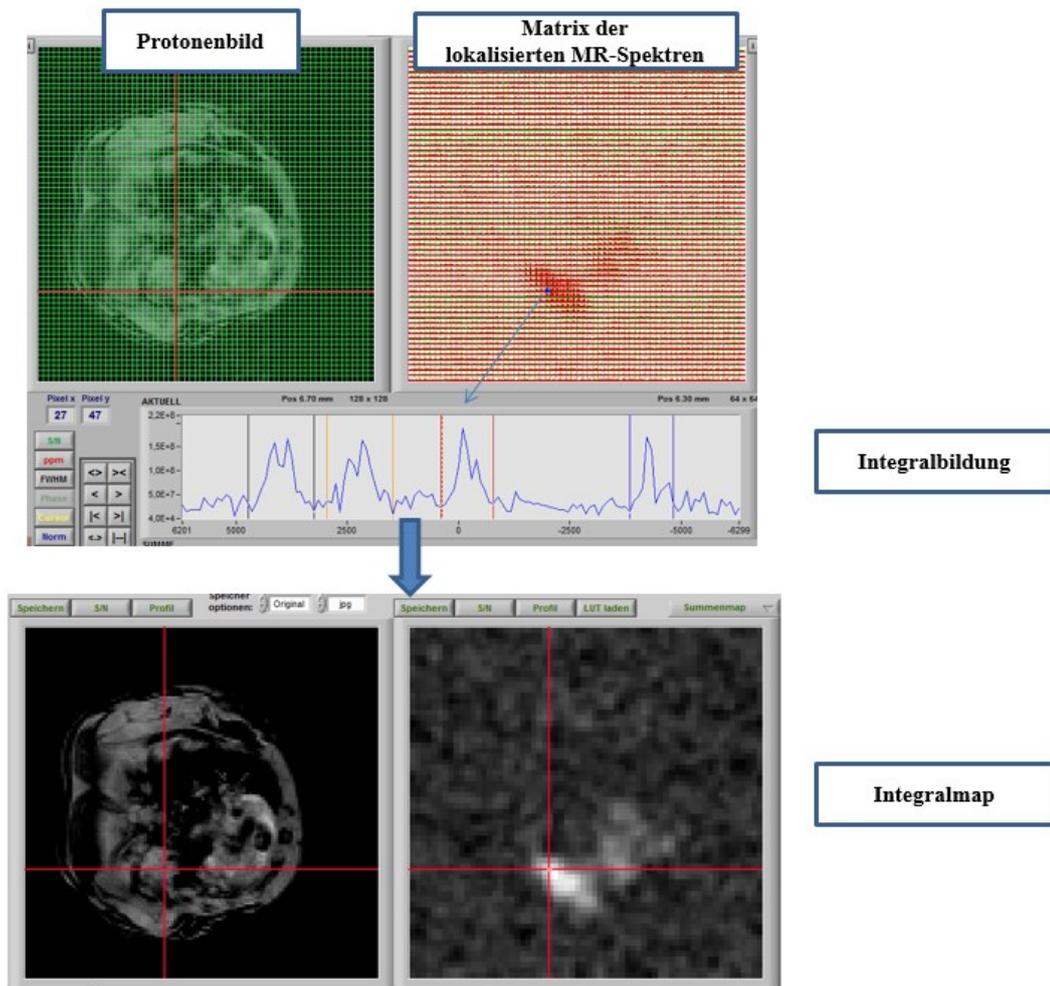
Für die kinetischen Untersuchungsreihen wurde die mittlere Fluor-Signalintensität mittels der *Integralmap* im jeweiligen Organ errechnet und hiervon das Hintergrundsignal subtrahiert bzw. das Signal-zu-Rausch-Verhältnis ermittelt.

Für das Pneumoniemodell wurde zunächst das Hauptpeumoniegebiet, definiert als das größte klar abgrenzbare *Infiltrat*, bestimmt. Für dieses wurden dann das Protonensignal sowie das Fluorsignal in Form des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses ermittelt.



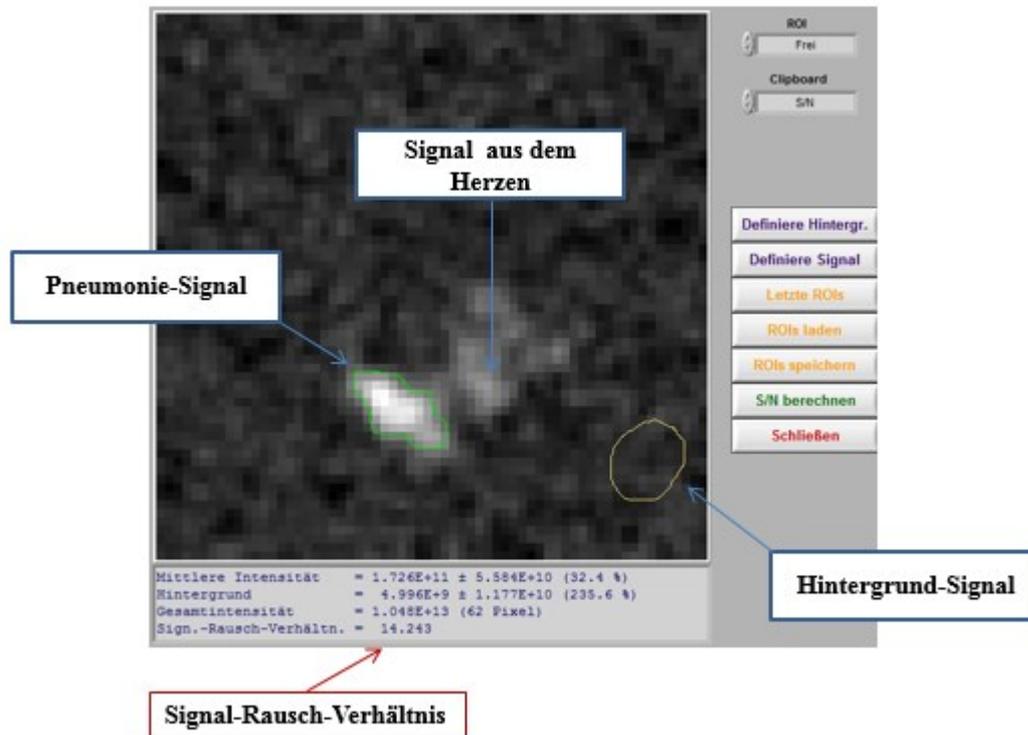
**Abb. 4: MR-Spektren der verschiedenen PFC**

Dargestellt sind die chemischen Strukturen sowie die korrespondierenden MR-Spektren der verschiedenen *PFC*. Die einzelnen Fluoratome (F) einer *PFC*-Verbindung haben eine unterschiedliche chemische Umgebung und besitzen daher verschiedene Anregungsfrequenzen. Dieser *chemical shift* ist in ppm angegeben. Es resultiert ein ganzes Spektrum an Resonanzfrequenzen. Eine Ausnahme stellt der zyklisch aufgebaute *PFCE* dar. Aufgrund der gleichen chemischen Umgebung aller Fluoratome besitzt die Verbindung eine einheitliche Resonanzfrequenz.



**Abb. 5: Erstellung der Integralmap mittels CSI-Tool**

Die Abbildung illustriert die Erstellung der *Integralmap* aus einem *CSI-Datensatz*. Oben links ist das Protonenreferenzbild dargestellt, oben rechts der dazu anatomisch korrespondierende *CSI-Scan*. Unten rechts: Die *Integralmap*, das Ergebnis der Integralbildung.



**Abb. 6: Ermittlung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses**

Exemplarisch ist ein *Screenshot* aus dem *CSI-Tool* dargestellt. Zunächst wird die *Region of Interest ROI* (in diesem Beispiel das Pneumonie-Gebiet) definiert. Danach wird ein außerhalb des untersuchten Objekts liegender Bereich als Hintergrund-Signal (Rauschen) definiert. Aus diesen beiden Signalen wird dann das Signal-zu-Rausch-Verhältnis berechnet (siehe Kapitel 1.3.1).

## 2.7 Statistische Auswertung

Zur graphischen Darstellung der Messergebnisse wurden die Programme Origin 7.0 sowie MS Excel 2013 verwendet. Zuvor wurden für die jeweiligen Versuchsreihen mithilfe von MS Excel 2013 die Mittelwerte sowie Standardabweichungen berechnet.

## 3 Ergebnisse

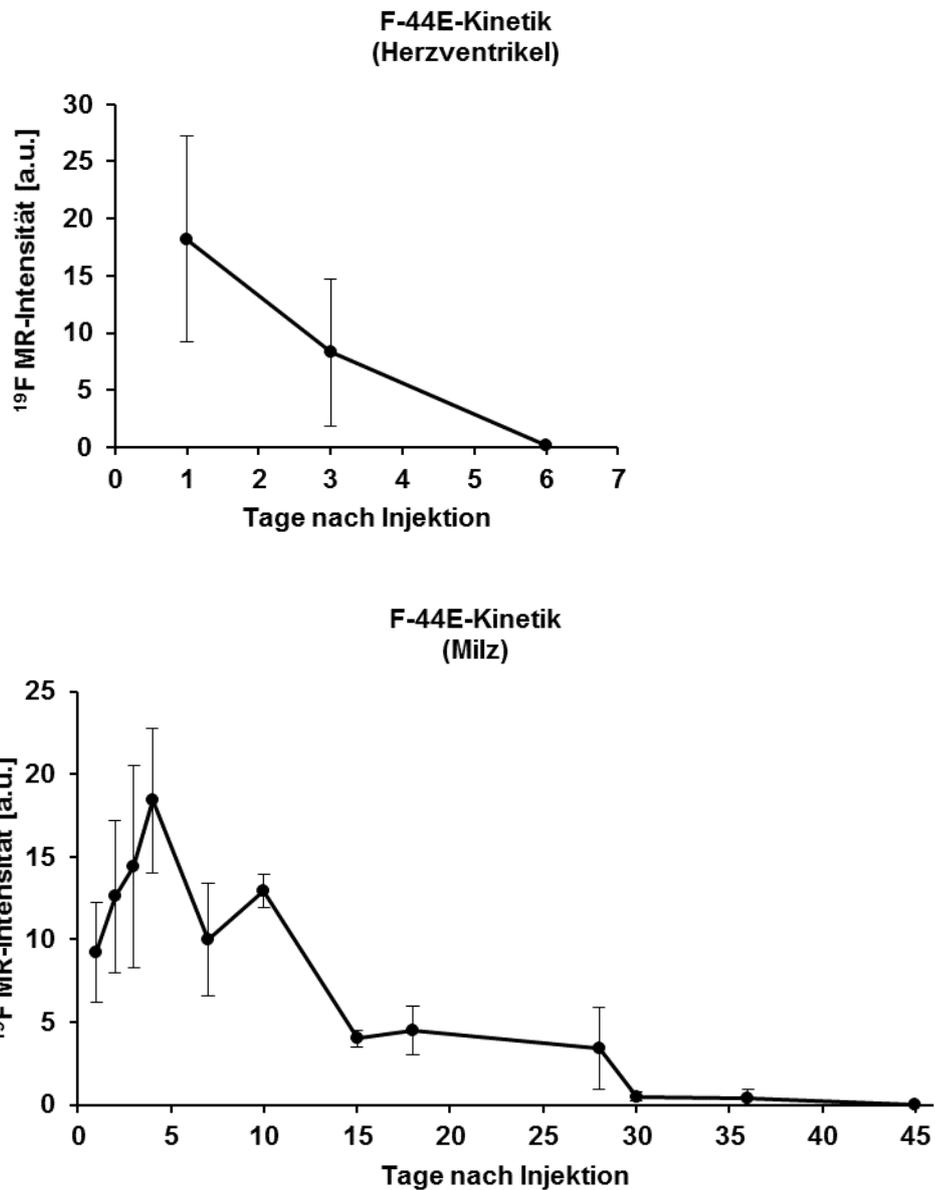
### 3.1 Kinetische Untersuchungsreihen

Die zyklisch aufgebaute Substanz *PFCE* bietet aus technischer Sicht den großen Vorteil, dass alle 20 Fluoratome dieselbe Resonanzfrequenz besitzen, jedoch wie oben erwähnt den großen Nachteil sich längerfristig im retikuloendothelialen System (RES) abzulagern. Ziel war es daher zu untersuchen, ob andere Vertreter aus der Gruppe der *PFC* in einem vertretbaren Zeitraum aus dem Mäusemodell eliminiert werden. Hierzu wurden die Fluorsignalverläufe in Leber und Milz als Vertreter des RES untersucht sowie die Plasmahalbwertszeiten ermittelt. Die Dosisangaben der *PFC* in g/kg Körpergewicht beziehen sich auf ein mittleres Gewicht der Mäuse von 25 g.

#### 3.1.1 Auswaschkinetik der F-44E-Emulsion

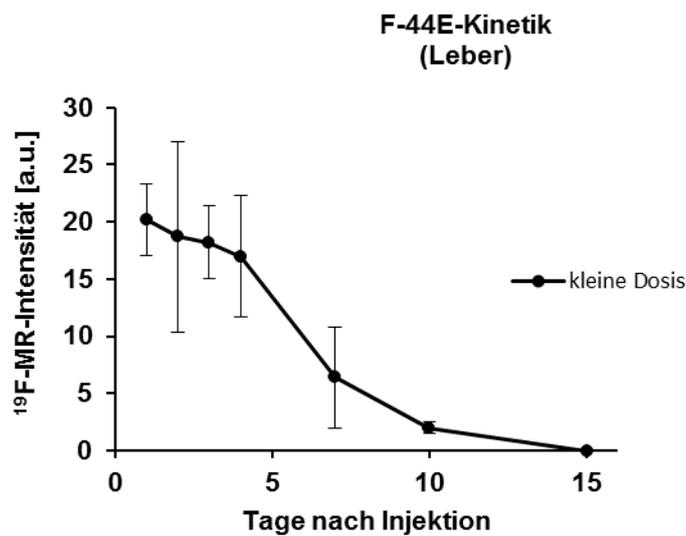
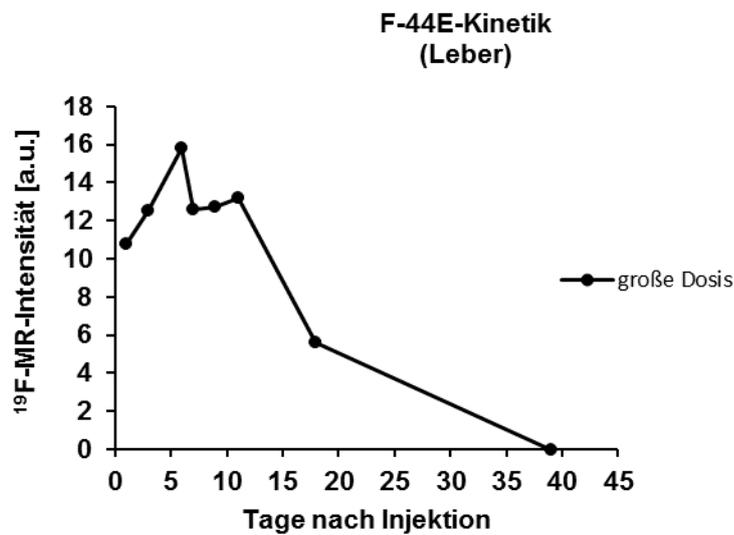
Die Substanz *F-44E* wird bei einer Injektions-Dosis von 500 µl (13.3 g PFC/kg Körpergewicht) nach 39 Tagen (n=1) und bei einer Dosis von 200 µl (5.3 g PFC/kg Körpergewicht) nach 15 Tagen (n=4) aus der Leber eliminiert (siehe Abbildung 8, Seite 29). Das Signal in der Milz ist bei einer Dosis von 200 µl nach 45 Tagen (n=4) und in den Herzhöhlen, als Vertreter des Gefäßsystems, nach 6 Tagen (n=4) nicht mehr nachweisbar (siehe Abbildung 7, nächste Seite). Bei den verwendeten *CSI-* ist im Gegensatz zu *RARE-* Protokollen die Darstellung von bewegten Substanzen möglich. Es zeigt sich bei der höheren Dosis in den ersten Tagen eine stetige Zunahme des MR-Signals in der Leber. Im gleichen Zeitraum kommt es zu einer Auswaschung des Signals im Gefäßsystem. Es schließt sich ein fast kontinuierlicher Signalabfall in der Leber an. Bei der niedrigeren Dosierung zeigt sich ab dem ersten Tag eine stetige Abnahme des Signals in der Leber. Das Milzsignal zeigt in den ersten Tagen einen Anstieg und fällt dann ebenfalls ab.

Für *F-44E* resultieren in dieser Messreihe daher folgende Halbwertszeiten, jeweils gemessen von der maximalen Signalstärke: Eine Plasmahalbwertszeit (500 µl Dosis; 13.3 g PFC/kg KG) von ca. 3 Tagen, eine von ca. 16 Tagen in der Milz (200 µl Dosis; 5.3 g PFC/kg KG), in der Leber bei der höheren Dosierung (500 µl Dosis; 13.3 g PFC/kg KG) eine von ca. 19 Tagen sowie bei der niedrigeren Dosierung (200 µl Dosis; 5.3 g PFC/kg KG) eine von ca. 6 Tagen.



**Abb. 7: Kinetische Ergebnisse für F-44E: Milz und Herzventrikel**

Aus den Fluorsignalverläufen im jeweiligen Organsystem lässt sich die Auswaschkinetik ableiten. **Oben:** Dargestellt ist der zeitliche Verlauf des Fluorsignals (in willkürlichen Einheiten; a.u.) in den Herzventrikeln (zirkulierendes Signal; n=4) nach intravenöser Injektion von 500 µl einer *F-44-Emulsion* (13.3 g PFC/kg KG). **Unten:** Dargestellt ist der zeitliche Verlauf des Fluorsignals (in willkürlichen Einheiten; a.u.) in der Milz (n=4) nach intravenöser Injektion von 200 µl einer *F-44E-Emulsion* (5.3 g PFC/kg KG). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen.

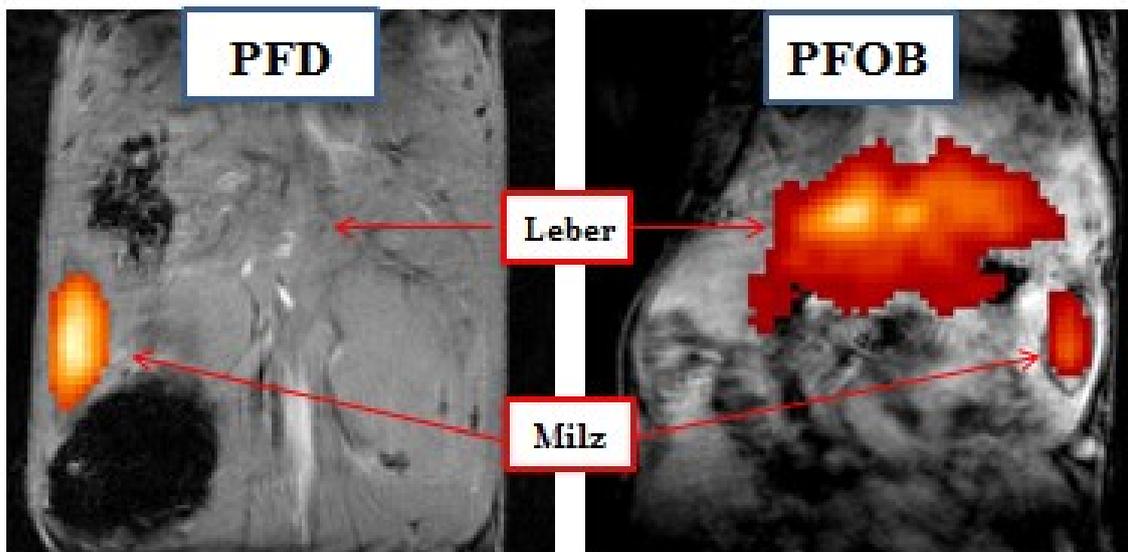


**Abb. 8: Kinetische Ergebnisse für F-44E: Leber**

Aus den Fluorsignalverläufen im jeweiligen Organsystem lässt sich die Auswaschkinetik ableiten. **Oben:** Dargestellt ist der zeitliche Verlauf des Fluorsignals (in willkürlichen Einheiten; a.u.) in der Leber (n=1) nach intravenöser Injektion von 500 µl einer *F-44E-Emulsion* (13.3 g PFC/kg KG). **Unten:** Dargestellt ist der zeitliche Verlauf des Fluorsignals (in willkürlichen Einheiten; a.u.) in der Leber (n=4) nach intravenöser Injektion von 200 µl einer *F-44E-Emulsion* (5.3 g PFC/kg Körpergewicht). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen.

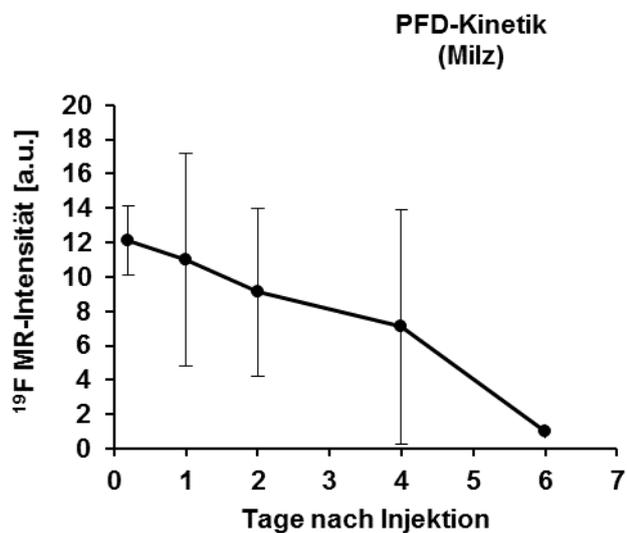
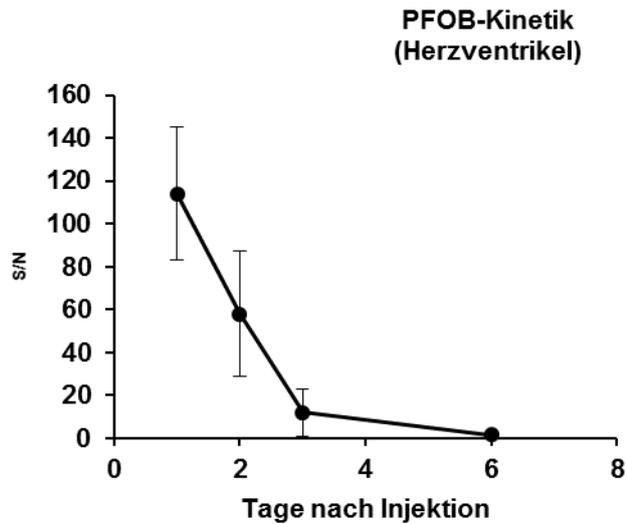
### 3.1.2 Auswaschkinetik der PFD-Emulsion

Die Substanz *PFD* führt in der verwendeten Dosierung als einzige der betrachteten Substanzen zu keinem nachweisbaren Signal in der Leber (siehe Abbildung 9). Ein Signal in der Milz ist bei einer 500  $\mu$ l-Dosis einer *20%-PFD-Emulsion* (4.6 g PFC/kg KG) nach 6 Tagen (n=4) nahezu nicht mehr detektierbar. Hingegen ist es in den Herzhöhlen bei einer 500  $\mu$ l-Dosis einer *40%-PFD-Emulsion* (10.4 g PFC/kg KG) nach 3 Tagen verschwunden (n=4) (siehe Abbildung 10, nächste Seite). Hieraus ergibt sich eine Halbwertszeit im Plasma von ca. 1.8 Tagen und in der Milz von ca. 4.5 Tagen.



**Abb. 9: Ablagerung im RES: PFD im Vergleich mit PFOB**

Die Abbildung zeigt *coronare* Schichtbilder durch die Maus. Dargestellt sind *Overlay-Bilder* mit dem  $^{19}\text{F}$ -Bild (wobei das Fluorsignal farbig kodiert ist). Im linken Bild sieht man die Akkumulation von *PFD* in der Milz; in der Leber ist kein Fluorsignal erkennbar. Im rechten Bild sieht man hingegen die Akkumulation von *PFOB* in Leber und Milz.

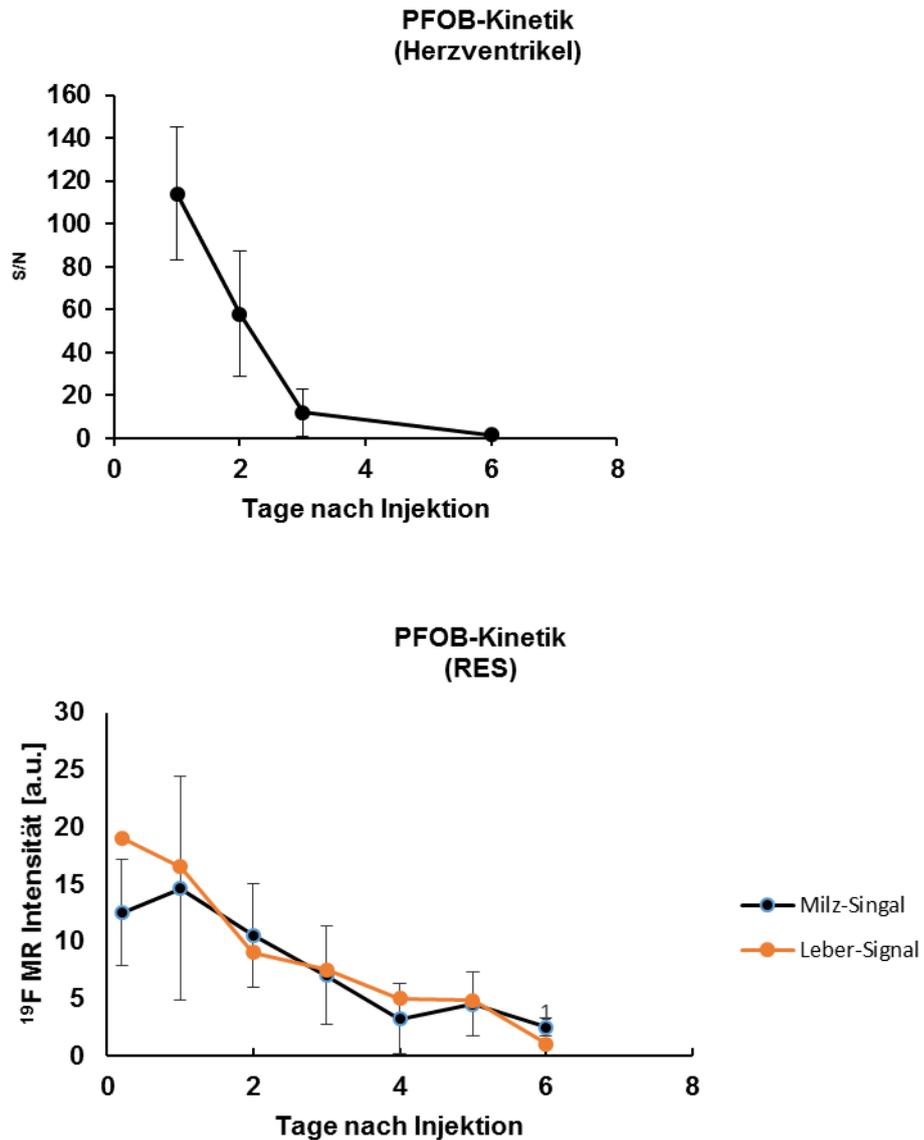


**Abb. 10: Kinetische Ergebnisse für PFD**

Aus den Fluorsignalverläufen im jeweiligen Organsystem lässt sich die Auswaschkinetik ableiten. **Oben:** Dargestellt ist der zeitliche Verlauf des Fluorsignals, angegeben als Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/N), in den Herzventrikeln (zirkulierendes Signal; n=4) nach intravenöser Injektion von 500 µl einer 40%-PFD-Emulsion. **Unten:** Dargestellt ist der zeitliche Verlauf des Fluorsignals (in willkürlichen Einheiten; a.u.) in der Milz (n=4) nach intravenöser Injektion von 500 µl einer 20%-PFD-Emulsion. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen.

### 3.1.3 Auswaschkinetik der PFOB-Emulsion

Die dritte untersuchte Substanz, *PFOB*, lagert sich analog zu *F-44E* passager in Leber und Milz ab. Allerdings erfolgt die Signalabnahme unter den hier verwendeten Konzentrationen deutlich schneller (siehe Abbildung 11, nächste Seite). Bereits nach 6 Tagen ist bei einer *20%-PFOB-Emulsion* (4.6 g PFC/kg KG) nahezu kein Signal mehr in Milz und Leber nachweisbar (n=4). Das Signal der Milz zeigt am ersten Tag einen Anstieg, im weiteren Verlauf dann einen stetigen Abfall. In den Herzventrikeln (n=4) ist das Fluorsignal (10.2 g PFC/kg KG) nach 6 Tagen auf null abgefallen. Aus den Signalverläufen resultiert eine Halbwertszeit im Plasma von ca. 2 Tagen, in der Leber von ca. 2 Tagen sowie in der Milz von ca. 3 Tagen.



**Abb. 11: Kinetische Ergebnisse für PFOB**

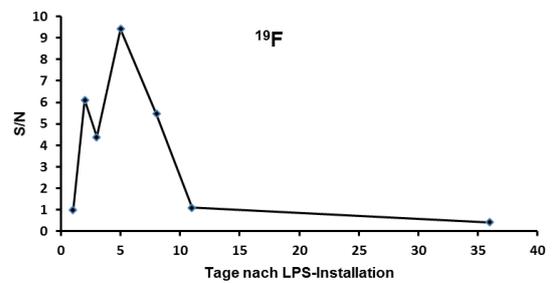
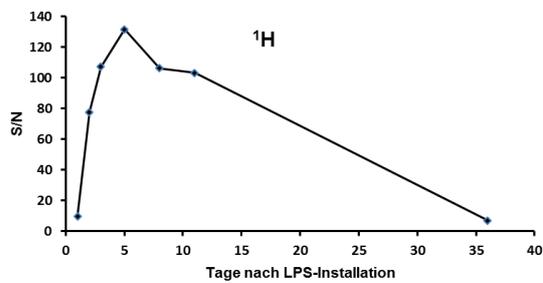
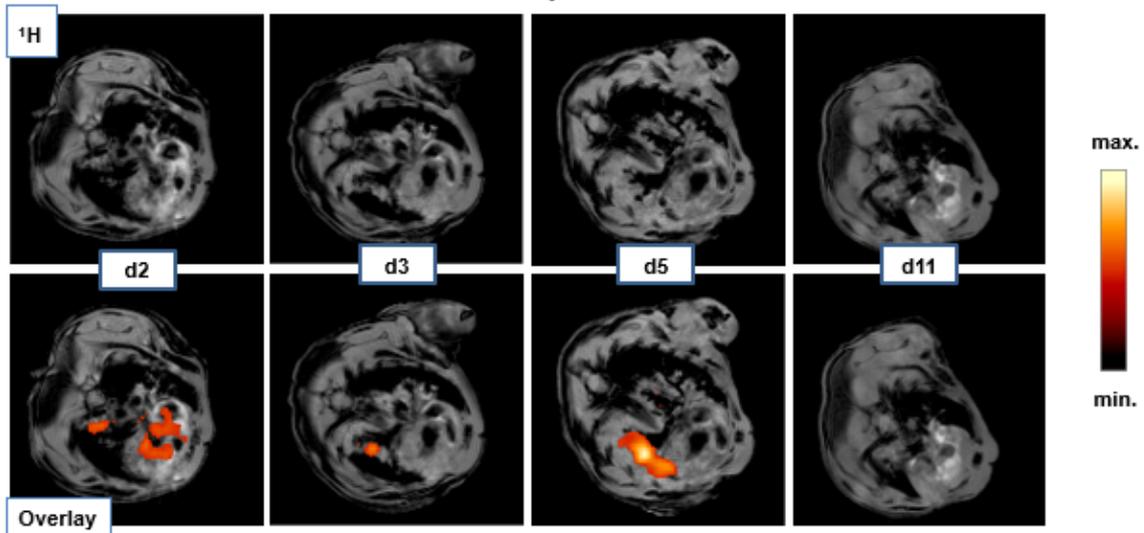
Aus den Fluorsignalverläufen im jeweiligen Organsystem lässt sich die Auswachkinetik von PFOB ableiten. **Oben:** Dargestellt ist der zeitliche Verlauf des Fluorsignals, angegeben als Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/N), in den Herzventrikeln (zirkulierendes Signal; n=4) nach intravenöser Injektion von 500 µl einer 40%-PFOB-Emulsion. **Unten:** Dargestellt ist der zeitliche Verlauf des Fluorsignals in jeweils willkürlichen Einheiten (a.u.) in Leber und Milz (retikuloendotheliales System, RES; jeweils n=4) nach intravenöser Injektion von 500 µl einer 20%-PFOB-Emulsion. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen.

## 3.2 Pneumoniemodell

### 3.2.1 Detektion mittels PFD-Emulsion

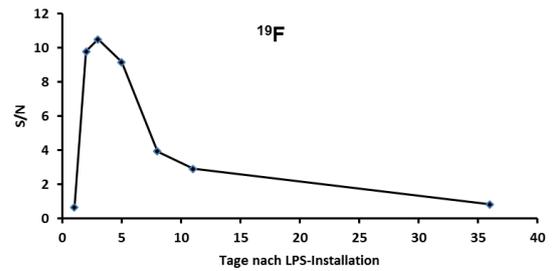
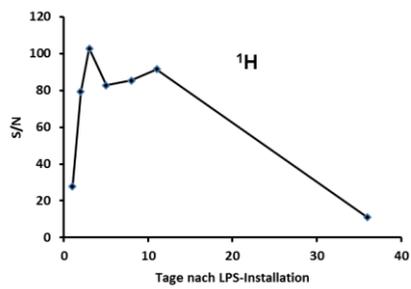
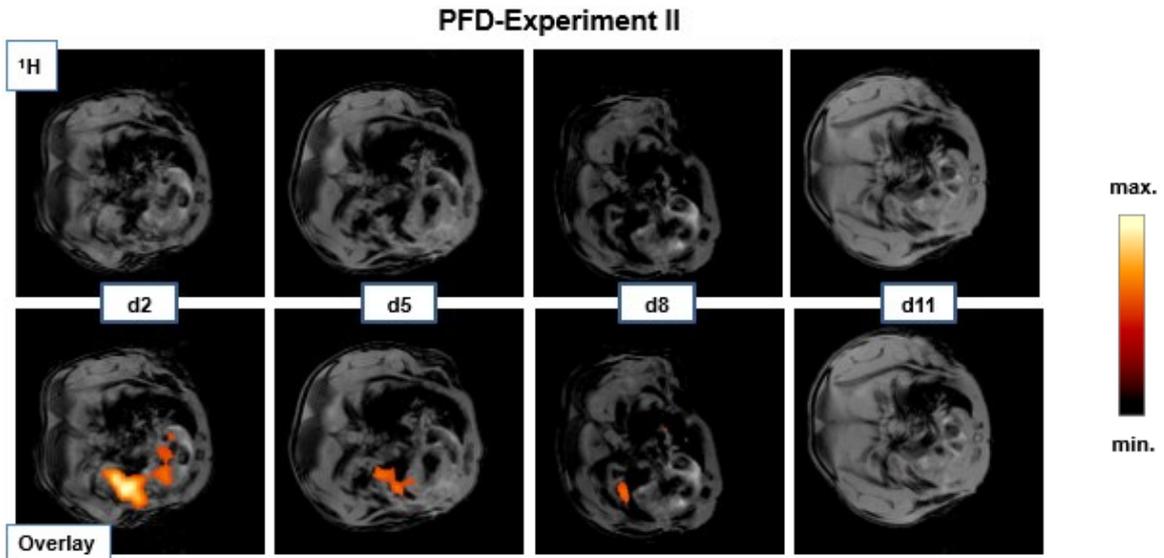
Bei allen Experimentalreihen (n=4) konnte eine vermehrte Protonendichte in der  $^1\text{H}$ -Bildgebung im Lungenparenchym als Korrelat der induzierten Pneumonie detektiert werden, so dass von einer erfolgreichen *LPS-Installation* auszugehen ist. Im Folgenden werden die Ergebnisse von drei der vier Experimentalreihen (siehe Abbildungen 12 bis 14, Seite 35-37) näher dargestellt, da bei einer nur ein schwaches Lungeninfiltrat nachweisbar war. Das Fluorsignal war mit dem hyperintensiven pneumonischen Infiltrat in der Protonenbildgebung kolokalisiert. Zur besseren Illustrierung sind bei den Abbildungen sowohl die Protonenbilder als auch die *Overlays* (Protonenbild überlagert vom *CSI-Map*) dargestellt. In den Abbildungen ist außerdem der zeitliche Verlauf der Signalintensität (angegeben als Signal-zu-Rausch-Verhältnis) im Hauptpneumoniegebiet für den *Protonen-*sowie den *Fluorscan* grafisch dargestellt. In den ersten Tagen ist der Signalverlauf beider Kurven weitestgehend identisch. Anschließend fällt das Fluorsignal rasch ab, während sich in der Protonenbildgebung ein deutlich langsamerer Signalabfall zeigt. In den vorliegenden Experimenten weist das Fluorsignal im zeitlichen Verlauf ein maximales Signal-zu-Rausch-Verhältnis von ca. 6 bis 11 (siehe Abbildung 15, Seite 38) auf, so dass von einer Akkumulation des *PFD* im Pneumoniegebiet auszugehen ist. Das transiente Signal in den Herzhöhlen ist durch die in der Blutbahn befindliche *PFC-Emulsion* erklärbar (siehe Kapitel 3.1). Außerdem sind zum Teil diskrete Fluorsignale in der Thoraxwand sowie *parahilär* zu erkennen, die am ehesten aus den Lymphknoten als Teil des retikuloendothelialen Systems stammen.

### PFD-Experiment I



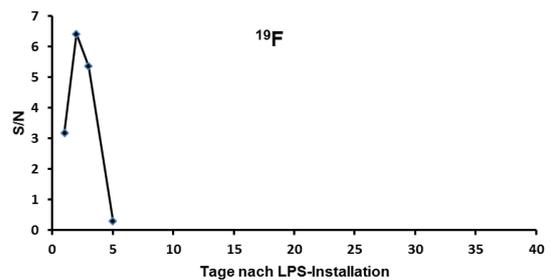
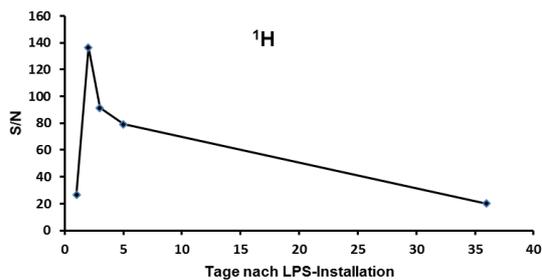
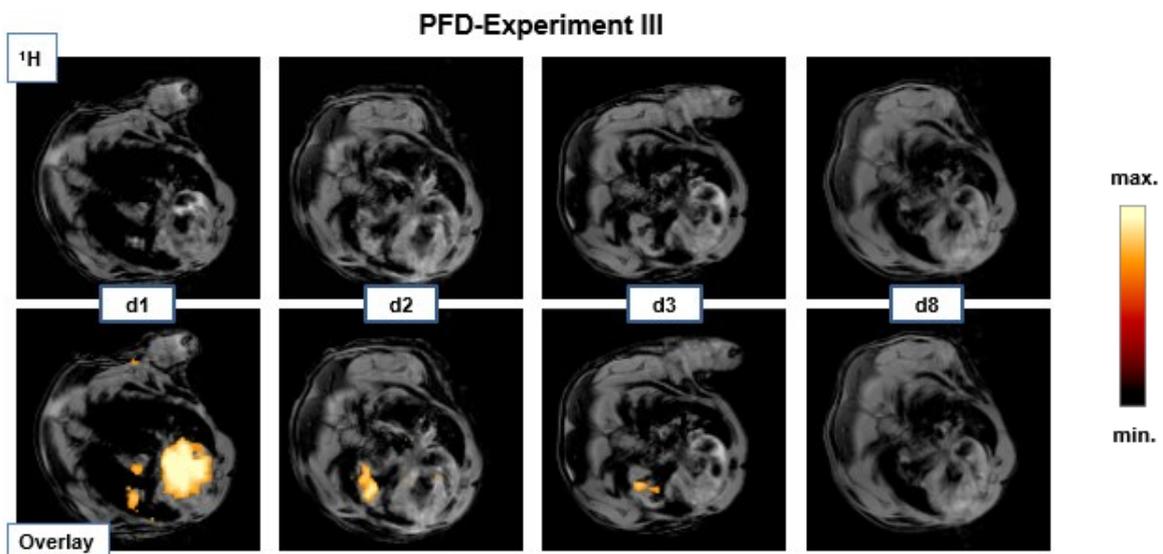
#### Abb. 12: Pneumoniedetektion mittels PFD: Experiment I

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf des  $^1\text{H}$ - sowie des  $^{19}\text{F}$ -Signals im Pneumoniegebiet (d = Tage nach LPS-Installation). **Oben:** Axiale  $^1\text{H}$ -Scans durch das Pneumoniegebiet sowie *Overlays* mit dem  $^{19}\text{F}$ -Bild. Das  $^{19}\text{F}$ -Signal ist farblich kodiert (siehe rechts). **Unten:** Grafische Darstellung der Signalverläufe (angegeben als Signal-zu-Rausch-Verhältnis, S/N).



**Abb. 13: Pneumoniedetektion mittels PFD: Experiment II**

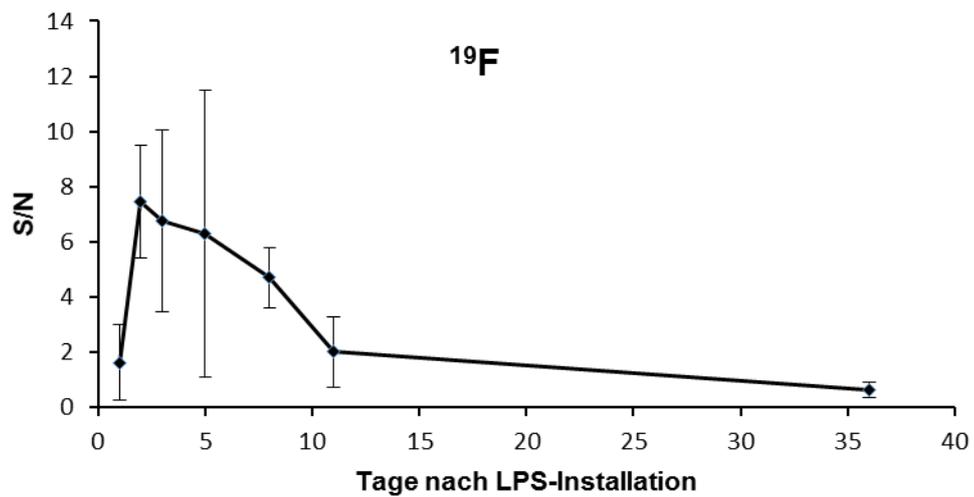
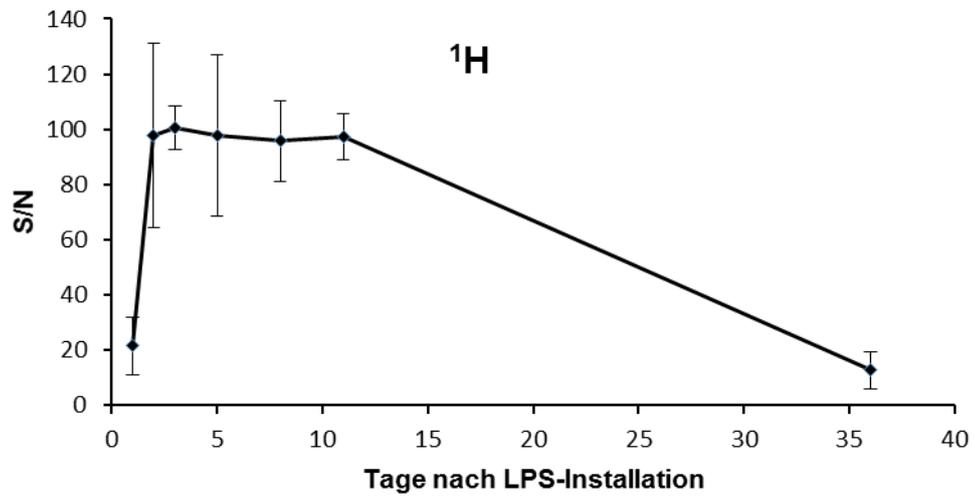
Dargestellt ist der zeitliche Verlauf des  $^1\text{H}$ - sowie des  $^{19}\text{F}$ -Signals im Pneumoniegebiet (d = Tage nach LPS-Installation). **Oben:** Axiale  $^1\text{H}$ -Scans durch das Pneumoniegebiet sowie *Overlays* mit dem  $^{19}\text{F}$ -Bild. Das  $^{19}\text{F}$ -Signal ist farblich kodiert (siehe rechts). **Unten:** Grafische Darstellung der Signalverläufe (angegeben als Signal-zu-Rausch-Verhältnis, S/N).



**Abb. 14: Pneumoniedetektion mittels PFD: Experiment III**

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf des  $^1\text{H}$ - sowie des  $^{19}\text{F}$ -Signals im Pneumoniegebiet (d = Tage nach LPS-Installation). **Oben:** Axiale  $^1\text{H}$ -Scans durch das Pneumoniegebiet sowie *Overlays* mit dem  $^{19}\text{F}$ -Bild. Das  $^{19}\text{F}$ -Signal ist farblich kodiert (siehe rechts). **Unten:** Grafische Darstellung der Signalverläufe (angegeben als Signal-zu-Rausch-Verhältnis, S/N).

## Zusammenfassung



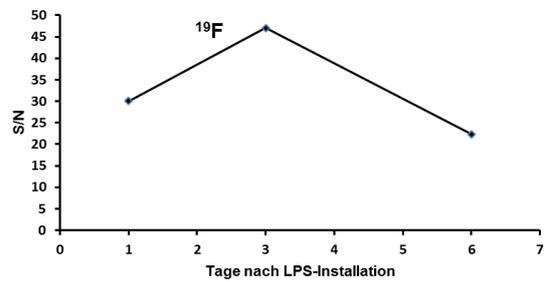
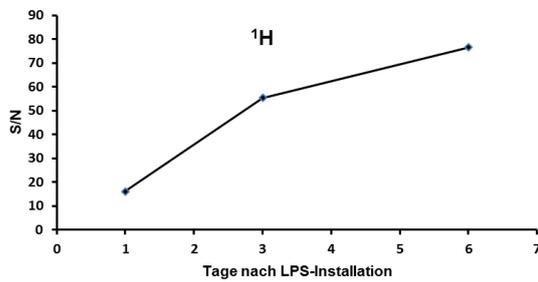
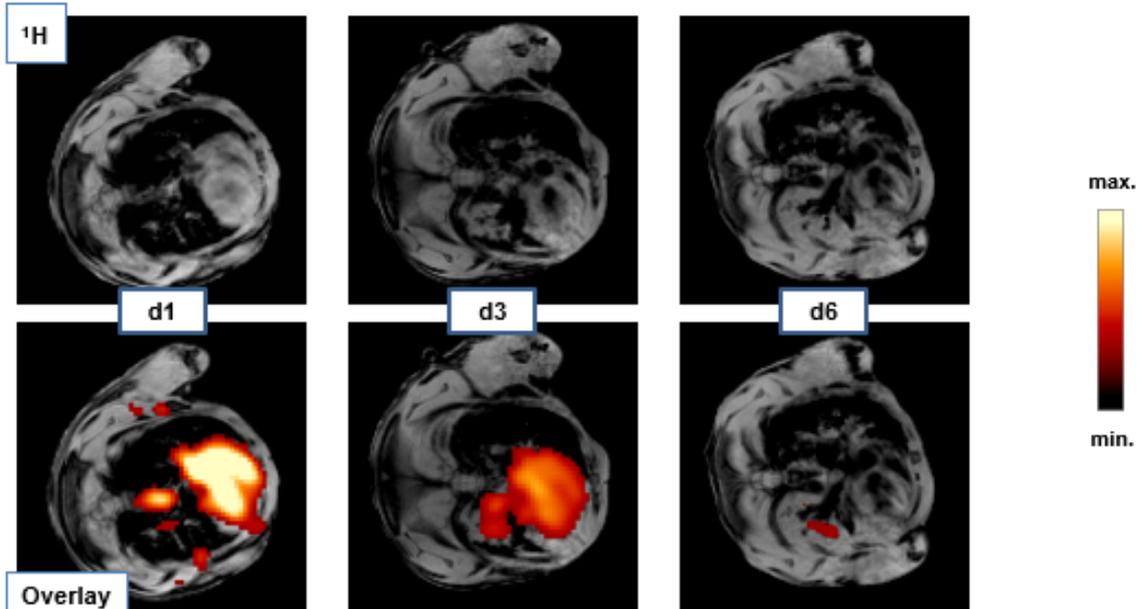
**Abb. 15: Pneumoniedetektion mittels PFD: Zusammenfassung**

Zusammenfassung ( $n=3$ ) der zeitlichen Verläufe des  $^1\text{H}$ - sowie des  $^{19}\text{F}$ -Signals (angegeben als Signal-zu-Rausch-Verhältnis, S/N) im Pneumoniegebiet nach *LPS-Installation*. Gezeigt sind die jeweiligen Mittelwerte sowie die Standardabweichungen.

### 3.2.2 Detektion mittels F-44E-Emulsion

Analog zur *PFD-Versuchsreihe* kann bei allen Experimenten mit *F-44E* (n=4) sicher ein pneumonisches Infiltrat im Protonenbild identifiziert werden. Jedoch verstarben während dieser Experimentalreihe drei Versuchstiere, so dass nicht alle Mäuse über denselben Untersuchungszeitraum beobachtet werden konnten. Ein Tier verstarb nach der ersten Messung, für die übrigen ist der zeitliche Verlauf des Lungeninfiltrats sowohl morphologisch wie auch grafisch näher dargestellt (siehe Abbildung 16 bis 18, Seite 40-42). Es ist eine Kolokalisation des Fluorsignals mit dem Protonensignal im Entzündungsgebiet erkennbar. Wie bereits in der *PFD-Versuchsreihe* zu beobachten fällt das Fluorsignal im weiteren Verlauf deutlich rascher ab als das Signal in der Protonenbildgebung. Mit Signal-zu-Rausch-Verhältnissen von ca. 35 (siehe Abbildung 19, Seite 43) für die *F-44E-Emulsion* sind diese etwa um den Faktor 3 bis 5 größer als bei der *PFD-Emulsion*.

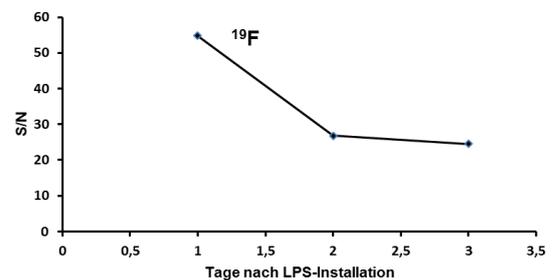
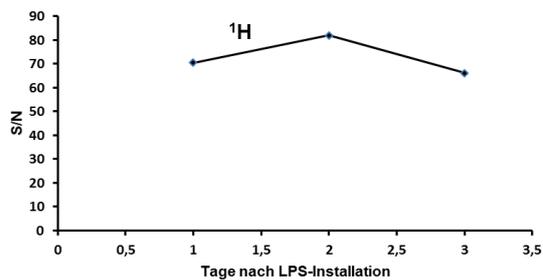
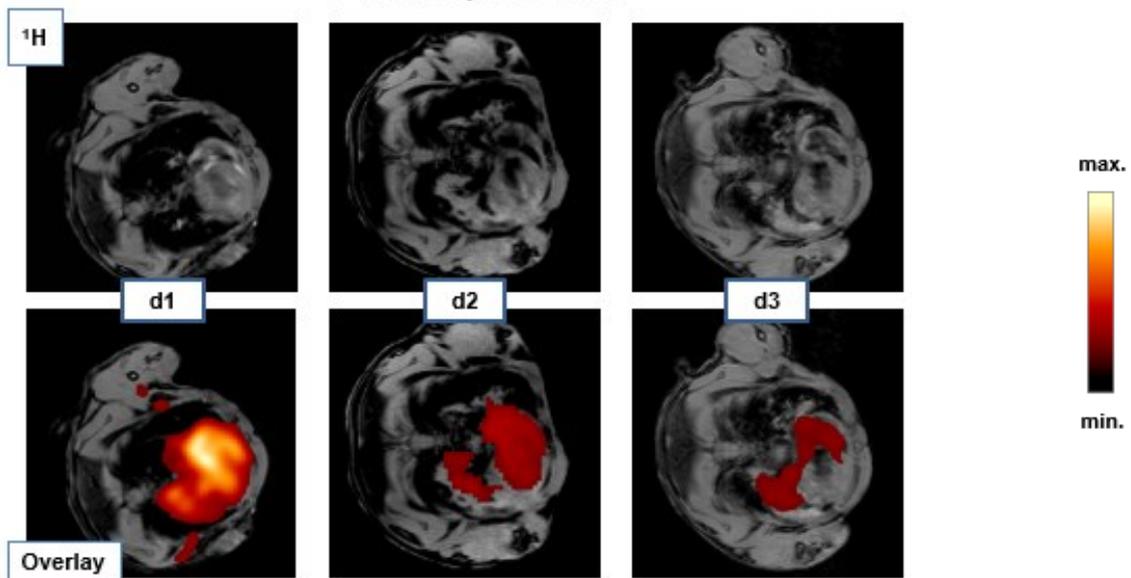
### F-44E-Experiment I



**Abb. 16: Pneumoniedetektion mittels F-44E: Experiment I**

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf des <sup>1</sup>H- sowie des <sup>19</sup>F-Signals im Pneumoniegebiet (d = Tage nach LPS-Installation). **Oben:** Axiale <sup>1</sup>H-Scans durch das Pneumoniegebiet sowie **Overlays** mit dem <sup>19</sup>F-Bild. Das <sup>19</sup>F-Signal ist farblich kodiert (siehe rechts). **Unten:** Grafische Darstellung der Signalverläufe (angegeben als Signal-zu-Rausch-Verhältnis, S/N).

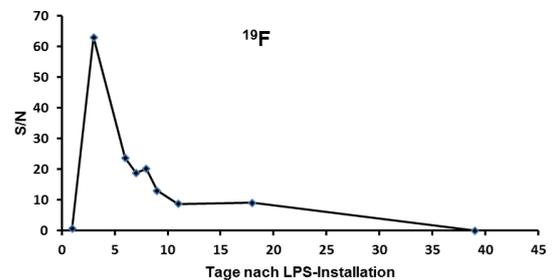
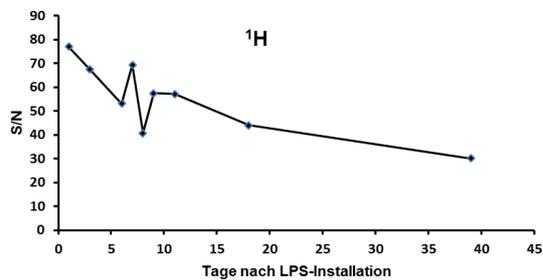
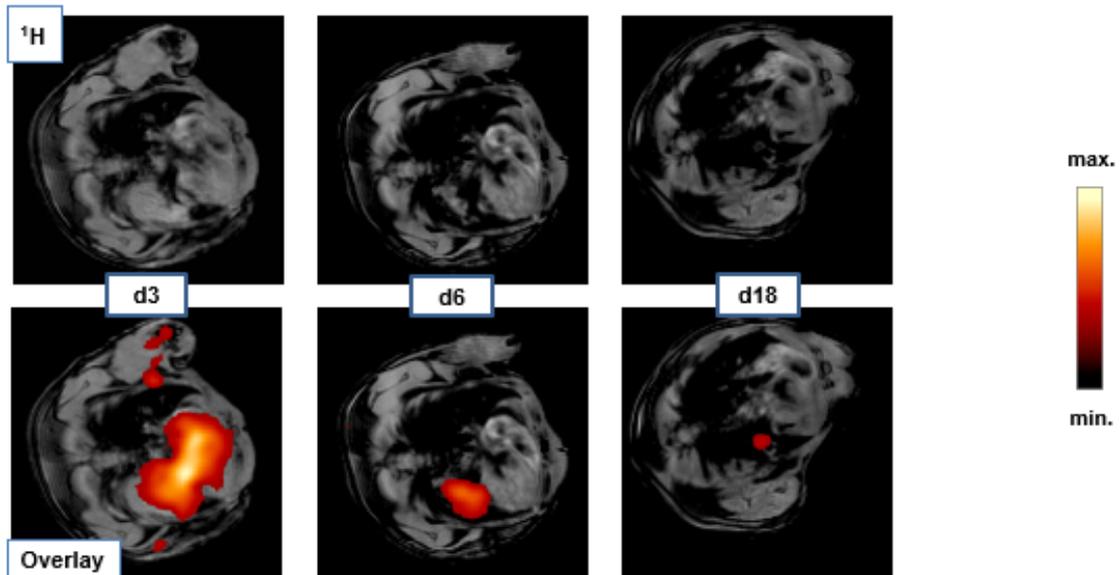
### F-44E-Experiment II



#### Abb. 17: Pneumoniedetektion mittels F-44E: Experiment II

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf des  $^1\text{H}$ - sowie des  $^{19}\text{F}$ -Signals im Pneumoniegebiet (d = Tage nach LPS-Installation). **Oben:** Axiale  $^1\text{H}$ -Scans durch das Pneumoniegebiet sowie *Overlays* mit dem  $^{19}\text{F}$ -Bild. Das  $^{19}\text{F}$ -Signal ist farblich kodiert (siehe rechts). **Unten:** Grafische Darstellung der Signalverläufe (angegeben als Signal-zu-Rausch-Verhältnis, S/N).

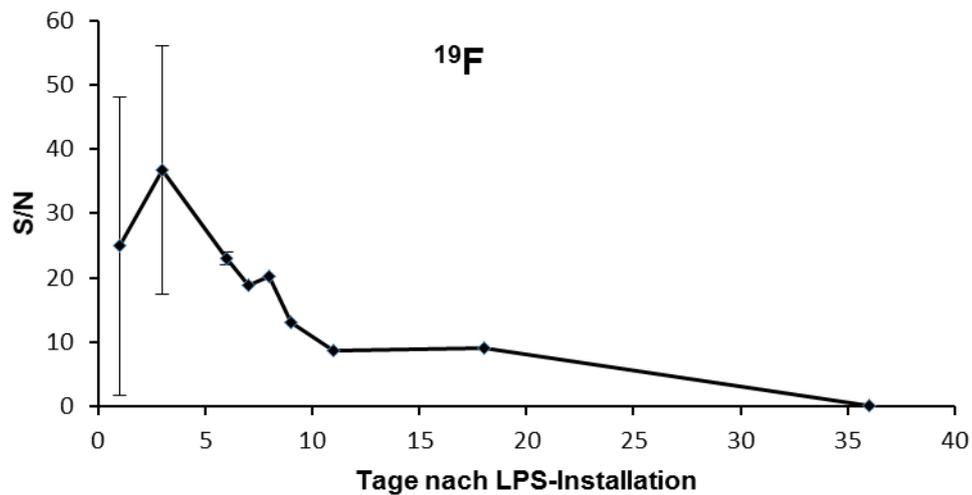
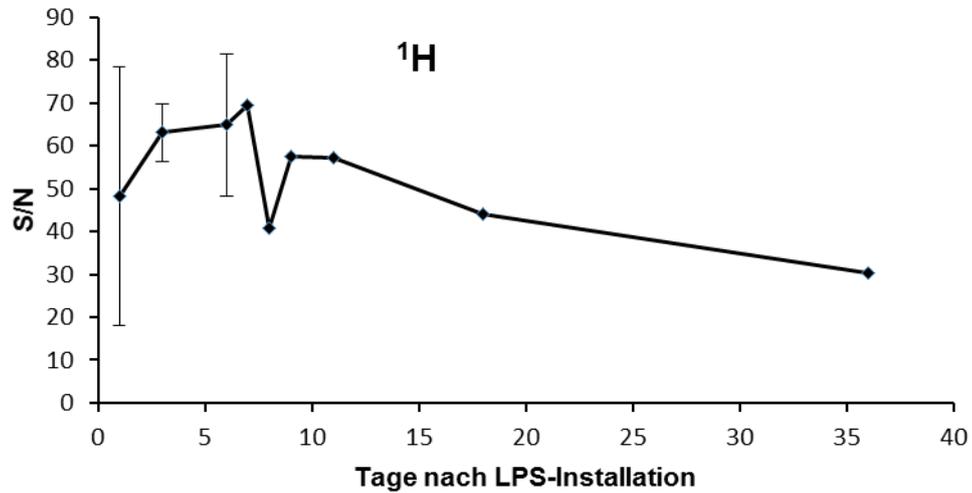
### F-44E-Experiment III



**Abb. 18: Pneumoniedetektion mittels F-44E: Experiment III**

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf des  $^1\text{H}$ - sowie des  $^{19}\text{F}$ -Signals im Pneumoniegebiet (d = Tage nach LPS-Installation). **Oben:** Axiale  $^1\text{H}$ -Scans durch das Pneumoniegebiet sowie *Overlays* mit dem  $^{19}\text{F}$ -Bild. Das  $^{19}\text{F}$ -Signal ist farblich kodiert (siehe rechts). **Unten:** Grafische Darstellung der Signalverläufe (angegeben als Signal-zu-Rausch-Verhältnis, S/N).

## Zusammenfassung

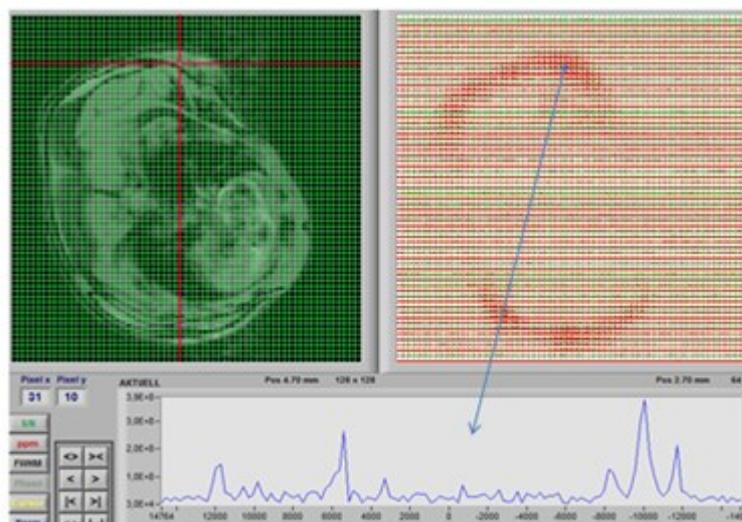


**Abb. 19: Pneumoniedetektion mittels F-44E: Zusammenfassung**

Zusammenfassung (n=3, im weiteren zeitlichen Verlauf n=1) der zeitlichen Verläufe des <sup>1</sup>H- sowie des <sup>19</sup>F-Signals (angegeben als Signal-zu-Rausch-Verhältnis, S/N) im Pneumoniegebiet nach *LPS-Installation*. Gezeigt sind die jeweiligen Mittelwerte sowie die Standardabweichungen.

### 3.2.3 Detektion mittels PFOB-Emulsion

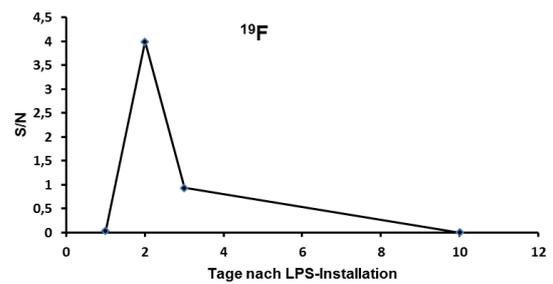
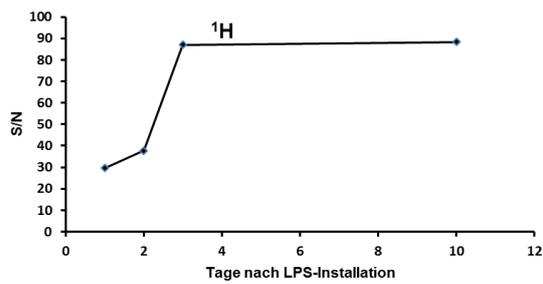
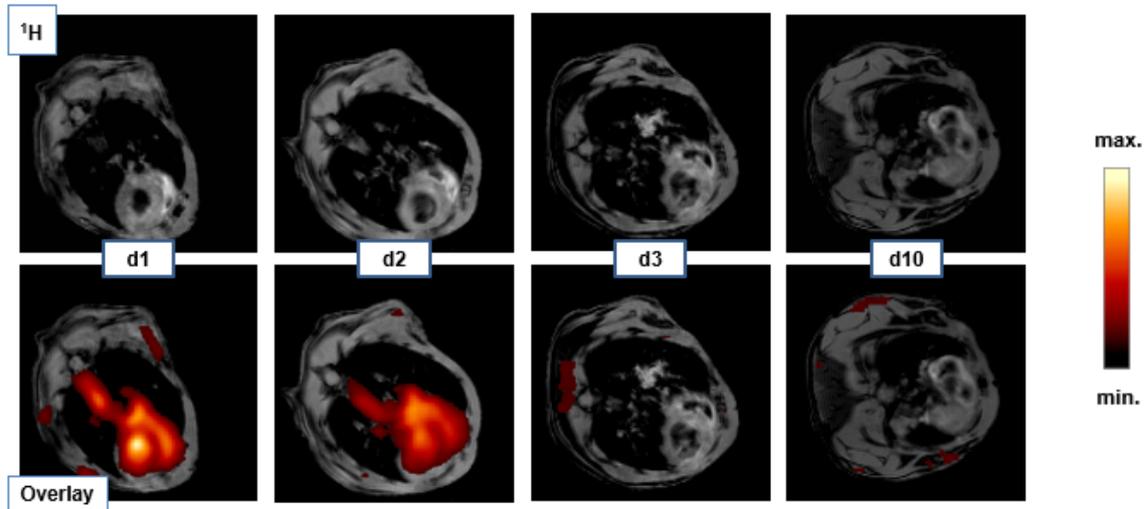
Auch in dieser Versuchsreihe (n=4) kann zuverlässig ein pneumonisches Infiltrat im Protonenbild identifiziert werden. Exemplarisch werden zwei Experimentalreihen näher dargestellt (siehe Abbildung 21 und 22, Seite 45-46), wobei bei einer ein vergleichsweise kleines Infiltrat im Protonenbild zur Darstellung kommt. Die Abbildung 23 (siehe Seite 47) zeigt grafisch den Verlauf des Protonen- sowie des Fluorsignals im Pneumoniegebiet für alle Experimentalreihen (n=4). Obwohl auch in dieser Versuchsreihe eine Kolokalisation des Fluor- mit dem Protonensignal im Entzündungsgebiet erkennbar ist, weist die Substanz im Vergleich zu *PFD* und *F-44E* die kleinsten maximalen Signal-zu-Rausch-Verhältnisse von ca. 3 bis 8.5 auf. Auffällig ist, dass im weiteren zeitlichen Verlauf ein deutliches Fluorsignal in der Thoraxwand im Bereich des Fettgewebes zu verzeichnen ist (siehe Abbildung 20).



**Abb. 20: PFOB-Ablagerung in der Thoraxwand**

Dargestellt ist ein *Screenshot* aus dem *CSI-Tool*: Links im Bild ist der  $^1\text{H}$ -Scan zu sehen, rechts daneben der anatomisch korrespondierende *CSI-Scan* mit einem deutlichen Signal in der Thoraxwand.

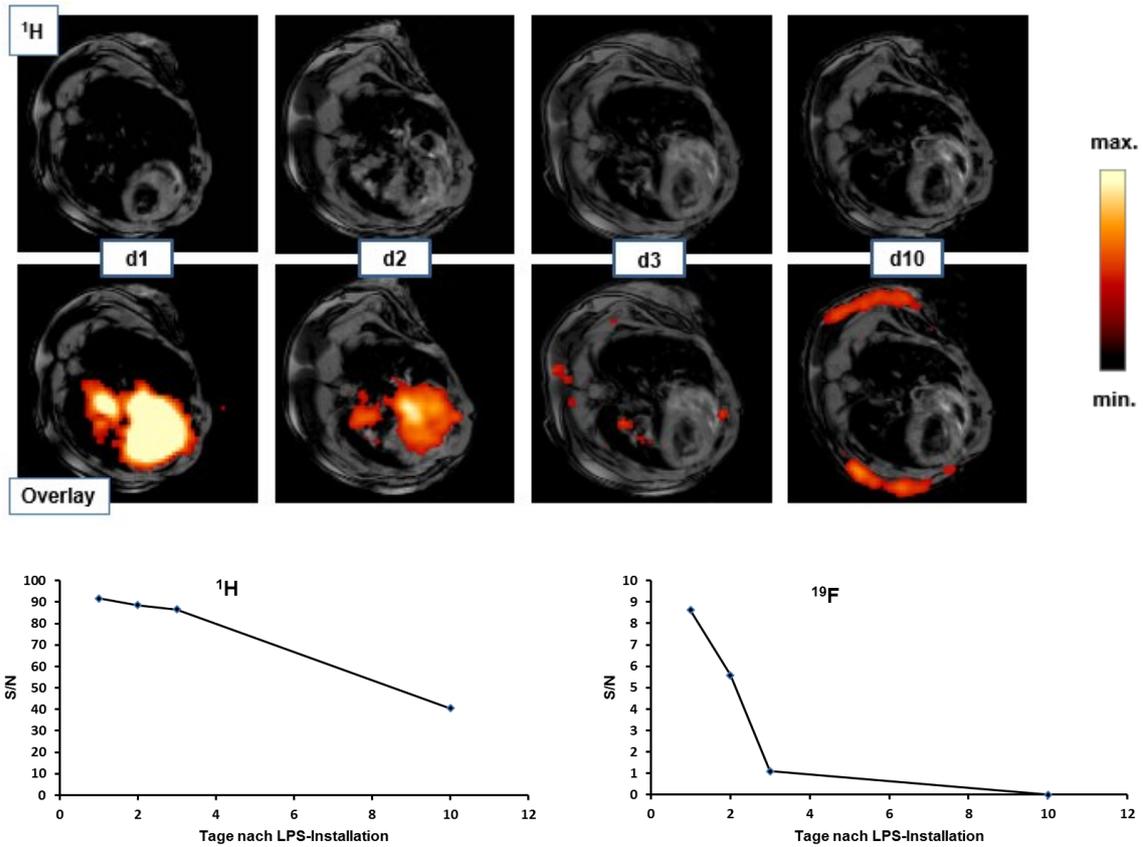
### PFOB-Experiment I



#### Abb. 21: Pneumoniedetektion mittels PFOB: Experiment I

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf des  $^1\text{H}$ - sowie des  $^{19}\text{F}$ -Signals im Pneumoniegebiet (d = Tage nach LPS-Installation). **Oben:** Axiale  $^1\text{H}$ -Scans durch das Pneumoniegebiet sowie **Overlays** mit dem  $^{19}\text{F}$ -Bild. Das  $^{19}\text{F}$ -Signal ist farblich kodiert (siehe rechts). **Unten:** Grafische Darstellung der Signalverläufe (angegeben als Signal-zu-Rausch-Verhältnis, S/N). Bei dieser Experimentalreihe zeigt sich ein vergleichsweise kleines Infiltrat im Protonenbild.

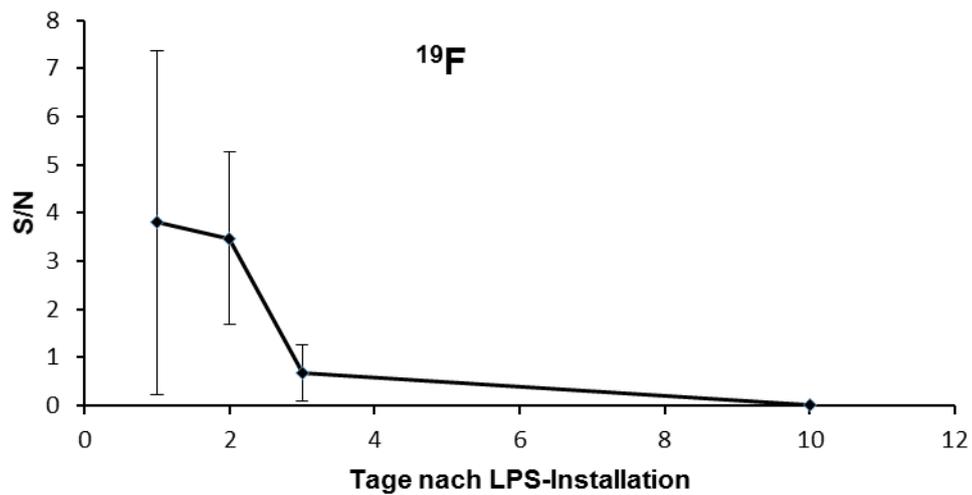
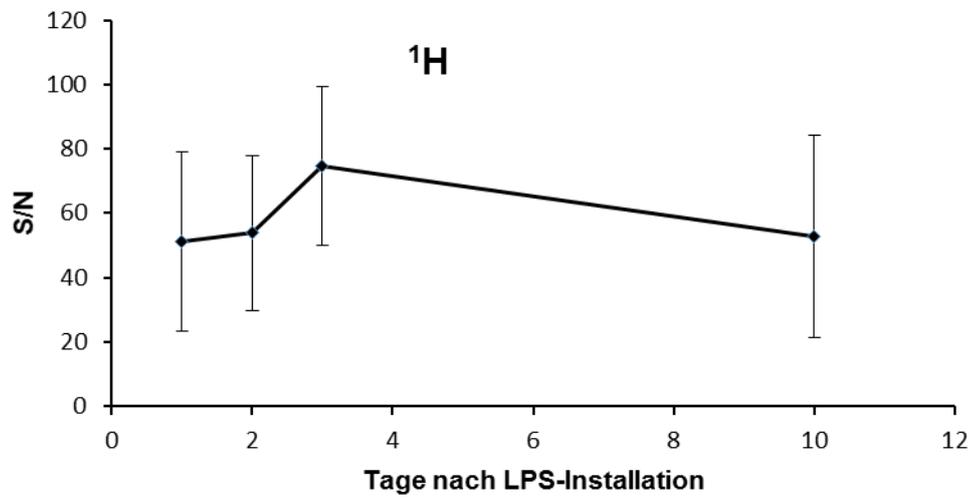
## PFOB-Experiment II



**Abb. 22: Pneumoniedetektion mittels PFOB: Experiment II**

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf des  $^1\text{H}$ - sowie des  $^{19}\text{F}$ -Signals im Pneumoniegebiet (d = Tage nach LPS-Installation). **Oben:** Axiale  $^1\text{H}$ -Scans durch das Pneumoniegebiet sowie *Overlays* mit dem  $^{19}\text{F}$ -Bild. Das  $^{19}\text{F}$ -Signal ist farblich kodiert (siehe rechts). **Unten:** Grafische Darstellung der Signalverläufe (angegeben als Signal-zu-Rausch-Verhältnis, S/N).

## Zusammenfassung



**Abb. 23: Pneumoniedetektion mittels PFOB: Zusammenfassung**

Zusammenfassung ( $n=3$ ) der zeitlichen Verläufe des  $^1\text{H}$ - sowie des  $^{19}\text{F}$ -Signals (angegeben als Signal-zu-Rausch-Verhältnis, S/N) im Pneumoniegebiet nach *LPS-Installation*. Gezeigt sind die jeweiligen Mittelwerte sowie die Standardabweichungen.

## 4 Diskussion und Schlussfolgerungen

### 4.1 Auswaschkinetik der Perfluorcarbone

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Perfluorcarbone *PFD*, *PFOB* sowie *F-44E* in einem vernünftigen Zeitintervall nach *intravenöser* Applikation einer vergleichsweise hohen Dosis aus dem Mäusemodell eliminiert werden. Hierzu wurden umfassende kinetische Profile erstellt.

Bei intravasaler Applikationsform ist definitionsgemäß von einer hundertprozentigen Bioverfügbarkeit auszugehen. Die initiale Eliminierung der *PFC* aus dem Blutkreislauf wird durch Aufnahme in das retikuloendotheliale System sowie bereits beginnende pulmonale Elimination erklärt [32-34]. *PFC* werden durch zirkulierende Monozyten/Makrophagen aufgenommen [5] und durch diese in das RES transportiert [25]. Die Phagozytoserate steigt mit zunehmender Partikelgröße [35]. Unter dem retikuloendothelialen System wird die Gesamtheit aller phagozytoseaktiven Zellen der verschiedenen Körperhöhlen und Gewebe verstanden. In der Leber werden diese beispielsweise als Kupffersche Sternzellen bezeichnet, in der Milz als Splenozyten.

Da die gemessene <sup>19</sup>F-MR-Intensität direkt mit der Menge an *PFC* korreliert [2], ist der Verlauf der *PFC-Plasmakonzentration* über den Verlauf der <sup>19</sup>F-MR-Intensität in den Herzkammern abschätzbar (siehe Kapitel 3.1). Hierdurch konnten die Plasmahalbwertszeiten ermittelt werden. Man geht von einer dosisabhängigen Plasmahalbwertszeit der *PFC* [36] aus. In dieser Arbeit zeigte sich eine Plasmahalbwertszeit von ca. 3 Tagen für *F-44E* (bei 13.29 g *PFC*/kg KG), eine von ca. 2 Tagen für *PFOB* (bei 10.24 g *PFC*/kg KG) sowie eine von ca. 1.75 Tagen für *PFD* (10.4 g *PFC*/kg KG). In der Literatur ist eine Plasmahalbwertszeit im humanen Organismus für *Oxygent<sup>TM</sup>* (eine Emulsion aus Perfluorooctylbromid (58% w/v) und Perfluorodecylbromid (2% w/v), von  $9,4 \pm 2,2$  h bei einer Dosis von 1.8 g/kg Körpergewicht beschrieben [36]. Ebenfalls im humanen Organismus ist für die Substanz Fluosol-DA 20% (Perfluordecalin 14% w/v, Perfluomtripropylamin 6% w/v) eine dosisabhängige Plasmahalbwertszeit von 7.5 bis 22 h bei einer Dosis von 10 bis 30 ml/kg Körpergewicht bekannt [37]. Folglich finden sich bei den hier verwendeten hohen Dosierungen im Mäusemodell deutlich längere Plasmahalbwertszeiten, jedoch liegen diese noch im niedrigen einstelligen Tagebereich.

Die meisten *PFC* werden pulmonal eliminiert [21-24]. Je höher der Dampfdruck des jeweiligen *PFC* ist, desto größer ist die direkte Verdampfung aus den Partikeln vor Aufnahme in das RES [34;38]. Nach der Aufnahme der emulgierten *PFC* in die verschiedenen Organe des RES kommt es zu einem langsamen Zerfall der *PFC-Partikel* mit Wiederaufnahme in den Blutkreislauf. Jedoch sind diese dann an Blutlipide gebunden und werden mit Hilfe dieser zum Exkretionsorgan transportiert. Hierbei gilt, dass die Wiederaufnahme in den Blutkreislauf mit zunehmender Lipophilie und abnehmender molekularer Masse steigt [20;38;39]. Dieser Umverteilungsprozess wird durch die Gewebelagerungszeiten der RES-Organe kinetisch beschrieben. Für die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen *F-44E*, *PFOB* sowie *PFD* wird ebenfalls eine fast vollständige pulmonale Elimination beschrieben [6]. Darüber hinaus geht man von einer zusätzlichen minimalen transdermalen Elimination aus [40]. Zumindest im humanen Organismus ist kein Metabolismus der verabreichten *PFC* bekannt [32-34]. Die Eliminationskinetik bzw. Eliminationsart hängt von einer Vielzahl von Faktoren ab: von der Spezies, der Stabilität der Emulsion, ebenso von der molekularen Masse und der Struktur der *PFC-Moleküle* sowie maßgeblich vom jeweiligen Dampfdruck.

In dieser Arbeit wurden gewebebezogene Halbwertszeiten in Leber und Milz, als Hauptvertreter des RES, für die *F-44E*-, *PFD*- sowie *PFOB-Emulsion* im Mäusemodell ermittelt (siehe Kapitel 3.1): für *F-44E* zeigte sich eine Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) in der Leber von ca. 19 Tagen bei einer Dosierung von 13.3 g/kg KG sowie eine von ca. 6 Tagen bei einer Dosierung von 5.3 g/kg KG. Folglich ist eine deutliche Dosisabhängigkeit der Halbwertszeiten erkennbar. In der Milz zeigte sich hingegen eine  $t_{1/2}$  von etwa 16 Tagen (bei 5.3 g/kg KG). Bei der *PFOB-Emulsion* ergaben sich Halbwertszeiten von ca. 2 Tagen in der Leber und ca. 3 Tagen in der Milz (bei 4.56 g PFC/kg KG). *PFD* führte als einzige Substanz zu keiner nachweisbaren Ablagerung in der Leber. Es zeigte sich eine  $t_{1/2}$  in der Milz von etwa 4.5 Tagen bei einer Dosierung von 4.6 g PFC/kg KG.

In der Literatur sind bei Ratten für *PFOB* biologische Halbwertszeiten von 3.7 bis 11 Tagen bei einer Dosis von 1.5 bis 5 g/kg Körpergewicht beschrieben [41], für den humanen Organismus wird bei einer Dosis von 2.7 g/kg Körpergewicht eine Halbwertszeit von 3 Tagen genannt [20]. Für *F-44E* wird eine Halbwertszeit von 6 bis 7 Tagen aufgeführt [20]. Bei der hier verwendeten *2D-CSI-Methode* ist die Betrachtung einer repräsentativen Schicht durch ein Organ notwendig. Mittlerweile wurde dieses Verfahren zum *3D-CSI-Methode* weiterentwickelt. Bei diesem Verfahren ist die Betrachtung des gesamten Organs möglich. Die Ergebnisse dieser Arbeit gaben Anlass, mithilfe der 3D-

Methode eine erneute kinetische Versuchsreihe mit zum Teil höheren Dosierungen durchzuführen. Aus unserer Arbeitsgruppe ermittelten daher Jacoby et al. [25] bei Dosierungen von bis zu 14 g/kg KG folgende Halbwertszeiten im Mäusemodell: 12 Tage für *PFOB*, 9 Tage für *PFD* sowie 28 Tage für *F-44E*. Konsistent zu den hier vorliegenden Ergebnissen zeigten sich für *F-44E* die mit Abstand längste Halbwertszeit, sowie vergleichbare Halbwertszeiten für *PFD* und *PFOB*. Die längeren Halbwertszeiten bei Jacoby et al. sind am ehesten auf die höheren Dosierungen zurückzuführen. Für *F-44E* zeigt sich nämlich bei vergleichbarer Dosierung bei beiden Untersuchungsreihen eine ähnliche Halbwertszeit in der Leber (ca. 16 Tage bei Jacoby et al. im Vergleich zu ca. 19 Tagen in dieser Arbeit). Die raschere Elimination von *PFOB* aus dem RES im Vergleich zu *F-44E* könnte durch die höhere Lipophilie und die damit erhöhte Bindung an Plasmalipide erklärt werden [25]. Unmittelbare Verdampfung ist voraussichtlich der primäre Eliminationsweg für *PFD* [25]. Daher könnte die über die Kinetik im RES ermittelte biologische Halbwertszeit für *PFD* überschätzt sein. Möglicherweise wird ein großer Anteil vor Aufnahme in das RES pulmonal eliminiert. Der fehlende Nachweis eines Fluorsignals für *PFD* in der Leber bei der hier verwendeten Dosierung könnte hierüber erklärt werden.

Im Rahmen von Arzneimittelzulassungsverfahren der auf emulgierten Perfluorcarbonen basierenden Blutersatzstoffe *Oxyfluor<sup>TM</sup>* und *Oxygent<sup>TM</sup>* ist ein umfassendes Sicherheitsprofil erstellt worden. Zumindest wurden unter den verwendeten Dosierungen (unterhalb von 2g/kg Körpergewicht) keine längerfristigen bzw. schwerwiegenden Nebenwirkungen bei der Anwendung beschrieben [19]: Insbesondere gab es keine Hinweise auf hämodynamische Effekte sowie *renale, hepatische oder pulmonale* Organdysfunktionen. Ein zum Teil beobachteter Körpertemperaturanstieg sowie grippeähnliche Symptome werden auf die Stimulation des Immunsystems zurückgeführt. Darüber hinaus wurde je nach Dosierung ein milder transientser Thrombozytenabfall beschrieben [19]. Flögel et al. [2] konnten im *murinen* Modell ebenfalls keine schwerwiegenden Nebenwirkungen beobachten. Trotz längerfristiger Ablagerung des verwendeten Kronenethers im RES zeigte sich kein Anstieg der Leberenzymwerte. Der Kronenether, ein Vertreter aus der Substanzgruppe der *PFC* mit sehr guten Eigenschaften in der MR-Bildgebung, hat eine sehr lange biologische Halbwertszeit im RES von mehreren Monaten [20]. Diese Tatsache schließt eine zumindest zeitnahe erneute Anwendung aus. Außerdem sind Spätfolgen nicht gänzlich auszuschließen.

Verglichen mit der sehr langen Halbwertszeit des Kronenethers von mehreren Monaten zeigten sich in dieser Arbeit für die verwendeten *PFC-Emulsionen* trotz vergleichsweise hoher Substanzdosierungen deutlich kürzere Eliminationszeiten aus dem Maus-Modell.

## 4.2 Pneumoniemodell

In vorangegangenen Experimenten wurde mithilfe des *PFCE* gezeigt, dass sich *intravenös* applizierte emulgierte Perfluorcarbone zur spezifischen, frühen Darstellung von inflammatorischen pulmonalen Prozessen eignen [5]. Intravenös applizierte *PFC* werden primär von Monozyten und zu einem geringeren Anteil von Neutrophilen *phagozytiert* und mit diesen dann in das jeweilige Entzündungsgebiet transportiert [5]. Aufgrund des fehlenden biologischen Fluorhintergrundes ist eine hohe Spezifität des Fluorsignals vorhanden [5]. Der verwendete *PFCE* besitzt zwar optimale Signaleigenschaften, lagert sich jedoch langfristig im Körper ab (siehe Kapitel 1.4). Diese Tatsache schließt eine zeitnahe erneute Anwendung aus. Außerdem sind Spätfolgen nicht gänzlich auszuschließen. Wie in Kapitel 3.1 gezeigt, lagern sich andere emulgierte *PFC* (*PFD*, *PFOB* sowie *F-44E*) nicht langfristig im Körper ab, sondern werden innerhalb weniger Tage (*PFD* und *PFOB*) bzw. weniger Wochen (*F-44E*) primär *pulmonal* eliminiert. Diese *PFC* führen in der konventionellen MR-Bildgebung aufgrund ihrer chemischen Struktur jedoch zu Artefakten. Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Substanzen *PFD*, *PFOB* sowie *F-44E* unter Verwendung des *Chemical Shift Imagings* (siehe Kapitel 3.2) dazu eignen, *pneumonische* Prozesse artefaktfrei darzustellen. In den durchgeführten Experimenten zeigte sich eine Kolokalisation des Fluorsignals mit den Infiltraten in der Protonenbildgebung. In Kontrollexperimenten (*PFC*-Injektion ohne Induktion einer Pneumonie) zeigte sich kein über das Rauschen hinausgehendes Fluorsignal im Bereich der Lunge (Daten nicht gezeigt). Jacoby et al. untersuchten mit in diesen Experimenten vergleichbaren *PFC-Emulsionen* (bei einer Dosis von bis zu 14 g *PFC*/kg *KG*) die *in-vitro*-Sensitivität mit einer *3D-CSI-Methode* (siehe Kapitel 4.1) [25]. Die höchste Sensitivität zeigte sich für *F-44E*, gefolgt von *PFOB*, während die *PFD-Emulsion* die schlechteste Sensitivität aufwies. Letzteres hat nach Jacoby et al. zwei Gründe: zum einen werden nur 16 von insgesamt 18 Fluoratomen aufgrund der Spektralfenstersetzung berücksichtigt, zum anderen tragen nicht alle Fluoratome aufgrund der Koexistenz zweier *Diastereomere* zum <sup>19</sup>F-Signal bei. Des Weiteren verglichen Jacoby et al. anhand eines einfachen Entzündungsmodells, dem Ohr-Klipping, die *in-vivo-Sensitivität* der verschiedenen Substanzen [25]. Analog zu den *in-vitro-Experimenten* zeigte sich für *F-44E* die größte Sensitivität, für *PFOB* die zweitbeste. *In vivo* wurden für *PFD* noch schlechtere Werte als *in vitro* ermittelt. *PFD* besitzt im Vergleich zu den anderen beiden Substanzen die kleinste molekulare Masse. Es resultiert eine geringere Phagozytoserate von *PFD* und damit eine

geringere Migration mit den Makrophagen in das Entzündungsgebiet [25]. Bedingt durch die niedrige molekulare Masse sowie einen vergleichsweise hohen Dampfdruck kommt es zu einer effizienten Verdampfung und damit Abatmung über die Lunge [25]. In dieser Arbeit wurde als Maß für die Sensitivität das maximale Signal-zu-Rausch-Verhältnis im Pneumoniegebiet während einer Versuchsreihe herangezogen. Für *F-44E* zeigten sich die mit Abstand größten maximalen S/N-Werte von ca. 35. Für *PFD* konnten die zweithöchsten S/N-Verhältnisse von ca. 7-11 ermittelt werden. Im Gegensatz zum Entzündungsmodell Ohr-Klipping zeigte sich im Pneumoniemodell die geringste Sensitivität für *PFOB* mit S/N-Werten von ca. 3-8.5. Denkbar sind folgende Erklärungen für die diskrepanten Ergebnisse zwischen den Entzündungsmodellen in Hinblick auf die höhere Sensitivität für *PFD* im Pneumoniemodell: möglicherweise ist die Abatmung über die beschädigte Lunge eingeschränkt, und konsekutiv steht mehr *PFD* zur Phagozytose bereit, welches mit den Entzündungszellen zum *Inflammationsgebiet* transportiert werden kann. Darüber hinaus könnte eine vermehrte *PFD*-Aufnahme durch aktivierte ortsständige Alveolarmakrophagen das *PFD*-Signal erhöhen. Das Pneumoniemodell ist als deutlich störanfälliger im Vergleich zum Ohr-Klipping-Modell anzusehen. In dieser Arbeit wurde nach LPS-Installation das größte induzierte Pneumoniegebiet (Hauptpneumoniegebiet) im Protonenbild ermittelt und weiter untersucht. Durch die *intratracheale* Applikationsart des LPS war nicht exakt bestimmbar, wie viel LPS das Hauptpneumoniegebiet induziert hat bzw. wieviel LPS in andere Lungenabschnitte geraten ist.

In zwei unterschiedlichen Entzündungsmodellen (Ohrklipping sowie Pneumonie) sowie dem *in-vitro-Experiment* von Jacoby et al. zeigten sich für *F-44E* die mit Abstand besten Sensitivitätswerte. Beim Pneumoniemodell kam es in der *F-44E-Versuchsreihe* zum Versterben einiger Mäuse ohne direkt erkennbaren Grund. Möglicherweise wurden bei diesen überdurchschnittlich schwere Pneumonien induziert und die Sensitivitätswerte hierdurch überschätzt.

Im zeitlichen Verlauf der Pneumonieexperimente ist für *PFOB* in dieser Arbeit ein zunehmendes Fluorsignal in der Thoraxwand zu beobachten mit Ursprung im Fettgewebe. Bei den anderen *PFC-Emulsionen* konnte dies nicht beobachtet werden. *PFOB* weist aufgrund des eingefügten Bromatoms im Vergleich zu anderen *PFC* eine gewisse Lipophilie auf [20]. Beispielsweise zeigt *PFOB* eine Löslichkeit von 37 mmol L<sup>-1</sup> in Olivenöl, hingegen *PFD* nur eine von 4.6 mmol L<sup>-1</sup> [20]. Durch das zusätzliche Verteilungskompartiment Fettgewebe steht möglicherweise weniger *PFOB* zur Phagozytose sowie zur Darstellung von Entzündungsprozessen bereit.

Bei allen *PFC-Emulsionen* klingt das Fluorsignal im Pneumoniegebiet deutlich rascher ab als das Protonensignal. In der Protonenbildgebung ist eine sichere Unterscheidung zwischen noch akuter Inflammation und bereits begonnenen Umbauvorgängen bzw. Ödemen nicht möglich. Das abnehmende Fluorsignal spiegelt am ehesten einen Rückgang der Inflammation wieder. Folglich ist mithilfe der Fluorbildgebung ein besseres *Monitoring* der Inflammation möglich. Darüber hinaus könnte eine Elimination der *PFC* aus dem Organismus zum abnehmenden Fluorsignal beitragen. Um dies näher zu klären, könnte man in weiteren Experimenten histologische Aufarbeitungen sowie Korrelationen mit biochemischen Entzündungsparametern heranziehen.

Zusammenfassend zeigten sich für *F-44E* die mit weitem Abstand höchsten Sensitivitätswerte. Allerdings besitzt sie die längsten biologischen Halbwertszeiten verglichen mit *PFD* sowie *PFOB*. Eine Dosisreduktion um etwa die Hälfte führt jedoch zu einer Verkürzung der Gewebelbhalbwertszeit in der Leber um ca. 70% (siehe Kapitel 3.1). Es bleibt daher zu klären, ob sich bei geringeren Dosierungen noch ausreichend hohe Sensitivitätswerte zeigen.

Obwohl mit *PFD* und *PFOB* ebenfalls die Darstellung von pneumonischen Prozessen gelingt, lassen die Ergebnisse dieser Versuchsreihe *F-44E* als die geeignetste Substanz zur Darstellung pneumonischer Prozesse erscheinen. Bei schon bekanntem Sicherheitsprofil von *PFC* im menschlichen Organismus ist eine humane Anwendung in Zukunft durchaus denkbar.

## 5 Quellenverzeichnis

- [1] Rummerny EJ, Reimer P, Heindel W. Ganzkörper-MR-Tomographie. 2. Auflage, Stuttgart 2006.
- [2] Flögel U, Ding Z, Hardung H, Jander S, Reichmann G, Jacoby C, Schubert R, Schrader J. In vivo monitoring of inflammation after cardiac and cerebral ischemia by fluorine magnetic resonance imaging. *Circulation* 2008 Jul 8;118 (2):140-8.
- [3] Van Furth, R. Phagocytic cells: development and distribution of mononuclear phagocytes in normal steady state and inflammation. In *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. J.I. Gallin, I.M. Goldstein, and R. Snyderman, editors. Raven Press 1988, New York, 281-295.
- [4] Welbourn, C.R.B., and Y. Young. Endotoxin: septic shock and acute lung injury: neutrophils, macrophages and inflammatory mediators. *Br. J. Surg.* 1992, 79:998-1003
- [5] Ebner B, Behm P, Jacoby C, Burghoff S, French BA, Schrader J, Flögel U. Early assessment of pulmonary inflammation by <sup>19</sup>F MRI in vivo. *Circ Cardiovasc Imaging.* 2010 Mar; 3 (2):202-10.
- [6] Spahn DR. Blood substitutes. *Crit. Care* 1999; 3: R91–R92.
- [7] Lopez AD, Murray CC. The global burden of disease, 1990–2020. *Nat Med.* 1998; 4: 1241–1243 (5).
- [8] Marrie TJ, Lau CY, Wheeler SL et al. A controlled trial of a critical pathway for treatment of community-acquired pneumonia. CAPITAL Study Investigators. *Community-Acquired Pneumonia Intervention Trial Assessing Levofloxacin.* *JAMA* 2000; 283: 749–755 (1b).
- [9] BQS-Qualitätsreport 2007. ISBN 978-3-9-812-495-0-7.
- [10] Epidemiologie, Diagnostik und Therapie erwachsener Patienten mit nosokomialer Pneumonie, S-3 Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin e.V., der Deutschen Gesellschaft für Infektiologie e.V., der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e.V., der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. und der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V, *Pneumologie* 2012; 66: 707–765, Stuttgart New York, ISSN 0934-8387.

- [11] Schilling RS, Hughes JP, Dingwall-Fordyce I. Disagreement between observers in an epidemiological study of respiratory disease. *Br Med J* 1955; 4905: 65–68 (4).
- [12] Spiteri MA, Cook DG, Clarke SW. Reliability of eliciting physical signs in examination of the chest. *Lancet* 1988; 1: 873–875 (2b).
- [13] Melbye H, Dale K. Interobserver variability in the radiographic diagnosis of adult outpatient pneumonia. *Acta Radiol* 1992; 33: 79– 81 (2b).
- [14] Young M, Marrie TJ. Interobserver variability in the interpretation of chest roentgenograms of patients with possible pneumonia. *Arch Intern Med* 1994; 154: 2729–2732 (2b).
- [15] Beydon L, Saada M, Liu N et al. Can portable chest x-ray examination accurately diagnose lung consolidation after major abdominal surgery? A comparison with computed tomography scan. *Chest* 1992; 102: 1697–1703.
- [16] Weishaupt D, Köchli VD, Marincek B. *Wie funktioniert MRI?. 6. Auflage, Heidelberg 2009*
- [17] Brateman L. Chemical shift imaging: a review\_ *AJR Am J Roentgenol* 1986 May; 146(5): 971-80.
- [18] Becker ED. *High resolution NMR: theory and chemical applications. 2nd ed. New York: Academic press, 1980:55-84*
- [19] Donat R Spahn. Blood substitutes Artificial oxygen carriers: perfluorocarbon emulsions. *Crit Care. 1999; 3(5): R93–R97.*
- [20] Riess JG. Oxygen carriers ("blood substitutes") – raison d’Etre, chemistry, and some physiology. *Chem. Rev. 2001; 101: 2797–2919.*
- [21] Geyer RP. PFC as blood substitutes-an overview. *Prog. Clin. Biol. Res. (1983), 122, 157-168.*
- [22] Naito R and Yokoyama K, The Green Cross Corp. *Technical Inform. Ser. No. 5. Osaka, Japan (1981).*
- [23] Suyama T, Watanabe M and Yokoyama K, Bolin in RB, Geyer RP, and Nemo GJ (eds.). *Advances in Blood Substitute Research. Alan R. Liss, New York, 1983, p. 452.*
- [24] Tsuda Y, Yamanouchi K, Yokoyama K, Suyama T, Watanabe M, Ohyanagi H, Saitoh Y, Chang in TM, and Geyer RP (eds.). *Blood Substitutes. Dekker, New York 1989, pp. 473-483.*
- [25] Jacoby C, Temme S, Mayenfels F, Benoit N, Krafft MP, Schubert R, Schrader J, Flögel U. Probing different perfluorocarbons for in vivo inflammation imaging by

- 19F MRI: image reconstruction, biological half-lives and sensitivity. *NMR Biomed.* 2014 Mar; 27(3): 261-71
- [26] Nosé Y, Kon T, Weber D, Mrava G, Malchesky P, MacDermott H, Williams C, Lewis L, Hoffman G, Willis C, Deodhar S, Harris G, Anderson RY. Physiological effects of intravascular fluorocarbon liquids. *Fed. Proc* 1970 , 29: 5, 1789-1804.
- [27] Kaisers U, Kelly KP, Busch T. Liquid ventilation. *Br J Anaesth* 2003, 91(1):143-51.
- [28] Wehling M. *Klinische Pharmakologie*. Stuttgart 2005
- [29] Guttendorf R. Meeting the demands of regulatory requirements: the significance of ADM. *Bioanalysis* 2012, 1395-7.
- [30] Neumüller O-A. *Römpps Chemie Lexikon*. Stuttgart 1983.
- [31] Roth S E. *Lexikon der Pharmazie*. Stuttgart-New York 1987.
- [32] Keipert PE. Perfluorochemical emulsions: future alternatives to transfusion. *Blood Subst Princ Meth Prod Clin Trials* 1998; 2: 127–156.
- [33] Spahn DR, Leone BJ, Reves JG, Pasch T: Cardiovascular and coronary physiology of acute isovolemic hemodilution: a review of nonoxygen-carrying and oxygen-carrying solutions. *Anesth Analg* 1994; 78: 1000–1021.
- [34] Riess JG: Overview of progress in the fluorocarbon approach to in vivo oxygen delivery. *Biomater Artif Cells Immobil Biotechnol* 1992; 20:183–202.
- [35] Riess JG, Leblanc M. Solubility and transport phenomena in perfluorochemicals relevant to blood substitution and other biomedical applications. *Pure Appl. Chem.* 1982; 54: 2383–2406.
- [36] Riess JG, Keipert PE. Update on perfluorocarbon-based oxygen delivery systems. In: *Blood Substitutes: Present and Future Perspectives*. Edited by Tsuchida E. Lausanne: Elsevier Science SA, 1998: 91–102.
- [37] Yokoyama K, Watanabe M, Naito R, in Frey R, Beisbarth H, Stosseck K (eds.). *Oxygen Carrying Colloidal Blood Substitutes*. Vth Intern. Symp. On Perfluorochemical Blood Substitutes, Munchen 1981, pp. 214-219.
- [38] Flaim SF. Pharmacokinetics and side effects of perfluorocarbon based blood substitutes. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 1994; 22: 1043–1054.
- [39] Weers JG. A physicochemical evaluation of perfluorochemicals for oxygen transport applications. *J. Fluorine Chem.* 1993; 64: 73–93.

- [40] Ravis WR, Hoke JF, Parsons DL. Perfluorochemical erythrocyte substitutes: disposition and effects on drug distribution and elimination; *Drug metabolism reviews* 1991, 23(3&4), 375-411.
- [41] Mitten RM, Burgan AR, Hamblin A, Yee G, Long DC, Long DM, Mattrey RF. *Biomater. Artif. Cells Artif. Organs* 1988. 16, 683.

### **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

15.07.2015, Patrick Behm

## 6 Danksagung

Bei **Prof. Dr. med. Jürgen Schrader** möchte ich für die Bereitstellung des hochinteressanten Themas sowie die hilfreiche Unterstützung in der Planung und Durchführung dieser wissenschaftlichen Arbeit bedanken.

Ebenfalls möchte ich bei meinem Betreuer **Prof. Dr. Ulrich Flögel** für seine tatkräftige Unterstützung bedanken.

Insbesondere möchte ich mich bei **Dr. Christoph Jacoby** für seine große Hilfe bei der Planung, Durchführung sowie Auswertung bedanken. Seine äußerst konstruktive sowie ideenreiche Kritik haben wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Ferner hat er große Hilfestellung in der Durchführung der MRT-Messungen geleistet. Dankbar anerkennen will ich auch seine große Geduld.

Ein ganz besonderer Dank geht an **alle Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen des Instituts** für die sehr gute Zusammenarbeit.

Ein besonderer Dank geht auch an meine **Eltern**, die mir das Studium der Humanmedizin als Grundvoraussetzung für die Promotion ermöglichten.

Tief verbunden und außerordentlich dankbar bin ich meiner Ehefrau, **Sabrina Behm**, für ihre sehr hilfreiche Unterstützung und ihr Verständnis bei der Anfertigung dieser Arbeit und möchte Ihr diese Arbeit widmen.