

Aus dem Institut für Molekulare Kardiologie der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Flögel

**Bildgebende Darstellung verschiedener  
Zelltypen mittels  
Multispektraler  $^1\text{H}$ -/ $^{19}\text{F}$ -MRT**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnmedizin (Dr. med. dent.)  
der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

*Arthur Zielinski*

aus Viersen

Düsseldorf, 2024

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Herr PD Dr. Sebastian Temme

Zweitgutachter: Frau Prof. Dr. Maria Grandoch

*Für meine Familie*

*"Der Wunsch, klug zu erscheinen, verhindert oft es zu werden."  
- Francois de La Rochefoucauld*

## ZUSAMMENFASSUNG (DEUTSCH)

Die Entstehung und der Verlauf vieler Krankheiten werden von hochkomplexen entzündlichen Prozessen beeinflusst, die mehrere Stadien durchlaufen. An ihnen sind eine Vielzahl verschiedener Zelltypen beteiligt. Eine nicht-invasive Darstellung von verschiedenen immunologisch relevanten Zellen innerhalb eines entzündlichen Bereiches wäre von großem Vorteil, um den aktuellen Zustand der entzündlichen Läsion genauer darstellen und bewerten zu können. Eine prinzipielle Möglichkeit zur nicht-invasiven Visualisierung mehrerer Zellarten liegt in der Markierung von Zellen mit sogenannten Perfluorkarbon-Nanoemulsionen (PFCs) und deren Detektion mittels sogenannter  $^{19}\text{F}$ -Magnetresonanztomographie ( $^{19}\text{F}$ -MRT).

Zur Ermöglichung der Darstellung von vier unterschiedlichen Zelltypen mittels  $^{19}\text{F}$ -MRT wurden in der vorliegenden Arbeit durch Hochdruck-Homogenisation vier Perfluorkarbon-Nanoemulsionen (PFCs) mit individuellen  $^{19}\text{F}$ -Signaturen hergestellt. Hierzu wurden folgende Perfluorkarbone verwendet: Perfluor-n-octan (PFnO), Perfluor-1,3,5-trimethylcyclohexan (PFCH), Perfluor-15-kronen-5-ether (PFCE) Perfluor-tert-butylcyclohexan (PFTBH). Um die zelluläre Aufnahme über Durchflusszytometrie oder Mikroskopie untersuchen zu können, wurden bei der Herstellung zudem fluoreszenzmarkierte Lipide (Atto425-, Atto488-, Atto647-, oder Atto700-DPPE (1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin)) hinzugefügt, wodurch folgende PFCs hergestellt wurden:  $^{A425}\text{PFnO}$ ,  $^{A488}\text{PFCH}$ ,  $^{A647}\text{PFCE}$ ,  $^{A700}\text{PFTBH}$ . Die PFCs wurden mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS), fluoreszenzbasierten Methoden und  $^{19}\text{F}$ -Spektroskopie charakterisiert. Die DLS-Messungen ergaben bei allen PFCs einen Durchmesser von 100-150 nm und ein  $\zeta$ -Potential von ca. -30 mV. Jedoch variierten die Polydispersitäts-Indices zwischen 0.1 – 0.5. IVIS-Messungen und Fluoreszenzspektroskopie zeigten, dass alle PFCs die erwarteten Fluoreszenzeigenschaften aufwiesen. Die  $^{19}\text{F}$ -Messungen erfolgten an einem 9.4 T AVANCE III NMR-Spektrometer und  $^{19}\text{F}$ -Spektren wurden durch  $^{19}\text{F}$ -Singlepulse-NMR-Messungen oder *Chemical Shift Imaging* (CSI) ermittelt. Die  $^{19}\text{F}$ -Signalintensitäten wurden durch Integration der Haupt- $^{19}\text{F}$ -Signalspitzen bestimmt. Im nächsten Schritt wurde die passive zelluläre Aufnahme aller PFCs durch J774A.1-Makrophagen mittels IVIS, Durchflusszytometrie und  $^{19}\text{F}$ -MRT untersucht. Hierdurch konnte nachgewiesen werden, dass alle PFCs von J774A.1-Zellen aufgenommen werden. Schließlich wurden vier unterschiedliche Zelllinien (THP-1, WEHI, HL-60 und CHO) mit je einem PFC-Typ markiert. Mittels  $^{19}\text{F}$ -CSI Messungen konnten diese Zellen simultan anhand des individuellen  $^{19}\text{F}$  Spektrums der jeweiligen PFCs-Variante dargestellt werden.

Schlussfolgernd lässt sich anhand der Ergebnisse dieser Arbeit sagen, dass die Multispektrale  $^{19}\text{F}$ -MRT-Bildgebung anhand von vier verschiedenen PFCs für die gleichzeitige Darstellung von vier verschiedenen Zellsubpopulationen geeignet ist. In Zukunft sind weitere Untersuchungen notwendig sind, um die Methode für klinische Anwendungsgebiete zu optimieren.

## ZUSAMMENFASSUNG (ENGLISCH)

Development and progression of many diseases is associated with highly complex inflammatory processes that undergo various stages and involve a variety of cell types. Non-invasive cell imaging of different immunologically relevant cell types within an inflamed area would be a highly beneficial method to accurately assess the current state of the inflammatory lesion. A strategy for the simultaneous visualization of different cell types at once is the cell labeling method with fluorine-based contrast agents, such as perfluorocarbon nanoemulsions (PFCs) and their detection using  $^{19}\text{F}$  MRI.

To enable the visualization of four different immunologically relevant immune cell types, we have generated four PFCs with distinct  $^{19}\text{F}$  spectra using high-pressure homogenization. The following perfluorocarbons have been used: Perfluoro-n-octane (PFnO), Perfluoro-1,3,5-trimethylcyclohexane (PFCH), Perfluoro-15-crown-5-ether (PFCE) Perfluoro-tert-butylcyclohexane (PFTBH). For the subsequent examination of the cellular uptake by flow cytometry and fluorescence microscopy, fluorescent lipids have been included during the PFC preparation (Atto425-, Atto488-, Atto647-, or Atto700-DPPE (1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine)). The following PFCs have been prepared:  $^{A425}\text{PFnO}$ ,  $^{A488}\text{PFCH}$ ,  $^{A647}\text{PFCE}$ ,  $^{A700}\text{PFTBH}$ . These PFCs were characterized using dynamic light scattering (DLS), fluorescence-based methods and  $^{19}\text{F}$  spectroscopy. DLS measurements showed particle sizes between 100-150 nm, a  $\zeta$ -potential of approximately -30 mV, and varying PDIs from 0.1 to 0.5. IVIS and fluorescence spectroscopy measurements verified the fluorescence properties of the PFCs. MRI measurements were performed at 9.4 T using a Bruker AVANCEIII NMR spectrometer and  $^{19}\text{F}$  spectra were recorded using  $^{19}\text{F}$  Singlepulse NMR measurements or Chemical Shift Imaging (CSI). The signal intensities of the main  $^{19}\text{F}$  signals were determined by integration of the respective signal peaks. The cellular uptake of the PFCs of J774A.1 macrophages was examined using IVIS, flow cytometry and  $^{19}\text{F}$  MRI and the cellular uptake was confirmed using fluorescence-based methods as well as  $^{19}\text{F}$  MRI. Finally, four different cell lines (THP-1, WEHI, HL-60 and CHO) were labelled using the different PFCs. The cells were measured simultaneously with the  $^{19}\text{F}$  CSI method which revealed that the individual cell types could be and identified using the spectral identities of the PFCs.

Based on the results it can be stated, that multispectral  $^{19}\text{F}$  MRI using four different PFCs is a suitable technique for the cell labeling of four different immune cell types. However, the findings indicate that further investigations are needed for clinical applications.

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>Abb.</b>	Abbildung	<b>FCS</b>	fetales Kälberserum
<b>APC</b>	Allophycocyanin	<b>FITC</b>	Fluoresceinisothiocyanat
<b>°C</b>	Grad Celsius	<b>FSC</b>	Vorwärtsstreulicht
<b>BSA</b>	Rinderserumalbumin	<b>fwd</b>	Vorwärts
<b>bzw.</b>	beziehungsweise	<b>g</b>	Gramm
<b>ca.</b>	Circa	<b>H</b>	Stunde
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Calciumchlorid	<b>ICG</b>	Indocyaningrün
<b>CHO</b>	chinese hamster ovary	<b>L</b>	Liter
<b>cm</b>	Zentimeter	<b>M</b>	Mol
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid	<b>MFI</b>	Mittlere Fluoreszenzintensität
<b>CSI</b>	Chemical Shift Imaging	<b>mg</b>	Milligramm
<b>CT</b>	Computertomographie	<b>Mg<sup>2+</sup></b>	Magnesium
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid	<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Magnesiumchlorid
<b>DLS</b>	Dynamic Light Scattering, dynamische Lichtstreuung	<b>Min</b>	Minute
<b>DMEM</b>	Dulbecco's modified Eagle medium	<b>ml</b>	Milliliter
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid	<b>mM</b>	Millimol
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat	<b>MRI</b>	Magnetic Resonance Imaging
<b>FACS</b>	fluorescence activated cell sorting	<b>MRT</b>	Magnetresonanztomografie

<b>Ms</b>	Millisekunde	<b>Pg</b>	Picogramm
<b>mV</b>	Millivolt	<b>pH</b>	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
<b>NE</b>	Nanoemulsion	<b>PI</b>	Propidiumiodid
<b>Ng</b>	Nanogramm	<b>Pmol</b>	Picomol
<b>nmol</b>	Nanomol	<b>ppm</b>	parts per million
<b>NMR</b>	Nuclear Magnetic Resonance	<b>rpm</b>	<i>rotations per minute</i>
<b>PBS</b>	phosphate buffered saline	<b>s. o.</b>	siehe oben
<b>PEG</b>	PFC mit PEGylierung	<b>sec.</b>	Sekunde
<b>PFC</b>		<b>SNR</b>	Signal to Noise Ratio
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd	<b>SPIO</b>	small paramagnetic iron oxide particles
<b>PFC</b>	Perfluorkarbon	<b>SSC</b>	Seitwärtsstreulicht
<b>PFCE</b>	Perfluorkronether	<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>PFCH</b>	Perfluorcylohexan	<b>V</b>	Volt
<b>PFCs</b>	PFC-Nanoemulsion	<b>z. B.</b>	zum Beispiel
<b>PFnO</b>	Perfluor-n-Octan	<b>μg</b>	Mikrogramm
<b>PFOB</b>	Perfluorooctylbromid	<b>μl</b>	Mikroliter
<b>PFTBH</b>	Perfluor-tert-butylcyclohexan		



# INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Entzündungsbildgebung.....	1
1.2	Bildgebung von entzündlichen Prozessen über $^1\text{H}$ -/ $^{19}\text{F}$ -MRT .....	4
1.2.1	Perfluorkarbone und Perfluorkarbon-Nanoemulsionen.....	6
1.2.2	Multispektrale $^{19}\text{F}$ -MRT-Bildgebung .....	7
1.3	Zielsetzung .....	9
2	MATERIAL .....	11
2.1	Geräte .....	11
2.2	Verbrauchsmaterialien .....	12
2.3	Chemikalien.....	13
2.3.1	PFCs .....	13
2.3.2	Phospholipide.....	13
2.3.3	Andere Substanzen.....	14
2.4	Verwendete Zelllinien .....	15
2.5	Puffer, Medien und Reagenzien zur Zellkultivierung.....	16
2.6	Software .....	17
3	METHODEN.....	18
3.1	Herstellung von PFC-Nanoemulsionen.....	18
3.2	Analyse von PFCs mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS).....	21
3.2.1	Qualitätsparameter von PFC-Nanoemulsionen.....	21
3.2.2	Messtechnische Grundlagen einer DLS-Messung.....	21
3.2.3	Durchführung der DLS-Messung.....	22
3.3	Fluoreszenzmessungen von PFC-Nanoemulsionen.....	23
3.3.1	IVIS® Lumina II .....	23
3.3.2	Fluoreszenzspektroskopie.....	24
3.4	$^1\text{H}$ -/ $^{19}\text{F}$ -MRT-Messungen von PFCs.....	25
3.5	Zelluläre Aufnahme von PFCs durch J774A.1-Zellen .....	26
3.5.1	Bestimmung der Zellanzahl mit der Neubauer-Zählkammer...26	
3.5.2	Durchflusszytometrische Analyse der PFC-Aufnahme .....	27

3.5.3	Darstellung der zellulären Aufnahme mittels $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT .....	28
3.6	Kombinatorische Darstellung mehrerer Zelllinien.....	29
3.6.1	Inkubation der Zellen mit PFCs .....	29
3.6.2	Aufreinigung über die Dichtegradientenzentrifugation .....	29
3.6.3	Fixierung der Zellen und MRT-Messungen .....	30
3.7	Statistische Auswertung .....	31
4	ERGEBNISSE .....	32
4.1	Herstellung und Charakterisierung von PFCs mit individuellen $^{19}\text{F}$ - Signaturen .....	32
4.1.1	Charakterisierung mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) ..	32
4.1.2	Fluoreszenzeigenschaften der PFCs .....	34
4.1.3	$^{19}\text{F}$ -MRT-Messungen von PFCs .....	36
4.2	Kombinatorische Bildgebung der PFCs .....	37
4.2.1	Simultane Fluoreszenzmessungen .....	37
4.2.2	Simultane $^{19}\text{F}$ -Messungen von PFCs .....	38
4.3	Zelluläre Aufnahme von PFCs .....	40
4.3.1	Durchflusszytometrische Analyse der PFC-Aufnahme .....	40
4.3.2	Bestimmung der PFC-Aufnahme mittels $^{19}\text{F}$ -MRT .....	40
4.4	Darstellung verschiedener Immunzellsubtypen.....	41
4.4.1	IVIS-Untersuchung .....	41
4.4.2	Multispektrale $^{19}\text{F}$ -MRT .....	43
5	DISKUSSION .....	44
5.1	Herstellung und Charakterisierung von PFCs .....	45
5.2	Zelluläre Aufnahme von PFCs .....	48
5.2.1	$^{19}\text{F}$ -MRT .....	48
5.2.2	Fluoreszenzbasierte Verfahren .....	49
5.3	Multispektrale $^{19}\text{F}$ -Magnetresonanztomographie .....	51
5.4	Limitationen und Ausblick.....	53
6	LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS.....	57

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Entzündungsbildgebung

Eine frühe Diagnose und eine effektive Überwachung von Entzündungsprozessen im menschlichen Körper sind von großer Bedeutung, um die Belastung für die Patienten zu lindern, die Patientenversorgung zu verbessern und Komplikationen zu vermeiden. In klinischer Umgebung geben spezifische, labortechnisch aus dem Blut ermittelbare Entzündungsparameter, wie das C-reaktive Protein (CRP), oder die Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) Hinweise darauf, ob und in welchem Ausmaß entzündliche Vorgänge im Körper stattfinden. Gegenwärtig werden häufig zur Lokalisation des Entzündungsprozesses und zur Bestätigung der Diagnose die Sonographie, röntgenbasierte Methoden und die Magnetresonanztomographie angewandt. In den letzten Jahrzehnten wurden jedoch verschiedene bildgebende Verfahren entwickelt, um Entzündungen weitergehend darzustellen.

Ein Beispiel für ein solches Verfahren – welches in der Klinik auch heutzutage noch angewendet wird – ist die Entzündungs-Szintigraphie, die in den 1970er und 1980er Jahren durch große Fortschritte in der Radiopharmazie und Bildgebungstechnologie zunehmend in der klinischen Praxis etabliert hat [1, 2]. Bei dieser Methode wird mit Hilfe einer speziellen Gammakamera festgestellt, ob sich bestimmte Zellen, die mit radioaktiven Molekülen wie Indium-111 oder Technetium-99m markiert wurden, in entzündlichen Geweben anreichern. Die Darstellung von Immunzellen ermöglichte es, inflammatorische Läsionen mit hoher Spezifität im Körper sichtbar zu machen und wird heutzutage hauptsächlich bei Infektionen, sowie in der Onkologie eingesetzt [3]. Mit dieser Technologie wurden bereits Neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen, T-Zellen sowie hämatopoetische Vorläuferzellen markiert und deren Einwanderung in entzündliches Gewebe verfolgt [4, 5]. Zu Beginn der Untersuchung injiziert man dem Patienten radioaktiv markierte Antikörper (z.B. Technetium-99m-markiert), die gegen Antigene gerichtet sind, welche sich auf den entsprechenden Zielzellen befinden. Aufgrund der stärkeren Durchblutung und erhöhten Zellaktivität in den entzündeten Bereichen erscheinen die Ansammlungen von Entzündungszellen im Vergleich zu unmarkiertem Gewebe als „hot spots“, weil sie eine höhere Konzentration des radioaktiven Tracers enthalten. Auch kann die Untersuchungsdauer, abhängig von der Wahl des Radionuklids und der Entzündungsart, stark variieren. Technetium-99m hat eine kurze Halbwertszeit von sechs Stunden und kann laut Studien aus den Zellen austreten und in die Umgebung gelangen, wodurch auch umliegendes Gewebe nichtintentionell markiert wird [1]. Ein Nachteil der Szintigraphie ist außerdem die Exposition der Patienten gegenüber ionisierender Strahlung [6]. Weiterhin ist die räumliche Auflösung der Szintigraphie begrenzt, was eine genaue Lokalisation von Entzündungsherden im Körper, sowie die Unterscheidung verschiedener Gewebearten erschweren kann [7]. Bei einigen Fragestellungen kann eine Kombination aus

Entzündungsszintigraphie und anderen bildgebenden Verfahren nötig sein, um ein umfassenderes Bild des entzündlichen Prozesses zu erhalten. Unter Umständen kann sich die Untersuchungsdauer der Patienten auf mehrere Stunden bis wenige Tage verteilen, insbesondere falls mehrere Bildgebungssitzungen durchgeführt werden müssen.

Auch Fluoreszenzfarbstoffe können mit Hilfe von Fluoreszenzdetektoren zur Visualisierung von Zellen eingesetzt werden. Sie verfügen über eine spezifische Signalgebung und ermöglichen die genaue Lokalisierung von Zellen. Aufgrund der begrenzten Eindringtiefe von Anregungslicht in das Gewebe sind sie jedoch auf oberflächennahe Anwendungen limitiert.

Durch nicht-invasive bildgebende Verfahren, wie Sonographie, CT oder  $^1\text{H}$ -MRT lassen sich zwar anatomische Informationen über die Ausbreitung von Entzündungsprozessen gewinnen, jedoch fehlt diesen Verfahren gewöhnlich die Spezifität, um gezielt beispielsweise entzündliche Zellen nachzuweisen. Die Bildgebung mittels  $^1\text{H}$ -MRT hat sich als Standardverfahren in der klinischen Diagnostik etabliert und liefert kontrastreiche anatomische Bilder, insbesondere von Weichgeweben. Sie basiert auf der Darstellung der Wasserstoffprotonen im Gewebe. Die gemessene Signalintensität ist abhängig von der Protonendichte der Gewebe und der Relaxierung der  $\text{H}_2\text{O}$ -Moleküle. Mittels konventioneller  $^1\text{H}$ -MRT kann jedoch kaum zwischen Gewebszerstörung und Gewebsreparatur unterschieden werden. Zudem ist es nicht möglich die bei einer Entzündung beteiligten Immunzellen mit hoher Spezifität zu differenzieren. Darüber hinaus können entzündliche Prozesse in frühen entzündlichen Phasen kaum sichtbar gemacht werden, da eingewanderte Immunzellen im betroffenen Gewebe zu diesem Zeitpunkt keine physikalischen Veränderungen hervorrufen, die in MR-Kontraste umgewandelt werden können [8].

Hinweise auf Entzündungsprozesse können auch durch Veränderungen der Gewebepfusion, des Sauerstoffgehalts des Blutes, den Energiebedarf oder bestimmte Stoffwechselprozesse gegeben werden, die die Diffusion von Wassermolekülen beeinflussen und Veränderungen im lokalen Magnetfeld der  $^1\text{H}$ -MRT hervorrufen. Mit Hilfe der funktionellen Magnetresonanztomographie, der kontrastverstärkten MRT und der Diffusionsbildgebung werden solche Informationen über eine komplexe Nachverarbeitung ausgewertet. Auf diese Weise können Entzündungsprozesse indirekt detektiert werden. Technisch limitiert sind diese Verfahren durch Messungenauigkeiten, die durch Veränderungen des Blutflusses im umliegenden Gewebe der Entzündungen und der Gefäße hervorgerufen werden. Auch wird die entzündliche Aktivität nicht direkt gemessen, sondern indirekt durch die oben genannten Parameter. Für die genaue *in vivo* Lokalisation von Entzündungsprozessen mittels MRT werden daher Substanzen benötigt, die einen für diagnostische Zwecke ausreichenden MRT-Kontrast erzeugen.

In den letzten Jahren hat die Magnetresonanztomographie große Fortschritte gemacht und bietet vielversprechende nicht-invasive Ansätze zur Darstellung von

Entzündungsherden im Körper [8-12]. Durch den Einsatz von MRT-Kontrastmitteln in der  $^1\text{H}$ -MRT lassen sich krankhafte Gewebeveränderungen zwar leichter erkennen, jedoch sind damit oftmals keine detailreichen Informationen zu Entzündungsprozessen zu gewinnen. Zwei häufig eingesetzte MRT-Kontrastmittel sind negative MRT-Kontrastmittel, wie superparamagnetische Eisenoxidpartikel (SPIO) und positive MRT-Kontrastmittel, wie Gadolinium-basierte MRT-Kontrastmittel. Sowohl Gadolinium-haltige Kontrastmittel als auch SPIO können durch ihre paramagnetischen Eigenschaften die Signalintensität durch Manipulation der Relaxationszeit erheblich beeinflussen und finden auch klinische Anwendung [13-16].

SPIOs (*small paramagnetic iron oxide particles*) werden von phagozytischen Zellen, wie Monozyten und Makrophagen, aufgenommen [17, 18]. Durch Erzeugung eines störenden Magnetfeldes können sie das  $^1\text{H}$ -Signal im Bereich des Eisens selektiv abschwächen, wodurch es im Bereich der Phagozyten zu einer Verringerung der  $^1\text{H}$ -Intensität kommt. SPIOs bieten eine hohe Empfindlichkeit und können auch zur Verfolgung von Zellen über einen längeren Zeitraum eingesetzt werden [17, 19, 20]. Allerdings können SPIO als MRT-Kontrastmittel durch verschiedene phagozytisch aktive Zellarten und Gewebekompartimente aufgenommen werden, wodurch die Interpretation der Bilddaten erschwert wird [21-25]. Das Ausmaß der Makrophageninfiltration in die entzündlichen Läsionen kann je nach Gewebetyp, Organ und spezifischer Entzündungsphase unterschiedlich stark ausgeprägt sein [26, 27]. So zeigen einige Gewebe nahezu keine SPIO-Aufnahme [28]. Weiterhin besteht kein lineares Verhältnis zwischen SPIO-Konzentration und Signalabschwächung, was die Quantifizierung erschwert: Mit ansteigenden SPIO-Dosierungen entsteht ein sogenannter Sättigungseffekt bei der Signalminderung, da durch die zunehmende Verkürzung der T2- und T2\*-Relaxationszeiten eine stärkere MRT-Signalabschwächung eintritt [29-31]. Zudem wurde auch die mögliche Zelltoxizität von SPIO bei medizinischen Anwendungen vielfach diskutiert [32],

Positive  $^1\text{H}$ -MRT-Kontrastmittel, wie Gadolinium-haltige Chelatkomplexe verstärken das MRT-Signal des umliegenden Gewebes durch Interaktion mit Wasserstoffprotonen, was zur Verkürzung der Longitudinal-Relaxationszeit (T1-Zeit) führt. Bei T1-gewichteten Aufnahmen erscheinen die Bereiche, in denen sich Gadolinium angereichert hat, heller. Gadolinium-haltige MRT-Kontrastmittel wirken vor allem als MRT-Kontrastmittel des Extrazellulärraums. Sie können eingesetzt werden, um die Sichtbarkeit von Blutgefäßen und die Gefäßpermeabilität darzustellen, was eine Identifikation und Lokalisation von Entzündungsherden erleichtern kann [33, 34]. Bei längerer Gadolinium-Exposition besteht insbesondere bei Patienten mit einer eingeschränkten Nierenfunktion laut einigen Studien ein geringes, aber erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Erkrankung namens nephrogene systemische Fibrose (NSF). Das Krankheitsbild der NSF beinhaltet die Verhärtung und Verdickung von Haut und Organen mit potenziell tödlichem Krankheitsverlauf [9, 35-37]. In anderen klinischen Studien wurde das allergene Potenzial von Gadolinium-haltigen MRT-Kontrastmitteln beschrieben. So könne es unter

Anwendung von Gadolinium-haltigen MRT-Kontrastmitteln zu Juckreiz, Hautausschlag oder seltenen schweren allergischen Reaktionen kommen [38, 39].

In einer Studie von 2008 konnten Flögel et al. experimentell bei Mäusen nach einem induzierten akuten Myokardinfarkt in der  $^{19}\text{F}$ -MRT nachweisen, dass PFCs nach intravenöser Gabe von zirkulierenden Monozyten aufgenommen werden, die sich innerhalb des entzündlich veränderten Gewebes anreichern [40]. Perfluorkarbon-Nanoemulsionen als intravenös verabreichte  $^{19}\text{F}$ -MRT-Kontrastmittel wurden daraufhin experimentell für verschiedene Krankheitsbilder untersucht. So konnte Ebner et al. 2010 die entzündlich bedingte Monozyten-/Makrophageninfiltration nach induzierter bakterieller Pneumonie anhand von  $^{19}\text{F}$ -MRT detektieren [41]. In einer weiteren Studie konnten entzündliche Prozesse in Abszessen des Oberschenkels am Tier mittels PFCs und  $^{19}\text{F}$ -MRT untersucht werden [42]. Auch für zahlreiche andere Entzündungsmodelle, wie entzündlich bedingte Arthritiden [43], Myokarditiden [44] und Tumorerkrankungen [45] konnten mittels PFCs und  $^{19}\text{F}$ -MRT vielversprechende Erkenntnisse zur lokalen Anreicherung von Immunzellen und zum Verlauf von Entzündungsvorgängen gewonnen werden.

## 1.2 Bildgebung von entzündlichen Prozessen über $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT

Eine weitere Methode, um Immunzellen darzustellen, basiert auf dem Einsatz von Perfluorkarbon-Nanoemulsionen (PFCs), die mittels  $^{19}\text{F}$ -MRT dargestellt werden können. Intravenös verabreichte PFCs werden von zirkulierenden und lokalen phagozytischen Immunzellen, wie Monozyten und Makrophagen aufgenommen, die in entzündlichen Bereichen akkumulieren und mittels  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT visualisiert werden können [41, 42, 46, 47]. Diese Methode hat sich in den letzten 20 Jahren zu einem vielversprechenden Werkzeug für die bildgebende Darstellung von entzündlichen Prozessen entwickelt [48-51].

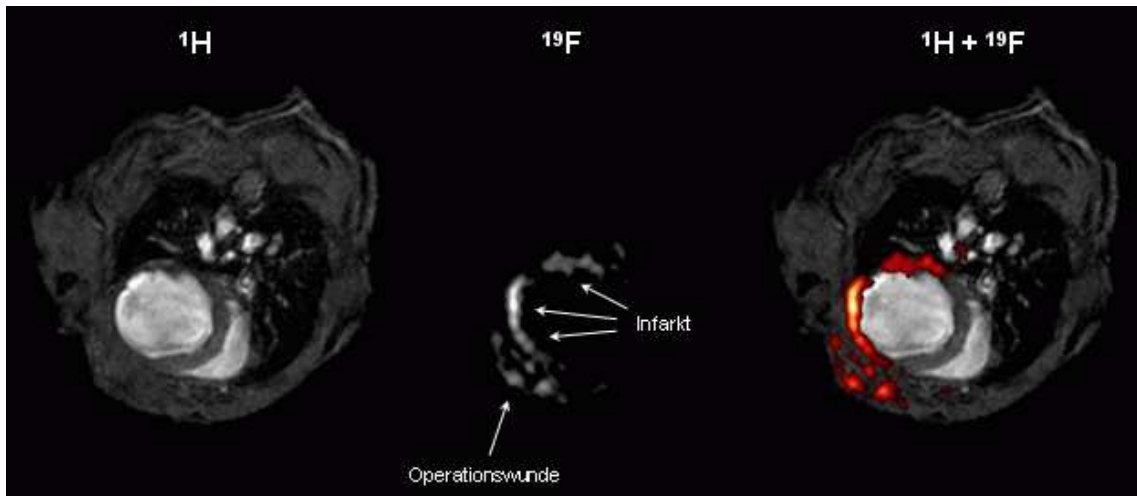
$^{19}\text{F}$ -MRT basiert auf dem NMR-aktiven Nuklid  $^{19}\text{F}$ , welches einige Eigenschaften aufweist, die es für die MRT-Bildgebung interessant machen.  $^{19}\text{F}$  ist das einzige stabile Isotop des Fluoratoms und ist frei von ionisierender Strahlung. Es besitzt eine natürliche Häufigkeit von 100%, jedoch weist der menschliche Körper nahezu keinen natürlichen Gewebehintergrund auf [50, 52].  $^{19}\text{F}$  kommt lediglich in geringen Mengen in den Zähnen und Knochen in gebundener Form vor, nicht aber im Weichgewebe [53-55]. Natürlicherweise im Körper vorkommende  $^{19}\text{F}$ -Moleküle besitzen aufgrund ihrer Immobilisation sehr kurze T1-Zeiten und werden daher mit den konventionellen Bildgebungssequenzen kaum detektiert [8, 50, 53, 56]. Für die Entzündungsbildgebung hat die  $^{19}\text{F}$ -MRT somit den Vorteil, dass entzündliches Gewebe gezielt mit  $^{19}\text{F}$ -Isotopen angereichert und anschließend zwischen markiertem (entzündetem) und unmarkiertem Gewebe unterschieden werden kann [8].

Die  $^{19}\text{F}$ -Kerne weisen ähnliche MRT-relevante Eigenschaften wie der  $^1\text{H}$ -Kern auf. So besitzt  $^{19}\text{F}$  ein ähnliches gyromagnetisches Verhältnis und eine ähnliche MR-Sensitivität

wie  $^1\text{H}$  [57, 58]; außerdem verfügt er wie  $^1\text{H}$  einen Spin von  $\frac{1}{2}$ , hat jedoch im Gegensatz zum Wasserstoffatom einen 600-mal größeren Bereich an empfangenen Resonanzfrequenzen [59, 60]. Die Resonanzfrequenz von  $^1\text{H}$  beträgt 400.00 MHz bei 9.4 T und die von  $^{19}\text{F}$  etwa 376.30 MHz bei 9.4 T mit einer relativen Sensitivität von 0.83 bezogen auf den Wasserstoffprotonenkern [61, 62]. Somit ist die Sensitivität von  $^{19}\text{F}$  deutlich höher als die Sensitivität von  $^{31}\text{P}$ ,  $^{13}\text{C}$ , und  $^{15}\text{N}$  [63]. Durch die Nähe der Resonanzfrequenzen von  $^1\text{H}$  und  $^{19}\text{F}$  lässt sich zudem die vorhandene technische Ausstattung des  $^1\text{H}$ -MR-Gerätes durch das Implementieren einer  $^{19}\text{F}$ -Spule unkompliziert erweitern.  $^{19}\text{F}$ -Isotope können allerdings unabhängig von den umgebenden Wasserstoffprotonen erregt werden, daher ist man bei der  $^{19}\text{F}$ -MRT nicht von der Protonendichte abhängig. In protonenarmen Geweben, wie beispielsweise der Lunge, kann daher auch eine  $^{19}\text{F}$ -MRT-Anwendung finden [41, 64]. Durch Überlagerung einer separaten  $^{19}\text{F}$ -MRT-Aufnahme mit einer korrespondierenden anatomischen  $^1\text{H}$ -MRT-Aufnahme wird die exakte Lokalisation von Entzündungen, Tumoren und anderen pathologischen Prozessen auf zellulärer Ebene möglich [40]. Zudem gibt es eine lineare Korrelation der  $^{19}\text{F}$ -Signalstärke mit der  $^{19}\text{F}$ -Konzentration, was die Möglichkeit einer einfachen Quantifizierung bietet [65].

Es wurden verschiedene Ansätze zur Markierung und Quantifizierung verschiedener Immunzelltypen mit  $^{19}\text{F}$ -Kontrastmitteln entwickelt, darunter Makrophagen, Neutrophile Granulozyten, T-Zellen, B-Zellen, dendritische Zellen und Stammzellen [66-69]. Das Targeting von Neutrophilen und Monozyten [69] mittels perfluorierten Kohlenstoffverbindungen (PFCs) und  $^{19}\text{F}$ -MRT wurde bereits in verschiedenen Studien u.a. an Mausmodellen erforscht [41, 69, 70]. Nach intravenöser Gabe werden PFCs durch Phagozyten wie Monozyten und Makrophagen aufgenommen [49, 66, 71]. Die Migration von dendritischen Zellen, T-Zellen und B-Zellen wurde ebenfalls in verschiedenen Studien *in vivo* mittels  $^{19}\text{F}$ -MRT untersucht [65, 72-74].

In der nachfolgenden Abbildung 1-1 ist exemplarisch eine Entzündungsreaktion des Arbeitsmyokards einer Maus dargestellt, bei der  $^1\text{H}$ -MRT- und  $^{19}\text{F}$ -MRT-Aufnahmen überlagert wurden. Die entzündeten Areale sind farblich gelb-rot markiert.



**Abbildung 1-1 – Überlagerung von  $^1\text{H}$ - und  $^{19}\text{F}$ -MRT-Schichtaufnahmen nach einem Myokardinfarkt in der Maus:**

Dargestellt sind axiale  $^1\text{H}$ - und  $^{19}\text{F}$ -MRT-Schichtaufnahmen des Herzens einer Maus, bei der experimentell ein Myokardinfarkt induziert wurde. Am Tag nach dem Eingriff wurden PFCs intravenös verabreicht. 24 Stunden später erfolgten die  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT-Messungen. Bei Überlagerung der anatomischen  $^1\text{H}$ -Aufnahme (links) und des farbcodierten  $^{19}\text{F}$ -MRT-Scans (mittig, Hot-Iron-Farbschema) lässt sich eine Anreicherung von  $^{19}\text{F}$ -Isotopen in den entzündeten Arealen des Myokards erkennen. Die Kombination von  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT ist rechts im Bild dargestellt. Die Abbildung wurde modifiziert und stammt von Flögel et. al. [40].

### 1.2.1 Perfluorkarbone und Perfluorkarbon-Nanoemulsionen

Bei den Perfluorkarbonen handelt es sich um synthetische Verbindungen, die aus Kohlenstoff- und Fluoratomen bestehen. Bei der Synthese der Perfluorkarbone sind alle Substituenten der Kohlenstoffatome durch  $^{19}\text{F}$ -Kerne ersetzt worden, wodurch Perfluorkarbone einen hohen Gehalt an MR-aktiven  $^{19}\text{F}$ -Atomen besitzen [75, 76]. Perfluorkarbone gelten nach aktueller Studienlage als nicht toxisch und biologisch verträglich [77, 78]. Durch die hohe Elektronendichte des Fluoratoms sind die Substanzen weitgehend chemisch inert und reaktionsträge [79]. Die starke kovalente C-F-Bindung schützt Perfluorkarbone weitgehend vor enzymatischem Abbau und durch die hohe Elektronendichte der Fluorverbindungen gibt es wenige Interaktionen mit anderen Molekülen [80, 81]. Zudem weisen Perfluorkarbone keine Radikalbildung auf, weshalb sie sich insgesamt als  $^{19}\text{F}$ -MRT-Kontrastmittel eignen [82].

Wie in Abbildung 1-1 exemplarisch dargestellt können PFCs genutzt werden, um einen Entzündungsherd darzustellen. Zur Darstellung phagozytischer Immunzellen werden PFCs verwendet, welche passiv aufgenommen werden und sich im Entzündungsherd anreichern. Es wurde in verschiedenen experimentellen Ansätzen gezeigt, dass PFCs von diversen Immunzellen, wie Makrophagen, Neutrophilen Granulozyten, T-Zellen, B-Zellen, dendritischen Zellen und Stammzellen aufgenommen werden [66-69]. Die Ansätze der Forschung der letzten Jahre liefern exzellente Voraussetzungen für eine *in vivo* Nutzung von  $^{19}\text{F}$ -Nukliden als intravenöse MR-Kontrastmittel [25, 83, 84]. Perfluorkarbone müssen jedoch für biologische oder medizinische Anwendungen z.B. mit Lipiden emulgiert werden wodurch Perfluorkarbon-Nanoemulsionen (PFCs) entstehen, oder alternativ in PLGA (Polylactid-co-Glycolid) eingekapselt werden [51, 85].



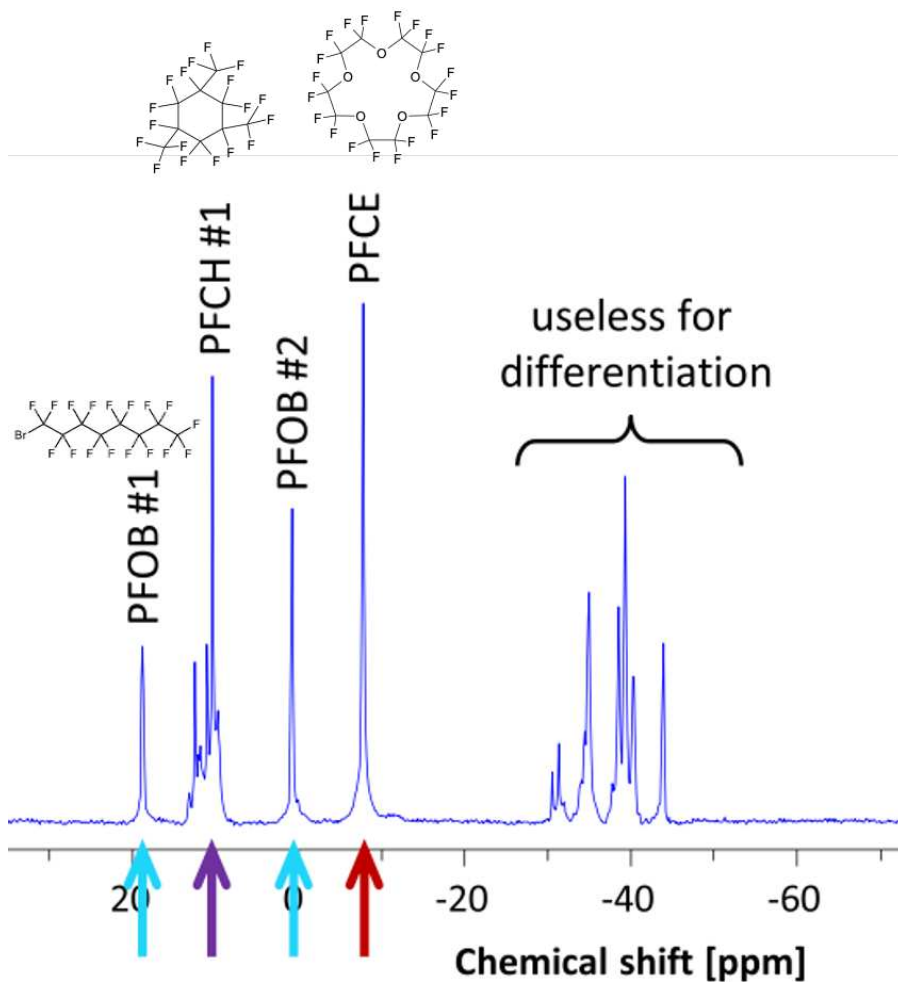
Die Verwendung von Perfluorkarbonen als bildgebende Kontrastmittel begann in den 1980er Jahren [86-89]. So konnte in ersten Studien gezeigt werden, dass PFC-Emulsionen als MR-Kontrastmittel in der Lage sind, Entzündungsprozesse in Geweben sichtbar zu machen [90, 91]. Die vielfältigen Einsatz- und Untersuchungsmöglichkeiten mittels PFC-Nanopartikeln bei der Darstellung von Entzündungen wurden weiteren Studien dargestellt. So können PFC-Nanopartikel für bestimmte Einsatzzwecke angepasst werden. Eine Größen- und Formmodifikation der Nanopartikel, ebenso wie die Modifikation der Oberflächenladungseigenschaften der Nanopartikel durch physikalische Manipulationen oder Veränderung der Synthesemethoden ermöglicht die Optimierung der Partikelgröße für z.B. eine bessere Gewebepenetration oder eine gezielte Anreicherung in bestimmten Gewebekompartimenten oder eine Verbesserung der Stabilität der Nanopartikel [92, 93]. PFC-Nanopartikel können zudem mit Polymeren, Proteinen, oder Lipiden beschichtet werden, um einerseits die Stabilität weiter zu erhöhen, oder die Interaktion mit bestimmten Gewebekompartimenten oder einzelnen Zellen zu verbessern [94]. Um eine gezielte Bindung an verschiedene Zelltypen oder Moleküle zu erreichen, können PFC-Nanopartikel mit spezifischen Liganden konjugiert werden. So konnten unsere Arbeitsgruppe (Temme et. al.) 2015 PFCs mit dem  $\alpha$ 2-Antiplasmin-Peptid funktionalisieren, welches gegen FXIIIa und das Fibrinnetzwerk gerichtet ist und thromboentzündliche Prozesse in der Maus darstellen [49]. 2018 konnte ein aktives Targeting an humane und murine neutrophile Granulozyten über ein spezifisches Peptid (NG2) [95] erreicht werden. 2020 wurde eine Arbeit veröffentlicht, bei der epikardiale stromale Zellen (EpiSC) spezifisch angesteuert wurden [96]. Die Integration von Fluoreszenzfarbstoffen in die Nanopartikel erweitert das Einsatzgebiet von PFCs für viele weitere molekularbiologische Zwecke. Dazu zählen die Untersuchung mittels fluoreszenzbasierter Methoden, wie beispielsweise FACS oder Fluoreszenzmikroskopie, die *in vivo* Echtzeitanalyse mittels Biolumineszenz Detektoren, oder die Phototherapie [97, 98].

### 1.2.2 Multispektrale $^{19}\text{F}$ -MRT-Bildgebung

Eine weitere Besonderheit von  $^{19}\text{F}$ -haltigen chemischen Verbindungen ist, dass mit 300 - 400 ppm eine große Breite an chemischen Verschiebungen der  $^{19}\text{F}$  Resonanzfrequenzen vorhanden ist. Dies bietet ideale Voraussetzungen für eine Multispektrale  $^{19}\text{F}$ -Bildgebung [53]. Hierfür werden spektral unterscheidbare  $^{19}\text{F}$ -Verbindungen benötigt, deren Resonanzfrequenzen eine ausreichend große chemische Verschiebung und gut isolierte Signalspitzen aufweisen. So können bei  $^{19}\text{F}$ -Verbindungen in Abhängigkeit von ihrer chemischen Struktur eine oder mehrere separate Resonanzfrequenzen vorliegen [50, 56, 60, 99]. Eine eindeutige Identifikation mehrerer unabhängiger  $^{19}\text{F}$ -MRT-Proben sind möglich, sofern sie sich nicht spektral überlagern [58, 100].

Es existiert eine Vielfalt an verschiedenen Perfluorkarbonen mit unterschiedlichen chemischen Strukturen, die zahlreiche  $\text{CF}_3$ -,  $\text{CF}_2$ - und  $\text{CF}$ -Gruppen besitzen (siehe Abb.

1-2). Je nach chemischer Struktur können Perfluorkarbone zudem in linearer, verzweigter, zyklischer oder aromatischer Struktur vorliegen [101, 102]. In Abbildung 1-2 ist eine Aufnahme der Spektren von PFOB, PFCH und PFCE dargestellt. Perfluorkarbone können je nach Komplexität ihrer chemischen Struktur, und dem Gehalt an  $^{19}\text{F}$ -Kernen eine oder mehrere Resonanzfrequenzen aufweisen (siehe Abb. 1-2). Für eine Multispektrale  $^{19}\text{F}$ -MRT sind idealerweise PFCs mit einer einzigen Resonanzfrequenz geeignet, wie beispielsweise PFCE [103]. Bei PFCE führen die enthaltenen  $\text{CF}_2$ -Gruppen zu einem einzigen Hauptsignal. Im Vergleich dazu besitzen PFCH und PFOB neben den  $\text{CF}_3$ -Gruppen, die zu dem Hauptsignal führen, zusätzliche  $\text{CF}_2$ -Gruppen und  $\text{CF}$ -Gruppen, welche Signale erzeugen, die sich teilweise überlagern und nicht differenzierbar sind (siehe Abb. 1-3).



**Abbildung 1-2 – NMR-Spektroskopische Simultanaufnahme von PFOB, PFCH und PFCE:** Dargestellt ist die Überlagerung von  $^{19}\text{F}$ -Signalen verschiedener PFCs (Perfluorkarbon-Nanoemulsionen) mit magnetisch unterschiedlichen  $^{19}\text{F}$ -Kernen: PFOB (Perfluoroktyl-bromid, hellblaue Pfeile), PFCH (Perfluor-1,3,5-trimethylcyclohexan violetter Pfeil), und PFCE (Perfluor-15-kronen-5-ether, dunkelroter Pfeil). PFCE (links) besitzt 20 magnetisch äquivalente Kerne, die zu einem einzigen  $^{19}\text{F}$ -Signal führen, wohingegen PFOB und PFCH ein komplexeres  $^{19}\text{F}$ -Spektrum aufweisen. Die Abbildung wurde aus dem Artikel „Multi-targeted  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$  MRI unmasks specific danger patterns for emerging cardiovascular disorders“ von Flögel et al. 2021 entnommen und für diese Arbeit modifiziert [104].

In der experimentellen Forschung wurden bereits einige Ansätze zur Entzündungsbildgebung mittels Multispektraler  $^{19}\text{F}$ -MRT durchgeführt. In einer Studie von 2005 wurden dendritische Zellen mit PFCs markiert und konnten im Tiermodell *in vivo* verfolgt werden [50]. Die Studie stellt die Markierung dendritischer Zellen mittels PFCs als wegweisend für die Immuntherapie von Tumoren und Autoimmunerkrankungen, wie Autoimmundiabetes, Myasthenia Gravis und Multiple Sklerose dar [50, 105]. Die Autoren Ahrens et. al., betonen gleichzeitig die Nutzbarkeit der Technologie für weitere Zellarten. 2007 wurde die Verfolgung von Stammzellen mittels zweier unterschiedlicher intravenös verabreichter PFCs durchgeführt, um zelluläre Vorgänge, wie z.B. die Abstoßung von Stammzelltransplantaten besser beobachten und verstehen zu können [84, 106]. Eine weitere Studie von Ottoboni et al. aus dem Jahr 2020 hebt die Rolle endogener Stammzellen für das Remodelling bei entzündlichen Prozessen hervor und betont die Vorteile von  $^{19}\text{F}$ -MRT bei der Markierung neuraler Stammzellen [107].

Weitere Immunzelltypen wurden bereits in präklinischen Modellen untersucht. 2017 wurde von Partlow et al. erstmals eine Kombination von PFCE und PFOB eingesetzt, um humane hämatopoetische Stammzellen zu markieren [84]. 2019 gelang Chirizzi et al. mit zwei spektral unterscheidbaren PFCs, PFCE und PERFECTA, die Detektion von mononukleären Zellen in Mäusen über 2-Farben- $^{19}\text{F}$ -MRT [65]. Auch eine Kombination von drei spektral unterscheidbaren PFCs mit spezifischen Liganden gegen FXIIIa und Fibrin konnte 2021 von Flögel et al. eingesetzt werden, um thromboinflammatorische Prozesse in der Maus zu detektieren [104]. Bislang war die Multispektrale  $^{19}\text{F}$ -MRT via PFCs jedoch auf maximal drei simultan einsetzbare Substanzen beschränkt [65, 108-110].

Die gleichzeitige Markierung verschiedener Zellarten in Entzündungsherden in einem Untersuchungsablauf stellt ein aktuelles Forschungsgebiet dar, um einen differenzierteren Einblick in das entzündliche Geschehen zu erhalten. Die bisherigen Forschungsansätze und multimodalen Einsatzmöglichkeiten des Einsatzes von PFCs unterstreichen deren Potenzial für die multispektrale Entzündungsbildgebung.

### **1.3 Zielsetzung**

Das Ziel dieser Arbeit ist es, neue Ansätze für die Multispektrale  $^{19}\text{F}$ -MRT zu entwickeln, um die bildgebende Darstellung von vier verschiedenen Zelltypen mittels spektral unterscheidbarer PFCs zu ermöglichen.

Die zur Markierung der Zellen notwendigen PFCs  $^{A425}\text{PFnO}$ ,  $^{A488}\text{PFCH}$ ,  $^{A647}\text{PFCE}$  und  $^{A700}\text{PFTBH}$  werden durch Emulgierung und Hochdruck-Homogenisation hergestellt und anschließend mittels dynamischer Lichtstreuung, fluoreszenzbasierten Methoden sowie  $^{19}\text{F}$ -MRT charakterisiert. Um festzustellen, ob keine spektrale Überlappung besteht, wird anschließend die spektrale Identität der PFCs mit  $^{19}\text{F}$ -MRT (FT-basierte 2D-CSI-Methode), Fluoreszenzspektroskopie und IVIS-Bildgebung analysiert. Um zu

untersuchen, ob die PFCs von Immunzellen aufgenommen werden können, wird die zelluläre Aufnahme der PFCs durch  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT und Durchflusszytometrie anhand der murinen Makrophagen-Zelllinie J774A.1 untersucht. Abschließend erfolgt die simultane Darstellung von vier immunkompetenten Zelllinien *in vitro* mit jeweils unterschiedlichen PFCs in einem experimentell angelegten Entzündungsherd via  $^{19}\text{F}$ -MRT und IVIS. Es sollen folgende Zelllinien mit PFCs markiert werden: THP-1 (humane Monozyten-ähnliche Zellen) mit  $^{A425}\text{PFnO}$ , HL-60 (Neutrophilen-ähnliche Zellen) mit  $^{A488}\text{PFCH}$ , CHO (Epithelzelllinie aus den Ovarien des chinesischen Zwerghamsters) mit  $^{A647}\text{PFCE}$  und WEHI-231 (murine B-Zellen) mit  $^{A700}\text{PFTBH}$ .

Es wird erwartet, dass die Ergebnisse dieser Arbeit und methodischen Erkenntnisse zur Bildgebung mittels Multispektraler  $^{19}\text{F}$ -MRT und PFCs die Möglichkeiten bildgebender Darstellung von Entzündungsprozessen und anderen Krankheiten erheblich verbessern und potenziell klinische Anwendungen in der Diagnostik und Überwachung von Entzündungsprozessen aufzeigen können.

## 2 MATERIAL

### 2.1 Geräte

Gerät	Typenbezeichnung	Hersteller
Analysenwaage	PA214	Ohaus Europe (Greifensee, Schweiz)
Analysenwaage	AG204 DeltaRange®	Mettler Toledo (Ohio, USA)
Analysenwaage	Ew	Kern (Balingen-Frommern, Deutschland)
Durchflusszytometer	FACSCanto™ II	BD® Bioscience (San Jose, USA)
Heizblock	Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Biolumineszenz- / Fluoreszenzdetektor	IVIS® Lumina II	Caliper LifeSciences (Mainz, Deutschland)
Fluoreszenzspektrometer	F-7000 (Seriennummer 2451-017)	Hitachi® FL solutions (Tokio, Japan)
Inkubator	Heracell 150i	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
Magnetrührer	RCT basic	IKA Werke (Staufen, Deutschland)
MR-Microimagingssystem	Mini 0.5	Bruker (Rheinstetten, Deutschland)
MR-Resonatorspule	25mm-birdcage	Bruker (Rheinstetten, Deutschland)
MR-Spektrometer	9.4 T AvanceIII Wide Bore	Bruker (Rheinstetten, Deutschland)
pH-Meter	766 Calimatic	Knick (Berlin, Deutschland)
Pipetten	Research	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Ultraschallbad	Sonorex RK 100 H	Bandelin (Berlin, Deutschland),
Vortexer	Reagenzglas-Vortex- Schüttler	VWR International (Darmstadt, Deutschland)
Vortexer	REAX Top	Heidolph Instruments GmbH (Schwabach, Bayern)
Vortexer	REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH (Schwabach, Bayern)
Zentrifuge	5415D	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge	Universal 320R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Tutlingen, Deutschland)

Zentrifuge	Allegra X-30R	Beckman Coulter (Brea, USA)
Mikrobiologische Sicherheitswerkbänke	Mars Pro Cytosafe Class 2	LaboGene™ (Lillerød, Dänemark)
Hochdruck-Homogenisator	LV1	Microfluidics (Westwood, USA)
Mikroskop	CKX31	Olympus (Tokio, Japan)
Gefrierschrank	LKexv 3910 Index 21 / 001	Liebherr (Bulle, Schweiz)
Thermomixer	compact	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Spezifikation	Hersteller
FACS-Röhrchen		Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Zentrifugen-Röhrchen	15ml, 50ml	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
Spritzen	Omnifix-F, 2ml	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)

## 2.3 Chemikalien

### 2.3.1 PFCs

Substanz	Abkürzung / Summenformel	Reinheit	Hersteller
Perfluor-15-kronen-5-ether	PFCE / C <sub>10</sub> F <sub>20</sub> O <sub>5</sub>	98%	ABCR GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany
Perfluor-n-octan	PFnO / C <sub>8</sub> F <sub>18</sub>	98%	ABCR GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany
Perfluor-1,3,6- Trimethylcyclohexane	PFCH / C <sub>6</sub> F <sub>12</sub>	98%	ABCR GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany
Perfluor tert-butylcyclohexan	PFTBH / C <sub>10</sub> F <sub>20</sub>	98%	ABCR GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany

### 2.3.2 Phospholipide

Substanz	Beschreibung / Summenformel	$\lambda_{\text{abs}}$ (nm)	M [g*mol <sup>-1</sup> ]	Hersteller
Lipoid® E 80 SN	Hühnerei-Phospholipid mit 64% - 79% Phosphatidylcholin	-	~ 780	Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Deutschland)
Atto425- DPPE	Fluoreszierendes Phospholipid basierend auf Glycerol, welches mit zwei Fettsäuren konjugiert ist: DPPE (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero- 3-phosphoethanolamine)	433 nm	~ 1075	ATTO-TEC GmbH (Siegen, Deutschland)
Atto488- DPPE		508 nm	~ 1264	ATTO-TEC GmbH (Siegen, Deutschland)
Atto647- DPPE		653 nm	~ 1267	ATTO-TEC GmbH (Siegen, Deutschland)
Atto700- DPPE		694 nm	~ 1353	ATTO-TEC GmbH (Siegen, Deutschland)

### 2.3.3 Andere Substanzen

Substanz	Beschreibung /Summenformel	M [g <sup>+</sup> mol <sup>-1</sup> ]	Reinheit	Hersteller
Isopropanol	2-Propanol	60,1	99,95%, LC-MS- Grade	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Glycerol	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	92,09		Merck (Darmstadt, Deutschland)
Di-Natriumhydrogen- phosphat	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	177,99		Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumdihydrogenphos- hat	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	156,01		Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
deionisiertes (vollentsalztes) Wasser	H <sub>2</sub> O	18,0		



## 2.4 Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Biologische Entnahmequelle	Wachstumsmodus	Kulturmedium	Referenz
CHO	Englisch CHO = <i>Chinese Hamster Ovary</i> ; Epithelzelllinie aus dem Ovar eines chinesischen Zwerghamsters	Ovarien eines weiblichen Zwerghamsters	Suspension	DMEM mit Zusatz von 10 % FCS	ATCC® CCL-61™
HL-60	humane promyelozytäre Neutrophilen-ähnliche Zellen	Periphere Blut-Leukozyten einer 36-jährigen kaukasischen Frau; extrakorporal aufbereitet	Suspension	DMEM mit Zusatz von 10 % FCS	ATCC® CCL-240™
J774A.1	Murine Makrophagen	Zellen aus dem Aszites einer erwachsenen weiblichen Maus mit Retikulumzellen-Sarkom	adhärente Zellen	DMEM mit Zusatz von 10 % FCS	ATCC® TIB-67™
THP-1	humane Monozyten-ähnliche Zelllinie	Zellen aus dem peripheren Blut eines Patienten mit akuter monozytärer Leukämie	Suspension	DMEM mit Zusatz von 10 % FCS	ATCC® TIB-202™
WEHI-231	murine B-Zelllinie	B-Zellen aus dem Blut einer Maus	Suspension	DMEM mit Zusatz von 10 % FCS	ATCC® CCL-1702™

## 2.5 Puffer, Medien und Reagenzien zur Zellkultivierung

Bezeichnung	Beschreibung	Chemikalien	Hersteller
DMSO	Organische Schwefelverbindung	Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
FCS	Fetales Kälberserum zur Zellkultivierung		Universitätsklinikum Düsseldorf (Zentralapotheke)
Lyse-Puffer pH 7,4	Isotone Ammoniumchlorid-Lösung (500ml) zur Lysierung von Erythrozyten	8,29 mg Ammoniumchlorid 1.00 mg Kaliumhydrogencarbonat 0,0375 mg Na-EDTA	Universitätsklinikum Düsseldorf (Zentralapotheke)
PG-Puffer (pH 7,4)	Phosphat-Glycerol-Puffer	1mM Phosphat 7mM Dinatriumhydrogenphosphat 3mM Natriumdihydrogenphosphat 2,5% m/m Glycerol	eigene Herstellung
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (eng. phosphate-buffered saline), pH 7,4	137 mM Natriumchlorid 2.7 mM Kaliumchlorid 10 mM Natriumdihydrogenphosphat 1.8 mM Kaliumdihydrogenphosphat	

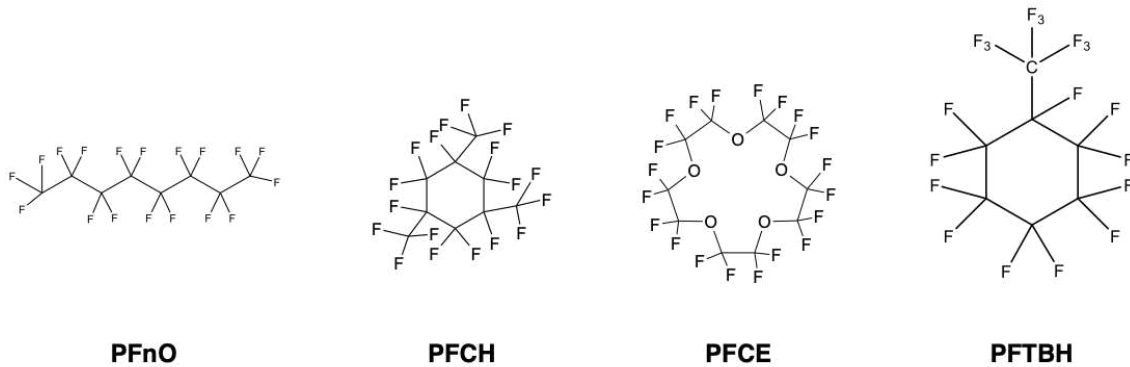
## 2.6 Software

Bezeichnung	Version	Beschreibung	Entwickler
Microsoft Office	2021	Zusammenstellung von Programmen zur Textverarbeitung, Tabellenkalkulation und Erstellung von Präsentationen	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
SNR-Tool	2010	Programm zur Analyse von $^{19}\text{F}$ -Bildern	Christoph Jacoby
CSI-Tool	2012	Programm zur Analyse von $^{19}\text{F}$ -Bildern	Christoph Jacoby
Overlay-Tool	2015	Programm zur Analyse von $^{19}\text{F}$ -Bildern	Christoph Jacoby
Prism	8	Statistik-Programm	GraphPad Software, Inc. (Boston, USA)
EndNote	20	Literaturverwaltungs-Programm	Clarivate™ (Philadelphia, USA)
FlowJo	10.08.0 1	Programm zur Analyse von Durchflusszytometer-Daten	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)

## 3 METHODEN

### 3.1 Herstellung von PFC-Nanoemulsionen

Es wurden vier verschiedene Perfluorkarbone zur Herstellung der PFCs verwendet: PF<sub>n</sub>O (Perfluor-*n*-octan), PFCH (Perfluor-1,3,5-Trimethylcyclohexan), PFCE (Perfluor-15-kronen-5-ether) und PFTBH (Perfluor tert-butylcyclohexan) (siehe Abb. 3-1).



**Abbildung 3-1 – Strukturformeln ausgewählter Perfluorkarbone:** Von links nach rechts schematisch dargestellt sind die Strukturformeln von PF<sub>n</sub>O (Perfluor-*n*-octan), PFCH (Perfluor-1,3,5-Trimethylcyclohexan), PFCE (Perfluor-15-kronen-5-ether) und PFTBH (Perfluor tert-butylcyclohexan).

Für die Herstellung von PFC-Nanoemulsionen sind zwei Aspekte essenziell: Zum einen ein Perfluorkarbon und der Emulgator Lipoid® E 80 SN, zum anderen ein hohes Maß an mechanischer Energie, welches der Rohemulsion zugeführt werden muss. Bereits im Stadium einer groben PFC-Rohemulsion liegt die Partikelgröße im Bereich mehrerer  $\mu\text{m}$ . Das im weiteren Emulgierungsprozess angewandte Verfahren der Hochdruck-Homogenisation verringert die Partikelgröße auf wenige 100 nm. Dabei wird mit hohem Kolbendruck (ca. 1000 bar) ein großer Scherstress auf die Partikel ausgeübt. Ein zusätzlicher Effekt ist die strömungsinduzierte Kavitation bzw. die ständige Bildung und das Zusammenfallen von mit Dampf gefüllten Blasen. Beide Phänomene sind essenziell: Sie führen zum Aufbruch der großen Tropfen und zur Tropfenzerkleinerung.

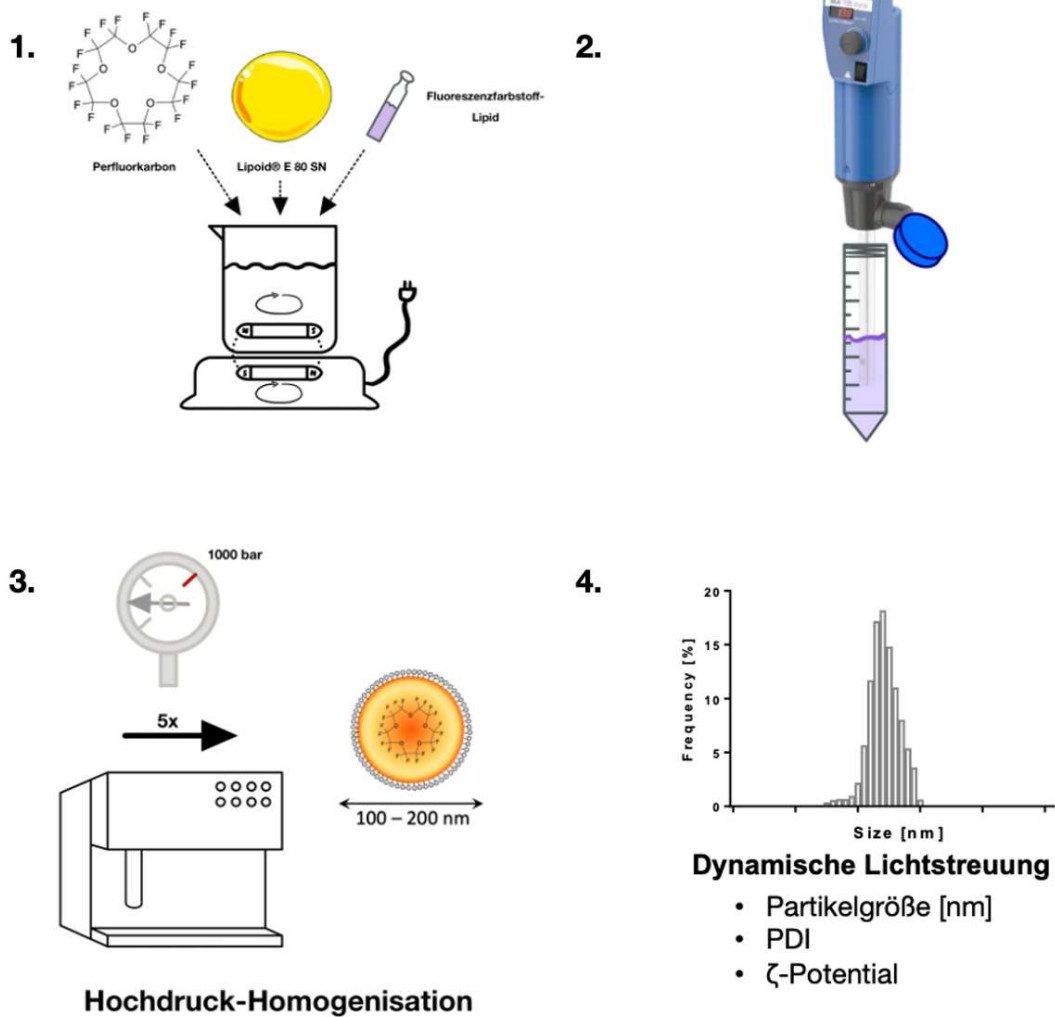
Für diese Arbeit werden jeweils 10 g von vier verschiedenen PFC-Nanoemulsionen mittels Hochdruck-Homogenisation hergestellt. Das zur Emulgierung benötigte Lipoid® E 80 SN wird dafür zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut, die entsprechend benötigte Menge abgewogen und in isotonischem Phosphat-Glycerol-Puffer für 20 Minuten bei 30 °C mit einem Magnetrührer dispergiert. Es folgt die Zugabe von 200  $\mu\text{g}$  von ATTO 425 /488 /647 / 700 markiertem DPPE (DPPE = 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin; Phospholipid). Das Rohmedium nimmt nach Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes bereits eine charakteristische Farbe an.

Im nächsten Schritt erfolgt die Zugabe der Perfluorkarbon-Reinsubstanzen zur Lipidlösung (Tabelle 1). Die Herstellung der PFCH-, PFTBH- und PF<sub>n</sub>O-PFCs erfordert die Zugabe des semifluorierten Alkans 1-(Perfluor-*n*-hexyl)decan als Di-Blocks, welches durch seine gleichzeitige Lipo- und Fluorophilie als Co-Emulgator dient. Es handelt sich

hierbei um ein semifluoriertes Alkan, welches sich in die Lipidschicht und die Phase der Perfluorkarbone einlagert und dadurch die Emulsionen stabilisiert [111].

Zur Emulgierung der Perfluorkarbone wird die Dispersion mit Hilfe eines Hochleistungsdispersierers (Ultra-Turrax® IKA T18 basic; Staufen, Deutschland) bei einer Umdrehungszahl von etwa 14.000 rpm für eine Dauer von 4 Minuten vorhomogenisiert (siehe Abb. 3-2). Dadurch entsteht eine sichtbar trübe Rohemulsion. Um nun die Partikelgröße zu reduzieren und zu homogenisieren, wird die Rohemulsion durch den Hochdruck-Homogenisator (Mikrofluidizer® LV1) in 5 Zyklen bei jeweils 20.000 PSI (ca. 1.000 bar) prozessiert, wodurch eine Nanoemulsion entsteht. Die Emulsion wird dabei sichtbar klarer. Je nach PFC-Komponente erhält man zwischen 6-10 ml PFC-Nanoemulsion, die für weitere Zwecke in 200 µl Eppendorf™-Gefäße abgefüllt wurden. Die PFCs wurden bei +4 °C gelagert. Die Mengenverhältnisse der PFC-Komponenten sind in Tabelle 1 aufgelistet.

<b>Tabelle 1: Zusammensetzung der hergestellten PFCs</b>							
Dargestellt von links nach rechts sind die Zusammensetzung von A425PFnO, A488PFCH, A647PFCE und A700PFTBH, sowie die jeweiligen Mengenangaben und zugesetzten Fluorochrome. Bei PFnO, PFCH und PFTBH erfolgte die Zugabe von 1-(Perfluor-n-hexyl)decan (F <sub>6</sub> H <sub>10</sub> ) als Di-Block, welcher als grenzflächenaktive Substanz fungiert. Bei PFCE ist ein DiBlock aufgrund des zyklischen Charakters nicht notwendig.							
*DPPE = 1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin (Phospholipid)							
Menge (ml)		Perfluorkarbon (g)		Di-Block F <sub>6</sub> H <sub>10</sub> (g)	Lipoid® E 80 SN (g)	PG-Puffer (g)	Fluorochrom
A425PFnO	6	Perfluor-(n)-octan	2	0,175	0,45	7,4	Atto425-DPPE
A488PFCH	6	Perfluor-1,3,5-Trimethylcyclohexan	2	0,175	0,45	7,4	Atto488-DPPE
A647PFCE	10	Perfluor-15-kronen-5-ether	1	-	0,37	9,18	Atto647-DPPE
A700PFTBH	6	Perfluor tert-butylcyclohexan	2	0,175	0,45	7,4	Atto700-DPPE



**Abbildung 3-2 – Herstellungsprozess von Perfluorkarbon-Nanoemulsionen (PFCs):** Im ersten Schritt (1.) werden Phosphat-Glycerol-Puffer, Perfluorkarbon, Lipid und Fluorophor bei 30°C über einen Zeitraum von 20 Minuten zusammen gemischt. Hierzu wird zunächst Lipid mit dem Phosphat-Glycerol-Puffer verrührt. Zu dem Gemisch wird anschließend das Fluoreszenz-Lipid sowie das Perfluorkarbon hinzugefügt, wodurch ein heterogenes Gemisch entsteht. Im Anschluss (2.) erfolgt die Dispergierung mit dem Ultra Turrax® IKA T18, wodurch die PFCs eingekapselt werden und eine Rohemulsion entsteht, deren mittlere Partikelgröße im Bereich weniger Mikrometer liegt. Im finalen Schritt der PFC-Herstellung (3.) wird die Rohemulsion in fünf Zyklen mittels Hochdruck-Homogenisation bei einem Druck von 1.000 bar prozessiert, um eine Reduktion der Partikelgröße auf 100 - 200 nm zu erreichen. Zur Qualitätskontrolle wird abschließend (4.) eine DLS-Messung durchgeführt, bei der die Parameter Partikelgröße, PDI und  $\zeta$ -Potential ermittelt werden.

## **3.2 Analyse von PFCs mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS)**

PFC-Nanoemulsionen sind disperse Systeme, deren Qualität sich in der Größe Partikel, der Oberflächenladung und ihrer Homogenität ausdrückt. Die hergestellten PFCs wurden mit dynamischer Lichtstreuung (DLS) hinsichtlich ihrer Partikelgröße, der Partikelgrößenverteilung (PDI) und des  $\zeta$ -Potentials untersucht.

### **3.2.1 Qualitätsparameter von PFC-Nanoemulsionen**

In dieser Arbeit werden als Qualitätsmerkmale der hergestellten PFCs die Größenunterschiede der hydrodynamischen Durchmesser, die Größenverteilung (PDI) und die Oberflächenladung der Partikel ( $\zeta$ -Potential) als Qualitätsmerkmale der PFCs mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) mit einem Microtrac MRB NANOTRAC Wave II Gerät bestimmt.

Der tatsächliche Partikeldurchmesser lässt sich nur für kugelförmige Objekte angeben. Da sich innerhalb einer Flüssigkeit nicht nur die Moleküle der Flüssigkeit bewegen, sondern auch die Partikel selbst, wird mittels dynamischer Lichtstreuung ein sogenannter hydrodynamischer Durchmesser berechnet. Dieser ist immer etwas größer als der tatsächliche Partikeldurchmesser. Er bestimmt wesentlich die Aufnahmeeigenschaft der PFCs durch Phagozyten und andere Zellarten [112]. Eine Veränderung der Mengenverhältnisse von Lipid und Perfluorkarbon kann die Größe der Partikel beeinflussen [113]. Meist liegt der hydrodynamische Durchmesser von PFCs zwischen 100 nm und 200 nm [112].

Der Polydispersitätsindex (PDI) gibt die Größenverteilung und Einheitlichkeit von Partikelgrößen an. Er ist ein dimensionsloser Zahlenwert und nimmt Werte zwischen 0,0 und 1,0 an. Werte von 0,5 bis 1,0 sprechen für eine breite Dispersität und ein überwiegend polydisperses System, während Werte von 0,2 bis 0,5 für eine geringe Dispersität sprechen. Werte von  $< 0,1$  sprechen für eine monodisperse Emulsion.

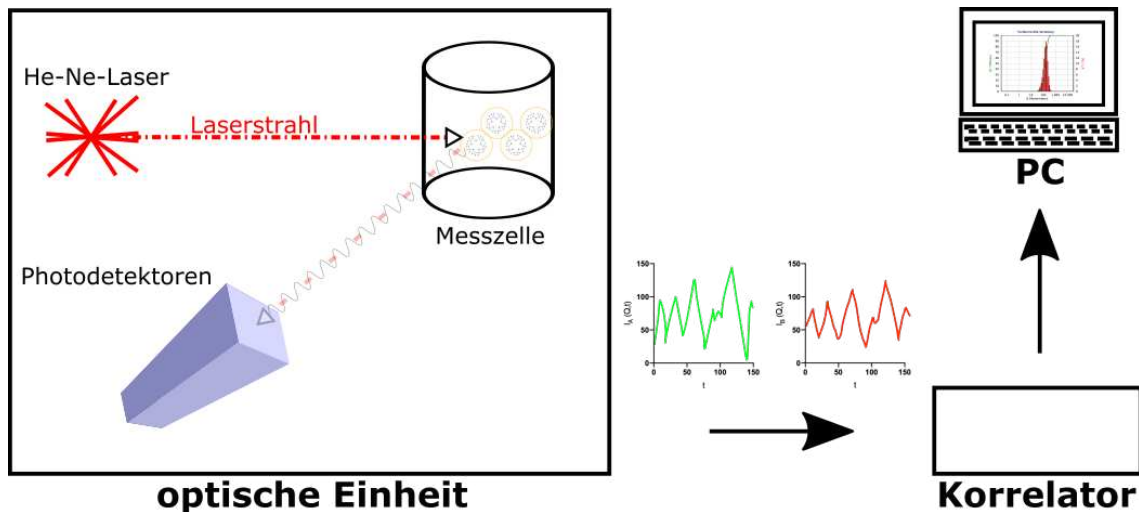
Das  $\zeta$ -Potential gibt die Oberflächenladung der Partikel wieder und kann als Maß für die elektrostatische Abstoßung der Partikel untereinander verstanden werden. Je stärker negativ das  $\zeta$ -Potential ist, umso stärker stoßen sich die Partikel gegenseitig ab und umso geringer ist die Koaleszenz, was der Stabilität der Emulsion zugutekommt.

### **3.2.2 Messtechnische Grundlagen einer DLS-Messung**

Es können mit einem DLS-Gerät Partikelgrößen von 5 nm bis 3  $\mu\text{m}$  analysiert werden. Durch das Auftreffen von monochromatischem Laserlicht auf die Nanopartikel der Probe wird das Licht in verschiedene Richtungen gestreut. Aufgrund der relativen Beweglichkeit der Teilchen innerhalb einer Probe (Gesetz der Brown'schen Molekularbewegung) verändert sich die Streulichtintensität über die Zeit. Große Teilchen sind gemäß der Stokes-Einstein-Beziehung weniger Bewegungen unterworfen, was

weniger Fluktuationen der Streulichtintensität erzeugt. Die Frequenzverschiebungen können anschließend messtechnisch durch den Photomultiplier erfasst werden.

Aus dem Rauschsignal kann dann eine Autokorrelationsfunktion ermittelt werden, die beschreibt, wie stark ein Signal mit sich selbst bei unterschiedlichen Zeitverschiebungen korreliert. Während man bei monodispersen Emulsionen eine Exponentialfunktion erhält, wird bei polydispersen Systemen eine kompliziertere Funktion gebildet. Aus dieser Funktion wird durch mathematische Umformung eine Häufigkeitsverteilung der hydrodynamischen Partikelgrößen innerhalb einer Probe errechnet.



**Abbildung 3-2 – Funktionsweise eines DLS-Analysegerätes:** Vereinfacht dargestellt ist das Funktionsprinzip der Photonenkorrelationsspektroskopie exemplarisch anhand einer PFC-Nanoemulsion im DLS-Analysegeräts. Links im Bild ist zu erkennen, wie durch einen Helium-Neon-Laser in der Messzelle das Anregungslicht von den hinzugefügten PFC-Nanoemulsionen aufgenommen wird. Fluktuationen der Streulichtintensitäten des reflektierten Laserlichts werden durch einen Photomultiplier erfasst. Durch Kreuzkorrelation zweier Signale wird der Einfluss der Mehrfachstreuung in polydispersen Systemen unterdrückt, wodurch eine korrekte Berechnung der Partikelgrößenverteilung erfolgen kann.

### 3.2.3 Durchführung der DLS-Messung

Nach der PFC-Herstellung werden Partikelgröße, Polydispersität und des  $\zeta$ -Potentials mit Hilfe eines DLS-Analysegerätes nach einer standardisierten Prozedur gemessen und verglichen. Die Messungen erfolgen in drei Messzyklen, bestehend aus je 5 Einzelmessungen. Zu Beginn jedes Messzyklus wird die Messkammer mit VE-Wasser gespült und das Messgerät durch eine *Set Zero* Messung neu kalibriert, um ein genaueres Messergebnis zu erhalten. Es werden anschließend 980  $\mu\text{l}$  VE-Wasser mit 20  $\mu\text{l}$  PFCs gemischt und in die Messkammer eingebracht. Vor dem Start erfolgt eine Überprüfung des *Loading Index*. Bei dem *Loading Index* handelt es sich um einen Wert, welcher aus den elektrischen Signalen des Messdetektors gewonnen wird. Er berechnet sich durch Summation der Amplituden aller logarithmischen Frequenzkanäle und ist proportional zur Partikelkonzentration. Bei der statistischen Auswertung erfolgt anschließend eine Mittelung der Messwerte.



### 3.3 Fluoreszenzmessungen von PFC-Nanoemulsionen

#### 3.3.1 IVIS® Lumina II

Die im Herstellungsprozess hinzugefügten fluoreszenzmarkierten Lipide Atto425-DPPE, Atto488-DPPE, Atto647-DPPE, Atto700-DPPE von Attotec® sind, wie in Tabelle 2 ersichtlich, Tandemkonjugate. Bei Tandemkonjugaten handelt es sich um eine Kombination von Fluoreszenzfarbstoffen, bei denen eine Komponente Licht einer definierten Wellenlänge absorbiert und die andere Komponente Lichtquanten mit höheren Wellenlängen emittiert, die von einem Fluoreszenzdetektor detektiert werden können. Die Fluoreszenzmarkierung wurde mit Hilfe des IVIS® Lumina II-Biolumineszenz-Detektors überprüft, der durch verschiedene Anregungs- und Emissionsfilterkombinationen eine Analyse der Proben in verschiedenen Fluoreszenzkanälen erlaubt und die Analyse und Quantifizierung des Fluoreszenzsignals zulässt.

<b>Tabelle 2: Anregungs- und Emissionsbereiche der verwendeten Fluorochrome</b>		
Dargestellt sind von die vom Hersteller angegebenen effizienten Anregungsbereiche und Emissionsbereiche von Atto425, Atto488, Atto647 und Atto700.		
*DPPE = 1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin (Phospholipid)		
	<b>λ abs (nm)</b>	<b>λ fl (nm)</b>
Atto425-DPPE	436 (405-455)	484
Atto488-DPPE	501 (480-515)	523
Atto647-DPPE	647 (615-660)	667
Atto700-DPPE	700 (670-715)	716

<b>Tabelle 3: Filterkombinationen für die IVIS-Messungen</b>		
Dargestellt ist die Auswahl der Kombinationen von Anregungs- und Emissionsfilter für die entsprechenden PFCs für die IVIS-Messungen. Die Kombinationen der Filter orientieren sich jeweils an den Herstellerangaben der Anregungs- und Emissionswellenlängen der Fluoreszenzlipide. Es wurden die geräteseitig zur Verfügung stehenden Standard-Anregungsfiltersets und Standard-Exzitationsfiltersets des IVIS® Lumina II verwendet.		
	<b>Anregungsfilter (nm)</b>	<b>Emissionsfilter (nm)</b>
A425PFnO	430	520-560
A488PFCH	465	520-560
A647PFCE	640	720
A700PFTBH	710	810-875

### 3.3.2 Fluoreszenzspektroskopie

Die Messungen erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Tuba Güden-Silber (Institut für Molekulare Kardiologie) und M. Sc. Simone Hauer sowie Prof. Dr. Thomas J. J. Müller (Institut für Organische Chemie der Heinrich-Heine-Universität). Sämtliche Proben (PFC-Proben, Lipid-Proben, Referenz-Probe) wurden in einem Fluoreszenzspektrometer vom Typ F-7000 (Hitachi® FL solutions) gemessen. Die PFC-Proben und Lipid-Proben wurden zu den in Tabelle 4 angegebenen Konzentrationen in reinem Wasser gelöst. Als Referenz wurde für die Messungen reines Wasser verwendet. Nach dem Messprotokoll wurde zunächst ein Spektrum für die Referenz gemessen und anschließend ein Spektrum für die Lipid-Proben und PFC-Proben analysiert und die Daten protokolliert.

<b>Tabelle 5: Verdünnung der Proben</b>		
In der Tabelle aufgelistet sind die Proben, die Anregungswellenlänge $\lambda$ , und die Konzentration der gemessenen Proben. Die Anregungswellenlänge ist an den Herstellerangaben der PFCs ausgerichtet. Die Proben werden mit reinem Wasser verdünnt, welches ebenfalls als Referenz dient.		
	<b>Anregungswellenlänge <math>\lambda</math> (nm)</b>	<b>Verdünnung</b>
Atto425-DPPE	405	33 : 1000
A <sup>425</sup> PFnO	405	44 : 1000
Atto488-DPPE	480	33 : 1000
A <sup>488</sup> PFCH	480	33 : 1000
Atto647-DPPE	615	33 : 1000
A <sup>647</sup> PFCE	615	44 : 1000
Atto700-DPPE	670	33 : 1000
A <sup>700</sup> PFTBH	670	44 : 1000
Referenz	405 / 480 / 615 / 670	1 : 1

### 3.4 $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT-Messungen von PFCs

Für die Bildgebung mittels Multispektraler  $^{19}\text{F}$ -MRT ist es essenziell, dass die ausgewählten PFCs möglichst eine einzige  $^{19}\text{F}$ -Spitze besitzen und sich die  $^{19}\text{F}$ -Spektren der PFCs nicht überlappen. Die Messung der  $^{19}\text{F}$ -Spektren und der  $^{19}\text{F}$ -Signale der PFCs wurde mittels  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT durchgeführt. Zur Verfügung stand ein vertikales 9.4 T AVANCEIII Widebore NMR Spektrometer (Bruker, Reinstetten, Deutschland) mit einem Volumenresonator, der sowohl  $^1\text{H}$ -Messungen (400.21 MHz) als auch  $^{19}\text{F}$ -Messungen (376.54 MHz) erlaubte. Es wurden multispektrale  $^{19}\text{F}$ -Bilder aufgenommen und mit  $^1\text{H}$ -Referenzaufnahmen überlagert.

Für die MRT-Messung der PFCs werden 20  $\mu\text{l}$  entnommen und in ein 200  $\mu\text{l}$  Reaktionsgefäß überführt und zirkulär um ein  $\text{H}_2\text{O}$ -gefülltes Röhrchen angeordnet. Anschließend werden orientierende  $^1\text{H}$ -Messungen bei 400.21 MHz durchgeführt, sowie  $^{19}\text{F}$ -Messungen bei 376.54 MHz in gleicher Schnittebene. Die für die Messung benötigten Parameter sind in Tabelle 6 aufgeführt.

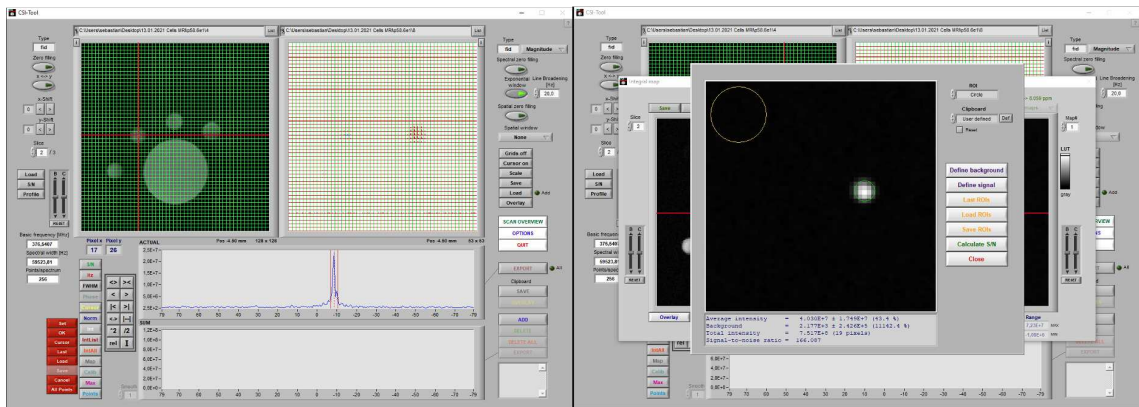
<b>Tabelle 6:</b> Nachfolgend aufgeführt sind die Prozessparameter für die $^{19}\text{F}$ -MRT-Messungen.	
<b>CSI-Sequenz</b>	2D_CSI_19F
<b>Matrixgröße</b>	32 x 32 / 64 x 64
<b>FOV (Field of View)</b>	2,56 cm
<b>Schichtdicke</b>	3 mm
<b>Averages</b>	10000
<b>Messzeit</b>	4 min

Die Rekonstruktion und Analyse der 2D-CSI-Datensätze erfolgt mit einer in der Arbeitsgruppe entwickelten Software (CSI-Tool) [114], welches in der graphischen Programmiersprache LabVIEW (National Instruments, 1986) geschrieben wurde. Damit können zwei- und dreidimensionale CSI-Datensätze verarbeitet werden.

Zur Berechnung der Signalstärke werden dafür innerhalb eines benutzerdefinierten Integrals Pixel für Pixel alle spektralen Intensitäten aufsummiert, wodurch Chemical-Shift-Artefakte weitgehend vermieden werden. Die Quantifizierung der Daten erfolgt durch Bestimmung von Intensitätswerten und des Rauschverhältnisses anhand eines vorher definierten Hintergrundsignals. Um ein genaueres Messergebnis zu erhalten, werden Tore um das Hauptsignal gesetzt (siehe Abb. 3-4 linker Teil unten; rot). Zusätzlich wird vor der Berechnung das Hintergrundsignal (siehe Abbildung 3-4 rechter Teil; gelber Kreis) vom ermittelten Wert subtrahiert. Die Messwerte werden nach

dreimaliger Wiederholung des Versuchs gemittelt und abschließend bewertet. Die statistische Auswertung erfolgt wie unter Punkt 3.7 angegeben.

Neben der Schichtaufnahme eines Bildes, welches den individuellen Fluorgehalt einer Probe repräsentiert, wird außerdem ein  $^1\text{H}$ -Referenzbild aufgenommen und diese beiden Aufnahmen anschließend überlagert. Anhand der durch die  $\text{CF}_3$ -Gruppen von  $\text{A425PFnO}$ ,  $\text{A488PFCH}$ ,  $\text{A700PFTBH}$  und  $\text{CF}_2$ -Gruppen von  $\text{A647PFCE}$  empfangenen Haupt- $^{19}\text{F}$ -Signale lassen sich die  $^{19}\text{F}$ -Spektren der PFCs bei der Auswertung unterscheiden.



**Abbildung 3-3 – Quantitative Auswertung eines 2D-CSI Datensatzes mit dem CSI-Tool:** Die linke Bildschirmaufnahme zeigt die örtliche Zuordnung der  $^1\text{H}$ -Referenzaufnahme zu den korrespondierenden NMR-Spektren dargestellt. Im rechten Teil der linken Bildschirmaufnahme ist zu sehen, dass für jeden Voxel (getrennt durch die Gitternetzlinien) ein gesamtes NMR-Spektrum aufgenommen wurde. Es wurde der Voxel mit dem stärksten Signal für die Auswertung ausgewählt und das Haupt- $^{19}\text{F}$ -Signal aus dem NMR-Spektrum ermittelt. Bei der rechten Bildschirmaufnahme ist ein aus dem CSI-Datensatz rekonstruiertes Bild zu sehen, wo sich der Bereich mit dem Haupt- $^{19}\text{F}$ -Signal als Hotspot darstellt. Mit diesen Daten wurde die SNR berechnet.

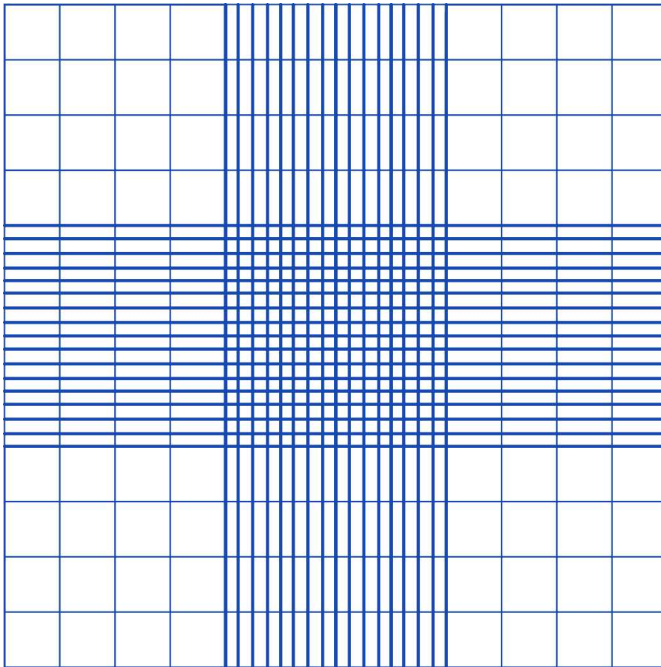
### 3.5 Zelluläre Aufnahme von PFCs durch J774A.1-Zellen

Um die zelluläre Aufnahme der PFCs zu untersuchen, werden murine J774A.1-Zellen verwendet. Diese Zellen stammen aus dem Aszites einer erwachsenen weiblichen Maus mit Retikulumzellen-Sarkom und besitzen Makrophagen-ähnliche Eigenschaften [115, 116].

#### 3.5.1 Bestimmung der Zellanzahl mit der Neubauer-Zählkammer

Die Anzahl der kultivierten Zellen wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt, die zur lichtmikroskopischen Zählung dient. Hierbei handelt es sich um eine spezielle Zählkammer, welche aus dem Hohlraum zwischen zwei zueinander parallel angeordneten Glasplatten gebildet wird und in Quadranten unterteilt ist. Je nach Zellart und Ausführung können eine oder mehrere Zählkammern enthalten sein. Die Kammerhöhe liegt meist bei 0,1 mm. Zur Zählung wird die entnommene Zellsuspension verdünnt und unter Ausnutzung der Kapillarwirkung zwischen die Glasplatten eingebracht. Die Zellen verteilen sich in einer Ebene und das Zählraster (siehe Abb. 3-5) ermöglicht dann eine präzise Bestimmung der Zellkonzentration. Zur Berechnung der Zellzahl in der Ausgangssuspension muss die Anzahl der gezählten Zellen mit einem

Korrekturfaktor multipliziert werden, welcher das Volumen der Zählkammer und die Verdünnung der Zellsuspension berücksichtigt.



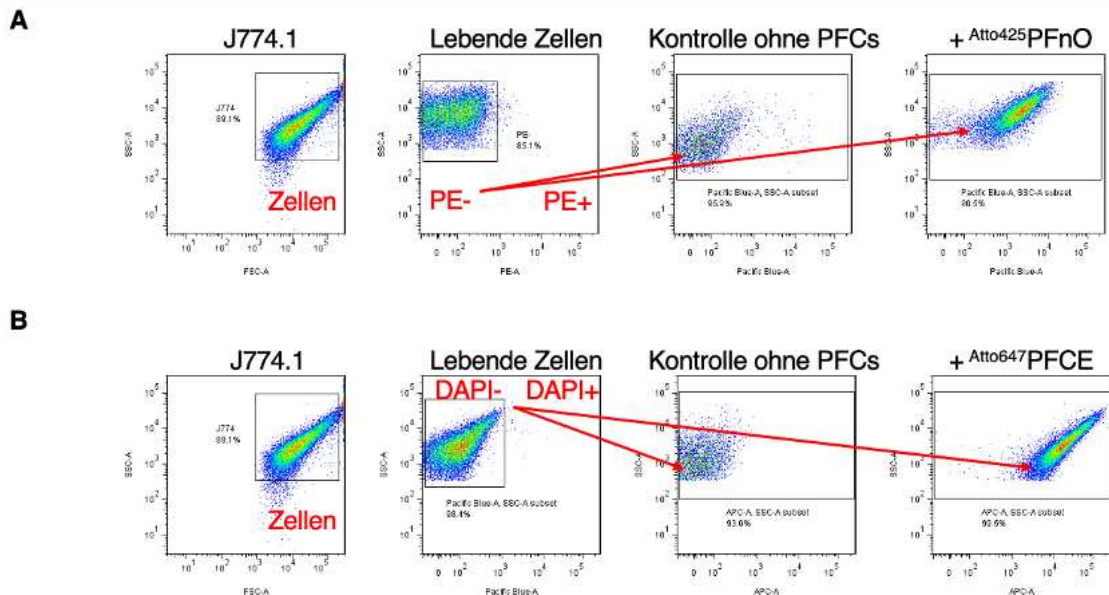
**Abbildung 3-4 – Neubauer Zählkammer:** Vereinfacht dargestellt ist eine Neubauer-Zählkammer. Gewöhnlich werden die Felder der vier großen Eckquadrate für Leukozytenzählungen genutzt. Das Mittelquadrat ist zur Auszählung von besonders kleinen Zellen, wie beispielsweise Erythrozyten und Hefen, in kleinere Abschnitte unterteilt.

### 3.5.2 Durchflusszytometrische Analyse der PFC-Aufnahme

Um die zelluläre Aufnahme der PFCs zu untersuchen, werden murine J774A.1-Zellen *in vitro* bei 37 °C im Klimaschrank kultiviert. Bei diesen Zellen handelt es sich um adhärente Zellen, welche beispielsweise durch Abschaben oder mit Hilfe von 1 ml 0,5% Trypsin vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst werden können. Aus dem Zellkulturmedium, welches ca.  $1 \times 10^6$  Zellen / 1 ml enthält, werden 15 ml entnommen und in ein 15 ml Reagenzgefäß gegeben und für 5 min bei 300 RPM zentrifugiert.

Das Pellet wird in Medium aufgenommen und noch einmal zentrifugiert. Schließlich werden die Zellen in Nährmedium aufgenommen und jeweils 1 ml der Flüssigkeit wie folgt aufgeteilt: a) 1 ml Kontrollgruppe, b) 1 ml Zellen mit Zugabe von 50  $\mu$ l bei +4 °C gelagerter PFC-Nanoemulsion ( $A^{425}$ PFnO,  $A^{488}$ PFCH,  $A^{647}$ PFCE,  $A^{700}$ PFTBH). Die Reagenzgefäße mit den zugesetzten PFCs werden anschließend im 37 °C Schrank inkubiert und zeitgleich geschwenkt. Nach 40 min werden jeweils 200  $\mu$ l Flüssigkeit aus den Reagenzgefäßen entnommen und in 1 ml PBS-gefüllte eisgekühlte FACS-Röhrchen verteilt, um die Reaktion abzustoppen. Die FACS-Röhrchen werden schließlich bei 500 RPM für 3min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Proben mit  $A^{488}$ PFCH,  $A^{647}$ PFCE,  $A^{700}$ PFTBH in 200  $\mu$ l PBS in 200  $\mu$ l DAPI-Färbelösung (Konzentration: 1  $\mu$ g / ml) suspendiert. Die Färbung der toten Zellen erfolgt bei der Zellprobe mit  $A^{425}$ PFnO mit Propidium-Iodid in gleicher Konzentration, um eine Überlagerung im Pacific-Blue-Kanal zu verhindern. Die Zellen wurden im Durchflusszytometer gemessen und jeweils die

FACS-Daten des entsprechenden Fluoreszenzkanals mittels der Software Flowjo 10™ ausgewertet (siehe Abbildung 3-6).



**Abbildung 3-5 – Gating-Strategie für FACS-Analysen: A, B)** Dargestellt ist die Auswertung der FACS-Analyse für  $A^{425}$ PFnO,  $A^{488}$ PFCH,  $A^{647}$ PFCE und  $A^{700}$ PFTBH. Es wurde zunächst die Zellpopulation identifiziert, anschließend die lebenden Zellen (DAPI - / PE -) im Gate bestimmt (PE - = mit Propidiumiodid gefärbte Zellen). Aus den lebenden Zellen wurden anschließend für zwei Versuchsgruppen (Kontrolle und Zellen + jeweilige PFCs) die fluoreszierenden Zellen identifiziert (Pacific Blue +, FITC, APC-A, APC-Cy7-A).

### 3.5.3 Darstellung der zellulären Aufnahme mittels $^1\text{H}$ -/ $^{19}\text{F}$ -MRT

#### 3.5.3.1 Vorbereitung

Zuvor in Nährmedium kultivierte J774A.1-Makrophagenzellen werden zunächst zu je 3ml Zellsuspension in 6-Well-Platten ausgesät und für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach 24 Stunden Inkubationszeit werden in vier Ansätzen jeweils 100  $\mu\text{l}$  20% PFCs ( $A^{425}$ PFnO,  $A^{488}$ PFCH,  $A^{647}$ PFCE,  $A^{700}$ PFTBH) zu den Zellen hinzugegeben und die Zellen nochmals bei 37 °C für 24 Stunden inkubiert. Die Zellen werden anschließend drei Mal mit PBS gewaschen bei 500 RPM für 5 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird das Zellpellet in PBS wiederaufgenommen und zur 10-minütigen Fixation der Zellen Paraformaldehyd im Verhältnis 1/10 zur Lösung hinzugegeben. Nach der Fixation der Zellen erfolgt ein Zentrifugieren der Zellen bei 500 RPM und die Suspension der Zellen in PBS. Die Lagerung der fixierten Zellen erfolgte bei +4 °C im Klimaschrank.

#### 3.5.3.2 MRT-Aufnahmen der fixierten Zellen

Vor der Messung werden die fixierten J774A.1-Zellen in ein PCR-Gefäß überführt, in 200  $\mu\text{l}$  PBS aufgenommen und nochmals bei 300 RPM für 5 Minuten zentrifugiert. Die Proben werden zirkulär um ein  $\text{H}_2\text{O}$ -gefülltes Eppendorf-Tube angeordnet. Danach erfolgt die Aufnahme von  $^1\text{H}$ -Aufnahmen als Referenzbild in 2 Ebenen (axial und sagittal). Es werden im Anschluss  $^{19}\text{F}$ -MRT-Aufnahmen mit der 2D-CSI-Methode mit den in Tabelle 6 aufgeführten Einstellungsparametern durchgeführt (siehe Methodenteil Tabelle 6) und mit den orientierenden  $^1\text{H}$ -Aufnahmen überlagert. Die quantitative Auswertung der  $^{19}\text{F}$ -

MRT-2D-CSI-Aufnahmen erfolgt mit dem CSI-Tool (siehe Methodenteil Abb. 3-4). Es erfolgen drei Wiederholungen, wobei der Mittelwert der SNR-Werte nach Subtraktion des Hintergrundsignals (PFC-freie Bereiche) in die abschließende Bewertung einhergeht.

### **3.6 Kombinatorische Darstellung mehrerer Zelllinien**

Zum Zwecke der Bildgebung mittels PFC-basierter Multispektraler <sup>19</sup>F-MRT werden THP-1-Zellen, HL-60-Zellen, CHO-Zellen und WEHI-231 Zellen verwendet. Hierbei handelt es sich um eine humane Monozyten-ähnliche Zelllinie (THP-1), humane Neutrophilen-ähnliche Zellen (HL-60), eine Epithelzelllinie aus dem Ovar eines chinesischen Hamsters (CHO) und eine murine B-Zelllinie (WEHI-231). Von diesen Zellen ist bekannt, dass sie zur passiven Aufnahme liposomaler Partikel fähig sind [117-125].

#### **3.6.1 Inkubation der Zellen mit PFCs**

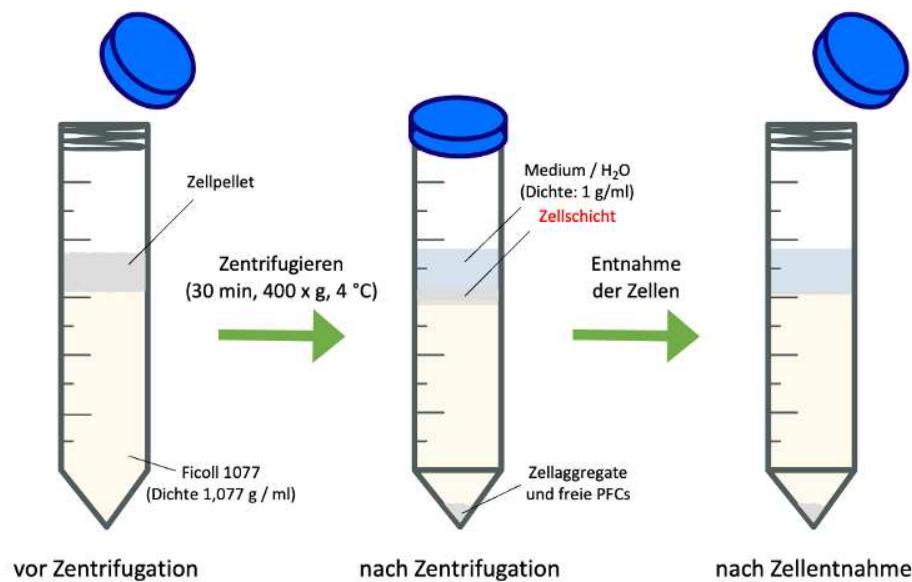
Nach Kultivierung der THP-1-, HL-60-, CHO- und WEHI-231-Zellen wurde die Zellzahl in einer Neubauer Zählkammer bestimmt (siehe Methodenteil 3.5.1). Für die Inkubation der Zellen mit den jeweiligen PFCs wurden zwischen  $1-2 \times 10^7$  Zellen eingesetzt.

Zum Zwecke der Zellmarkierung erfolgte eine zweistündige Inkubation von jeweils einer Zelllinie mit 200  $\mu$ l jeweils eines der PFCs (<sup>A425</sup>PFnO, <sup>A488</sup>PFCH, <sup>A647</sup>PFCE <sup>A700</sup>PFTBH) bei 130 RPM und 37 °C in folgender Kombination: THP-1 mit <sup>A425</sup>PFnO, HL-60 mit <sup>A488</sup>PFCH, CHO mit <sup>A647</sup>PFCE und WEHI-231 mit <sup>A700</sup>PFTBH.

#### **3.6.2 Aufreinigung über die Dichtegradientenzentrifugation**

Um die Zellen, die PFCs aufgenommen haben und freie PFCs zu trennen, werden die Proben vor den MRT-Messungen mittels Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt. Dazu werden sie in ein Zentrifugenröhrchen gefüllt, welches ein spezielles Dichtegradientenmedium enthält, das Polysaccharide enthält. Für die Experimente wurde ein Ficoll®-Medium mit einer Dichte von 1,077 g / 1 ml genutzt. Nach vorsichtiger Zugabe der Zellen auf die Oberfläche des Mediums folgt eine 30-minütige Zentrifugation bei 400 x g und 4 °C. Aufgrund des Konzentrationsgefälles haben Zellaggregate und Partikel höherer Dichte nach der Zentrifugation eine höhere Sedimentationsrate, während leichtere Bestandteile weiter oben im Röhrchen verbleiben (siehe Abb. 3-7). Das Zellmaterial wird anschließend aus dieser Schicht mit Hilfe einer Pipette entnommen und zwei Mal mit MACS-Puffer gewaschen. Verklumptes Zellmaterial und PFC-Aggregate, welche die Messergebnisse verfälschen könnten, bleiben am Boden des Zentrifugenröhrchens zurück.





**Abbildung 3-6 – Dichtegradientenzentrifugation:** Dargestellt ist der Ablauf der Aufreinigung der PFCs in mittels Dichtegradientenzentrifugation. Nach der Zentrifugation bildet sich eine Zellschicht (rot dargestellt), welche die aufgereinigten Zellen enthält. Die Zellaggregate befinden sich aufgrund ihrer höheren Dichte am Boden des Röhrchens.

### 3.6.3 Fixierung der Zellen und MRT-Messungen

Zur Fixierung der Zellen wurden 4 ml Zellmaterial entnommen und 1 ml Medium dazugegeben. Die Zellen wurden zunächst anschließend bei 300 RPM für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und das Zellpellet in 4 °C kaltem MACS-Puffer aufgenommen. Es erfolgten zwei Wiederholungen dieses Schritts, um Verunreinigungen zu entfernen. Nach der Waschung wurden die Zellen in 2 ml MACS-Puffer aufgenommen und auf 5 ml Ficoll aufgetragen. Die Zellsuspension wurde dann bei 400 RPM für 30 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Zellen in ein neues 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und bei 300 RPM für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in 500  $\mu$ l 1% PFA für 10 Minuten fixiert und anschließend zweimal gewaschen, um überschüssiges PFA-Fixiermittel zu entfernen. Nach Abschluss des Fixierschrittes wurde das Zellpellet in 200  $\mu$ l Puffer aufgenommen und in ein PCR-Gefäß überführt und nochmals bei 300 RPM für 5 Minuten zentrifugiert.

Zunächst wurden die PCR-Gefäße mit den Zellen zirkulär um ein H<sub>2</sub>O-gefülltes Eppendorf-Gefäß angeordnet. Danach erfolgte die Aufnahme von <sup>1</sup>H-Aufnahmen als Referenzbild in 2 Ebenen. Zusätzlich erfolgen <sup>19</sup>F-MRT-Aufnahmen (2D-CSI-Methode) mit den in Tabelle 6 des Methodenteils aufgeführten Einstellungsparametern. Die Aufnahmen werden mit den orientierenden <sup>1</sup>H-Aufnahmen überlagert. Mit Hilfe des CSI-Tools erfolgt die quantitative Auswertung der <sup>19</sup>F-MRT-Aufnahmen (siehe Methodenteil Abb. 3-4). Nach Subtraktion des Hintergrundsignals (PFC-freie Bereiche) erfolgen insgesamt drei Messungen, wovon der Mittelwert der SNR-Werte berechnet wird.



### 3.7 Statistische Auswertung

Für die statistische Analyse der Messdaten wurde die Software GraphPad PRISM (Version 9.5.1) verwendet. Zunächst wurde untersucht, ob eine Normalverteilung der Messdaten vorliegt. Dazu wurde der Kolmogorov-Test verwendet. Im Falle normalverteilter Messdaten erfolgte die Analyse der Daten mittels Welch-ANOVA-Test (*Analysis of Variance*), um mögliche Unterschiede in den Mittelwerten der verschiedenen Gruppen festzustellen. Diese Variante der ANOVA wurde verwendet, da die Varianzen zwischen den Gruppen nicht ähnlich waren. Bei der ANOVA handelt sich um ein Verfahren, welches den Vergleich von drei oder mehr unabhängigen Stichproben erlaubt. Das statistische Signifikanzniveau wurde zu einem  $\alpha$ -Niveau von 0.05 festgelegt (p-Wert). Die Tests und die grafische Darstellung wurden mit der Software GraphPad PRISM 9.5.1 durchgeführt.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Herstellung und Charakterisierung von PFCs mit individuellen <sup>19</sup>F-Signaturen

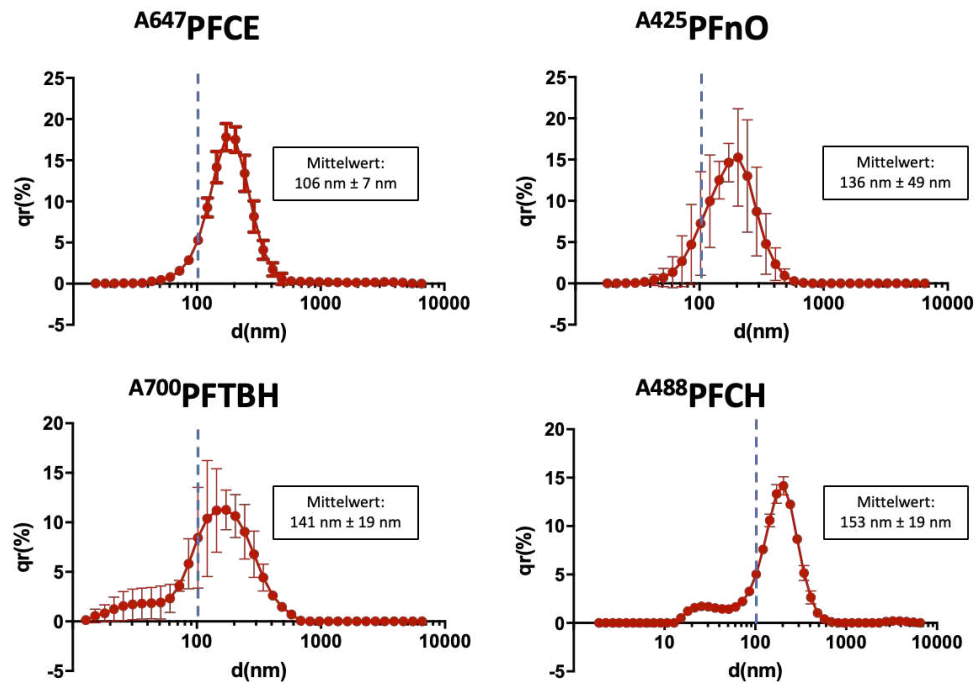
Das Ziel dieser Arbeit war es die bildgebende Darstellung wurden von vier immunologisch relevanten Zelltypen mittels PFCs und Multispektraler <sup>19</sup>F-MRT zu ermöglichen. Dazu wurden vier PFCs mit individuellen, spektral unterscheidbaren, <sup>19</sup>F-Signaturen durch Hochdruck-Homogenisation erzeugt, die noch zusätzlich die fluoreszenzmarkierte Lipide Atto425-DPPE, Atto488-DPPE, Atto647-DPPE und Atto700-DPPE enthielten (siehe Methodenteil Tabelle 1). Bei DPPE handelt es sich um ein wasserlösliches Derivat von Phosphatidylethanolamin, welches mit den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert ist und zur Verankerung in der Lipidhülle der PFCs dient. Auf diesem Wege wurden folgende PFCs hergestellt: <sup>A425</sup>PFnO, (Atto425-Perfluor-n-octan), <sup>A488</sup>PFCH (Atto488-Perfluorocyclohexan), <sup>A647</sup>PFCE (Atto647-Perfluor-15-kronen-5-ether) sowie <sup>A700</sup>PFTBH (Atto700-Perfluor tert-butyl-cyclohexan). Nach der Herstellung der PFCs wurden zur Qualitätskontrolle des Herstellungsprozesses zunächst die mittlere Partikelgröße, die Polydispersität und das ζ-Potential der hergestellten PFCs über dynamische Lichtstreuung (DLS) untersucht und zudem das <sup>19</sup>F-Signal der PFCs über <sup>19</sup>F-MRT-Messungen bestimmt. Die Fluoreszenz der PFCs wurde mittels Fluoreszenzspektroskopie und IVIS-Messungen untersucht. Anschließend wurde im zweiten Teil der Arbeit die passive Aufnahme der PFCs durch Maus-Makrophagen vom Typ J774A.1 und RAW mittels Durchflusszytometrie und <sup>19</sup>F-MRT untersucht. Im letzten Teil der Arbeit wurden dann vier verschiedene Zelltypen THP-1 (Monozyten-ähnliche Zellen), WEHI (B-Zell-ähnliche Zellen, HL-60 (Neutrophilen-ähnliche Zellen) und CHO (Epithelzellen) *in vitro* mit unterschiedlichen PFCs markiert und diese dann simultan mittels Multispektraler <sup>19</sup>F-MRT visualisiert.

#### 4.1.1 Charakterisierung mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS)

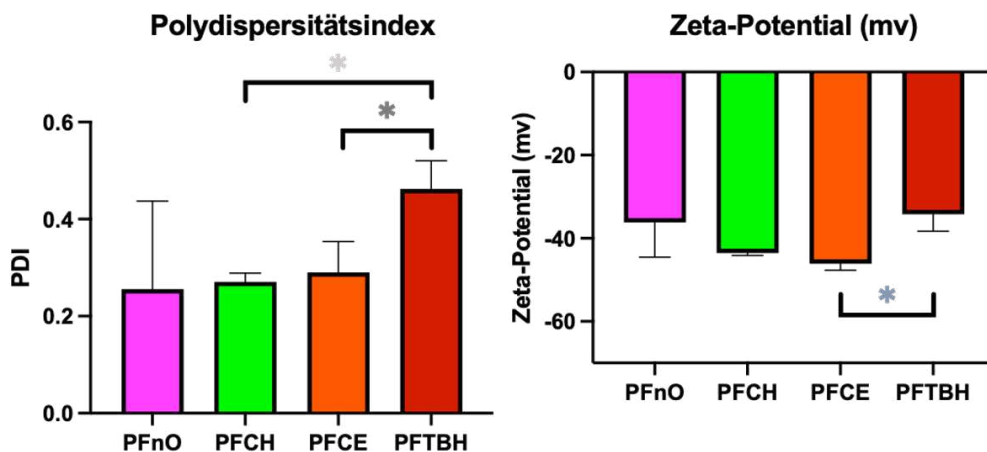
Die PFCs wurden unmittelbar nach der Herstellung mittels DLS analysiert. Hierbei wurden zur Qualitätskontrolle der PFCs drei Parameter bestimmt: Der hydrodynamische Durchmesser der Partikel, der Polydispersitätsindex (PDI) und das ζ-Potential, welche in Abbildung 4-1 grafisch dargestellt sind. Die Mittelwerte und die Standardabweichung der einzelnen Parameter wurden für alle PFCs anhand von n = 3 technischen Replikaten ermittelt. Die mittleren Partikelgrößen der PFCs lagen zwischen 100 nm und 160 nm: <sup>A425</sup>PFnO 136 nm ± 49 nm; <sup>A488</sup>PFCH 153 nm ± 19 nm, <sup>A647</sup>PFCE 106 nm ± 7 nm; <sup>A700</sup>PFTBH 141 nm ± 19 nm. Der Welch-ANOVA-Test ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den mittleren Partikelgrößen von <sup>A488</sup>PFCH und <sup>A647</sup>PFCE (siehe \* in Abb. 4-1 A). Die ermittelten PDIs (Abb. 4-2 B) von <sup>A425</sup>PFnO, <sup>A488</sup>PFCH und <sup>A647</sup>PFCE waren < 0.3. Der PDI von <sup>A700</sup>PFTBH lag bei > 0.4. Zwischen den mittleren PDIs von <sup>A647</sup>PFCE und <sup>A700</sup>PFTBH, sowie <sup>A488</sup>PFCH und <sup>A700</sup>PFTBH gab es nach statistischer Untersuchung mittels Welch-ANOVA-Test einen signifikanten Unterschied (siehe \* und

\* in Abb. 4-1 B). Das mittlere gemessene  $\zeta$ -Potential (Abb. 4-2 C) von  $A^{425}$ PFnO und  $A^{700}$ PFTBH lag zwischen -30 mV und -35 mV, wohingegen das mittlere  $\zeta$ -Potential von  $A^{488}$ PFCH sowie  $A^{647}$ PFCE zwischen -40 mV und -50 mV lag. Es ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen  $A^{647}$ PFCE und  $A^{700}$ PFTBH nach Untersuchung des mittleren  $\zeta$ -Potentials mittels Welch-ANOVA-Test (siehe \* in Abb. 4-1 A).

A



B

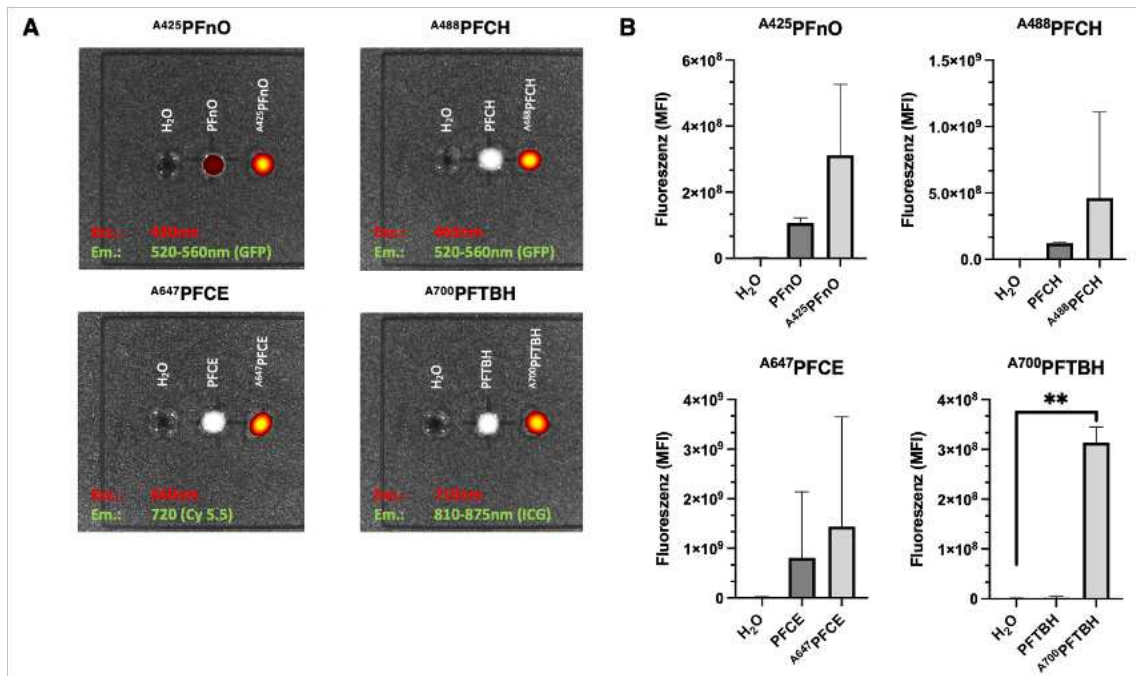


**Abbildung 4-1 – DLS-Messungen der PFCs:** **A)** Relative prozentuale Dichteverteilung der PFCs (y-Achse). Die X-Achse zeigt die Partikelgrößen von  $A^{425}$ PFnO,  $A^{488}$ PFCH,  $A^{647}$ PFCE und  $A^{700}$ PFTBH. Die Daten entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  SD von  $n = 3$  Messungen (technische Replikate). Die gestrichelte Linie markiert einen hydrodynamischen Durchmesser von 100 nm. **B)** Dargestellt sind die mittlere Polydispersität und die mittleren  $\zeta$ -Potentiale der PFCs. Die Daten entsprechen jeweils dem Mittelwert  $\pm$  SD von  $n = 3$  Messungen (technische Replikate). Die Werte aus A und B wurden mittels Welch-ANOVA-Test analysiert. \* =  $p < 0.05$ .

#### 4.1.2 Fluoreszenzeigenschaften der PFCs

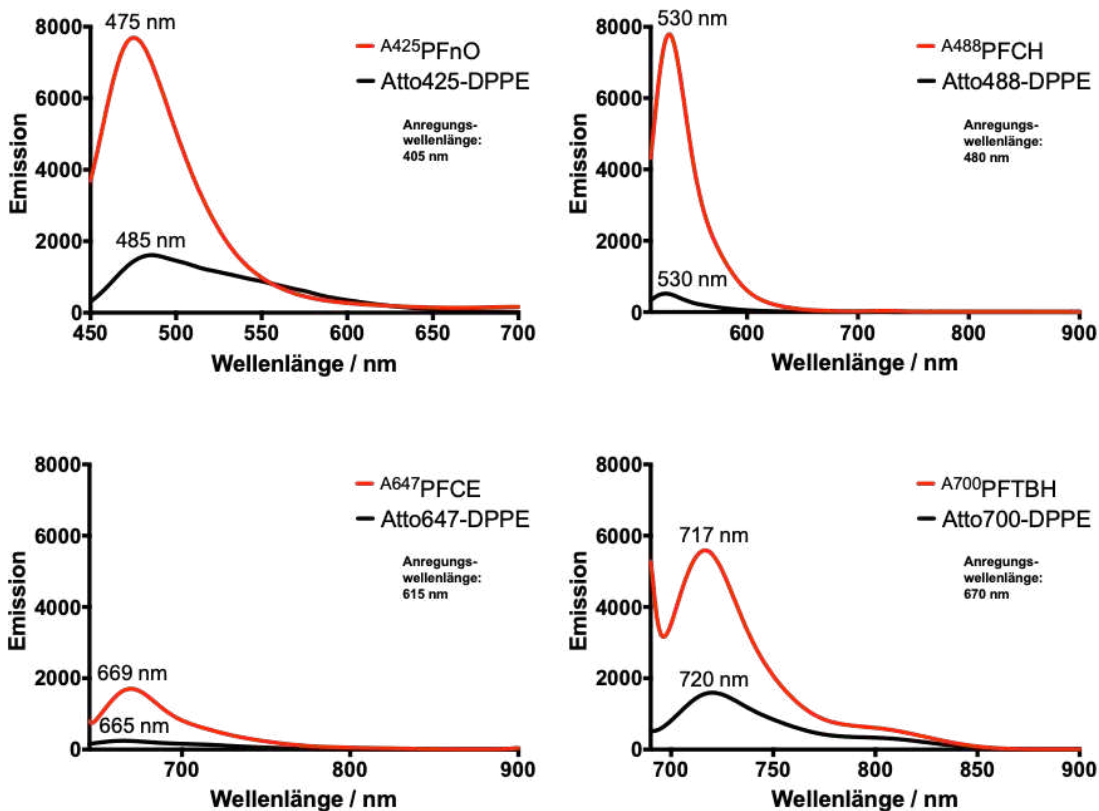
Neben der Größe, dem Polydispersitätsindex (PDI) und dem  $\zeta$ -Potential ist die Fluoreszenz der hergestellten PFCs für nachfolgende FACS-Analysen wichtig. Daher wurden die Fluoreszenzeigenschaften der hergestellten PFCs über IVIS® Lumina II Messungen und Fluoreszenzspektroskopie bestimmt. Die fluoreszenzspektroskopischen Messungen erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Tuba Güden-Silber (Institut für Molekulare Kardiologie) und M. Sc. Simone Hauer sowie Prof. Dr. Thomas J. J. Müller (Institut für Organische Chemie der Heinrich-Heine-Universität).

Um die Fluoreszenzstärke von  $A^{425}PFnO$ ,  $A^{488}PFCH$ ,  $A^{647}PFCE$ ,  $A^{700}PFTBH$  zu ermitteln, wurden die PFCs zusammen mit zwei Negativkontrollen mit verschiedenen Filterkombinationen im IVIS® Lumina II gemessen. Als Negativkontrollen wurden PFCs ohne Fluorochrom und eine  $H_2O$ -Probe verwendet. Die PFCs wurden jeweils durch ausgewählte Kombinationen von Anregungs- und Emissionsfiltern getestet, welche in Tabelle 3 im Methodenteil auf Seite 23 aufgelistet sind. In Abbildung 4-2 A ist die Überlagerung der Fluoreszenzsignale mit dem Foto der Proben dargestellt. Im Vergleich zu den unmarkierten PFCs und der Wasserkontrolle erkennt man in Abbildung 4-2 A, dass alle fluoreszenzmarkierten PFCs in Form einer rot-gelben Färbung deutliche Fluoreszenzsignale zeigen. Eine quantitative Auswertung der Fluoreszenzsignale ist in Abbildung 4-2 B dargestellt. Je nach Fluoreszenzfarbstoff lag die mittlere Fluoreszenzintensität der PFCs mit Fluorochrom zwischen  $5 \times 10^8 - 1 \times 10^9$  [relative Anzahl der Photonen  $\times nm^{-1}$ ]. Die mittlere Fluoreszenzintensität der PFCs ohne Fluorochrom lag zwischen  $0.1 \times 10^8 - 0.7 \times 10^9$  [relative Anzahl der Photonen  $\times nm^{-1}$ ] und die mittlere Fluoreszenzintensität der  $H_2O$ -Probe lag bei  $< 0.1 \times 10^8$  [relative Anzahl der Photonen  $\times nm^{-1}$ ]. Die Untersuchung mittels Welch-ANOVA-Test ergab einen hochsignifikanten Unterschied zwischen der mittleren Fluoreszenzintensität der  $A^{700}PFTBH$  und der  $H_2O$ -Probe.



**Abbildung 4-2 – iVIS-Fluoreszenzmessungen der PFCs:** **A)** Dargestellt ist die Überlagerung von Foto und Fluoreszenzsignal (gelb-roter Hotspot): H<sub>2</sub>O, PFC ohne Fluorochrom und PFC mit Fluorochrom. **B)** Quantitative Analyse der Fluoreszenzsignale von <sup>A425</sup>PFnO-PFCs (links-oben), <sup>A488</sup>PFCH (rechts-oben), <sup>A647</sup>PFCE (links-unten) und <sup>A700</sup>PFTBH (rechts-unten). Die Daten entsprechen jeweils dem Mittelwert ± SD von n = 3 Messungen (technische Replikate). Die Werte aus B wurden mittels Welch-ANOVA-Test analysiert. \*\* = p < 0.05.

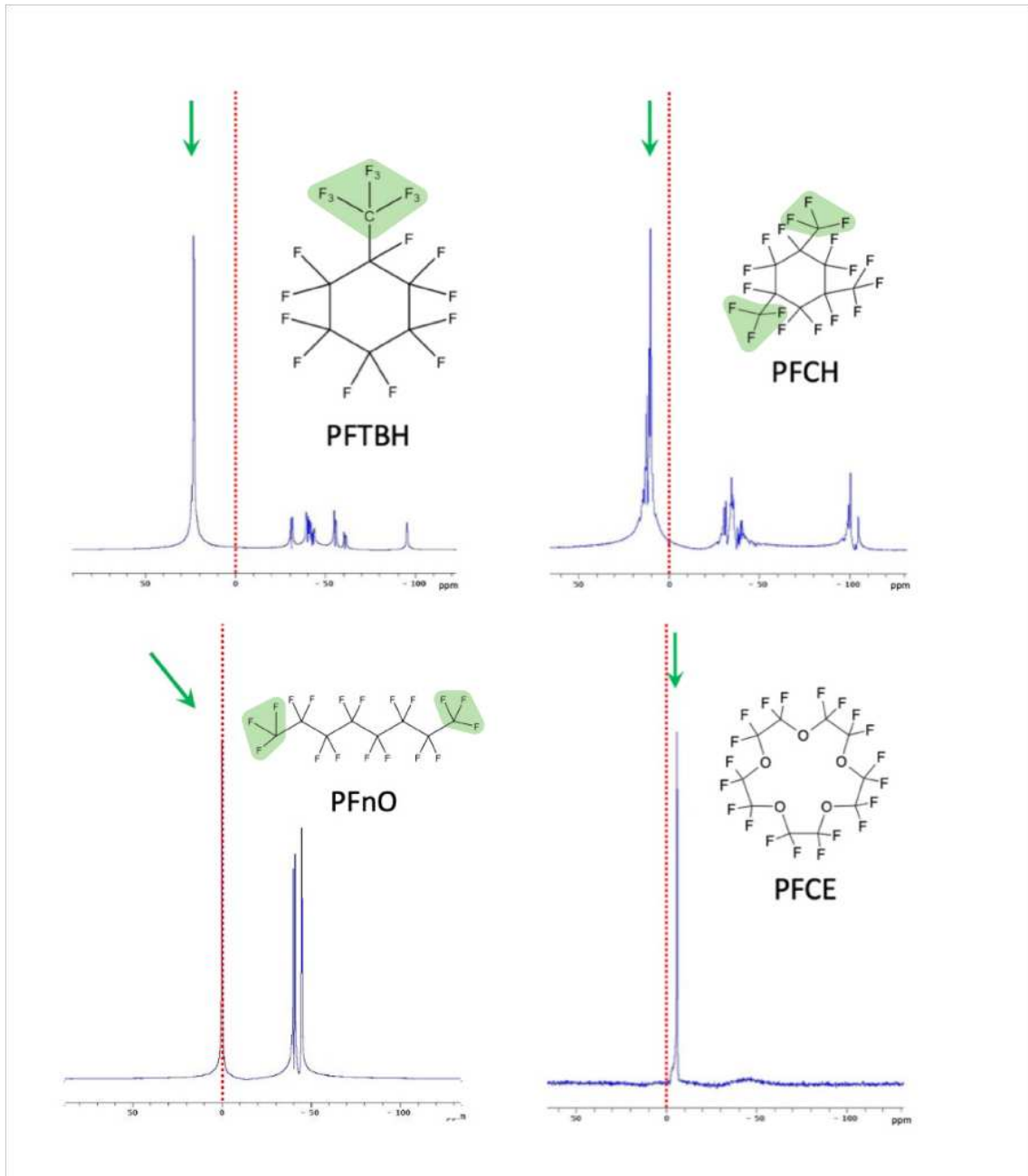
Um die Emissionsspektren der fluoreszenzmarkierten PFCs mit den jeweiligen fluoreszenzmarkierten Lipiden zu vergleichen und eventuelle durch den Herstellungsprozess der PFCs entstandene Abweichungen der Emissionsspektren zwischen PFCs und Farbstofflipid zu detektieren, wurden die Fluoreszenzemissionsspektren gemessen. Im Fluoreszenzspektrometer F-7000 (Hitachi® FL solutions) wurden dafür drei Proben untersucht: in H<sub>2</sub>O verdünnte PFCs, in H<sub>2</sub>O gelöste Lipide und reines Wasser, welches als Referenz diente. Es wurde zunächst ein Spektrum für die Referenz und anschließend ein Spektrum für die Lipid-Proben und PFC-Proben gemessen. Dabei ergaben sich für die Lipide Atto425-DPPE, Atto488-DPPE, Atto647-DPPE und Atto700-DPPE und die PFCs <sup>A425</sup>PFnO, <sup>A488</sup>PFCH, <sup>A647</sup>PFCE und <sup>A700</sup>PFTBH annähernd die gleichen Werte für die Emissionsmaxima: Die Emissionsspektren der PFCs sind zu den Emissionsspektren der fluoreszenzmarkierten Lipide um -3 nm bis +10 nm verschoben. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-3 dargestellt.



**Abbildung 4-3 – Fluoreszenzspektroskopie:** Dargestellt sind Fluoreszenzemissionsspektren von fluoreszenzmarkierten PFCs (rote Linie) sowie der fluoreszenzmarkierten Lipide (schwarze Linie); repräsentativ für  $n = 2$  Messungen. Die spektroskopischen Messungen wurden mit dem Fluoreszenzspektrometer Hitachi® F-7000 durchgeführt. Für die Untersuchung wurden die in reinem Wasser aufgenommen (siehe 3.3.2 Tabelle 4). Als Referenz diente reines Wasser. Die dargestellten Fluoreszenzemissionsspektren ergaben sich nach Anregung der Proben mit den herstellerseitig angegebenen Anregungswellenlängen (siehe Methodenteil 3.3.2 Tabelle 4).

#### 4.1.3 $^{19}\text{F}$ -MRT-Messungen von PFCs

Die PFCs wurden auch mittels  $^{19}\text{F}$ -MRT charakterisiert, um deren spektrale Eigenschaften zu untersuchen. Zuerst wurden orientierende  $^1\text{H}$ -Messungen zur Lokalisation der Proben durchgeführt und anschließend  $^{19}\text{F}$ -Singlepulse-NMR-Messungen durchgeführt. Die  $^{19}\text{F}$ -Spektren sind in Abbildung 4-4 dargestellt. Die chemischen Verschiebungen wurden in Referenz zur  $\text{CF}_3$ -Gruppe von PFnO (0 ppm, rote gestrichelte Linie) angegeben: PFTBH -22 ppm; PFCH -12,5 ppm; PFnO 0 ppm; PFCE +10 ppm. Die stärksten Signalspitzen der  $^{19}\text{F}$ -Spektren entsprechen bis auf PFCE den jeweiligen  $\text{CF}_3$ -Gruppen der PFCs.



**Abbildung 4-4 –  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektroskopie:** Dargestellt sind die die  $^{19}\text{F}$ -Spektren von  $^{A700}\text{PFTBH}$ ,  $^{A488}\text{PFCH}$ ,  $^{A425}\text{PFnO}$  und  $^{A647}\text{PFCE}$ , sowie die chemischen Strukturformeln. Als Referenz für die chemischen Verschiebungen diente jeweils die  $\text{CF}_3$ -Gruppe vom  $^{A425}\text{PFnO}$ , welche in dieser Grafik bei 0 ppm liegt (rote gestrichelte Linie). Der grüne Pfeil markiert jeweils die Spitzen der  $\text{CF}_3$ -Gruppe bei  $^{A700}\text{PFTBH}$  ( $\delta = -22$  ppm),  $\text{CF}_2$ -Gruppen bei  $^{A647}\text{PFCE}$  ( $\delta = +10$  ppm),  $\text{CF}_3$ -Gruppe bei  $^{A425}\text{PFnO}$  ( $\delta = 0$  ppm) und  $\text{CF}_3$ -Gruppe bei  $^{A488}\text{PFCH}$  ( $\delta = -12$  ppm). Die  $\text{CF}_3$ -Gruppen von  $^{A700}\text{PFTBH}$ ,  $^{A425}\text{PFnO}$  und  $^{A488}\text{PFCH}$  sind in der Abbildung grün unterlegt.

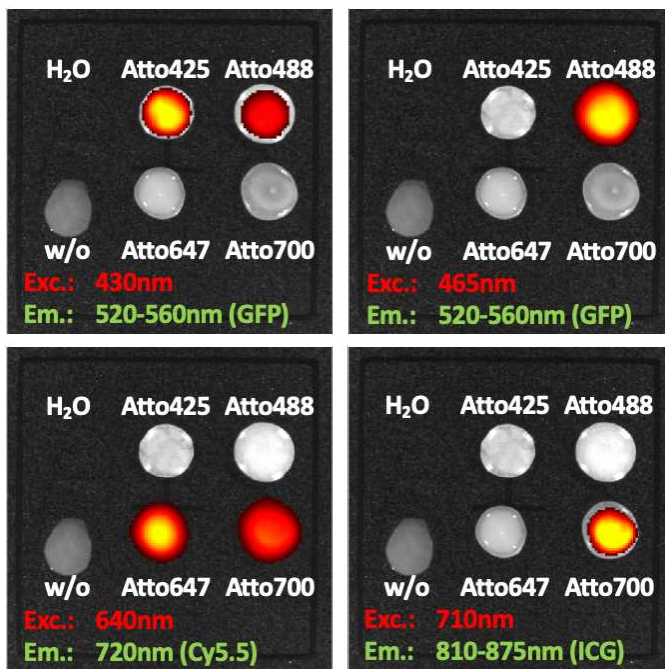
## 4.2 Kombinatorische Bildgebung der PFCs

Im nächsten Schritt wurden die hergestellten PFCs in Kombination mittels IVIS und  $^{19}\text{F}$ -MRT untersucht.

### 4.2.1 Simultane Fluoreszenzmessungen

Um zu untersuchen, ob die vier Fluoreszenzsignal der PFCs mittels IVIS in Kombination selektiv ohne spektrale Überlappung sichtbar gemacht werden können, wurden die

PFCs im IVIS® Lumina II untersucht. Von den PFC-Proben wurde jeweils ein Tröpfchen gemeinsam mit einer H<sub>2</sub>O-Probe und einer PFC-Probe ohne Fluorochrom auf einer Glasplatte platziert. In Abbildung 4-5 sind die fluoreszierenden PFCs bei verschiedenen Filterkombinationen als gelb-rote Hotspots zu erkennen. Bei den Messungen waren mit den geräteseitig einstellbaren Filterkombinationen nur <sup>A488</sup>PFCH und <sup>A700</sup>PFTBH ohne spektrale Überlagerung messbar. <sup>A425</sup>PFnO (siehe Abb. 4-5, oben links) und <sup>A647</sup>PFCE (siehe Abb. 4-5, unten links) ließen sich durch die verwendeten Filterkombinationen hingegen nicht selektiv darstellen, da die Anregung von weiteren PFCs erfolgt. Beim <sup>A488</sup>PFnO (siehe Abb. 4-5, oben rechts) ist zu sehen, dass es bei 465 nm, sowie im Randbereich des Anregungsspektrums bei 430 nm angeregt werden kann. <sup>A700</sup>PFTBH (siehe Abb. 4-5, unten rechts) kann im IVIS® Lumina II ebenfalls durch zwei verschiedene Wellenlängen angeregt werden (640 nm und 710 nm) und fluoresziert neben dem ICG-Kanal zusätzlich im Randbereich des Cy5.5-Kanals (siehe Abbildung 4-5).



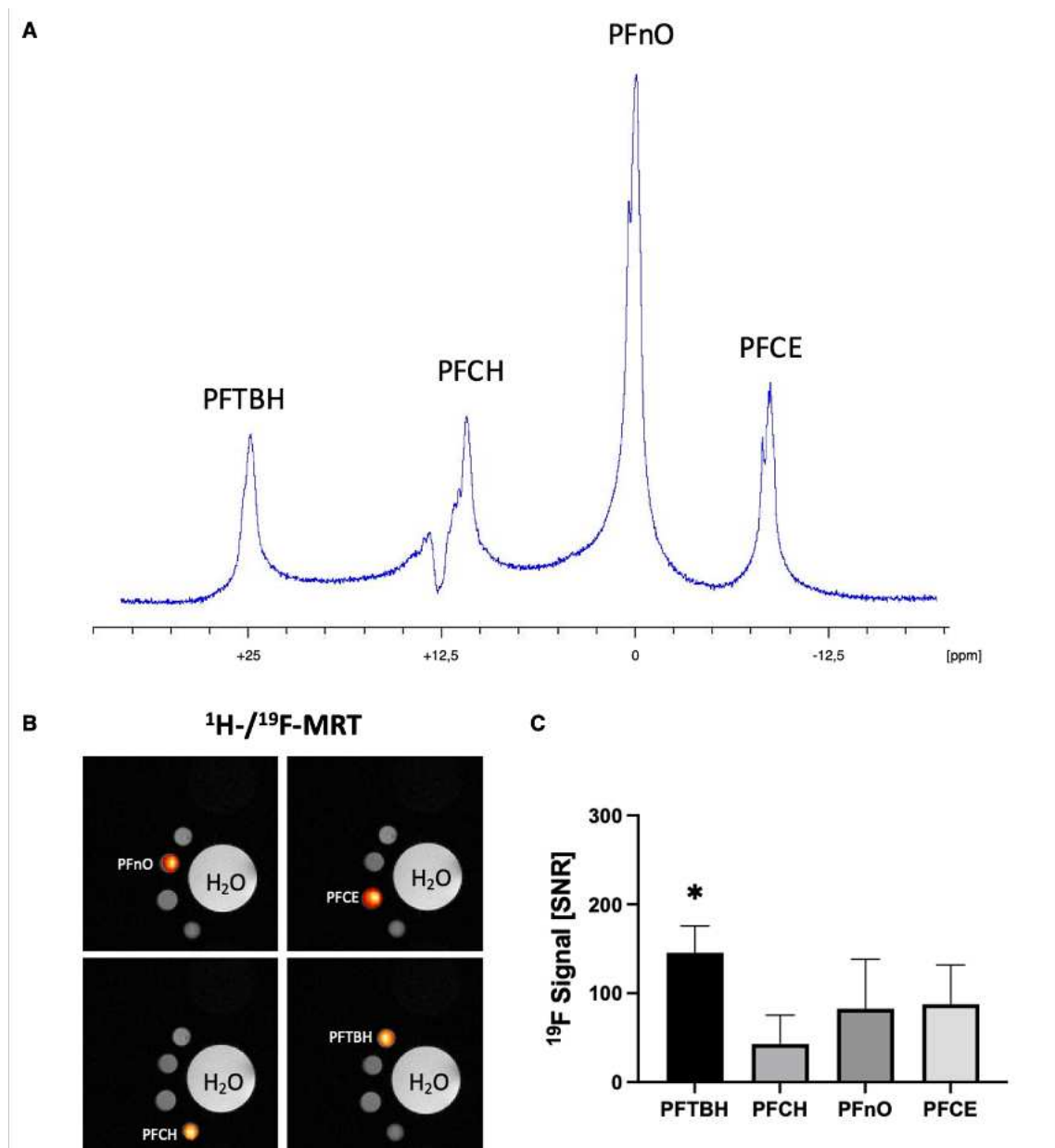
**Abbildung 4-5 – IVIS-Fluoreszenzmessungen:** Dargestellt ist die Überlagerung von Foto und Fluoreszenzsignal (hot iron) für vier verschiedene Anregungs- und Emissionsfilterkombinationen in der Simultanmessung der fluoreszenzmarkierten PFCs: <sup>A425</sup>PFnO, <sup>A488</sup>PFCH, <sup>A647</sup>PFCE, <sup>A700</sup>PFTBH (Exc. = Exzitation, Em. = Emission).

#### 4.2.2 Simultane <sup>19</sup>F-Messungen von PFCs

Um festzustellen, wie gut die PFCs anhand ihrer <sup>19</sup>F-Signale spektral getrennt werden können, wurde eine Mischung von <sup>A700</sup>PFTBH, <sup>A488</sup>PFCH, <sup>A425</sup>PFnO und <sup>A647</sup>PFCE mit der Singlepulse-<sup>19</sup>F-Methode untersucht. Hierbei wurde jedoch die spektrale Bandbreite reduziert, sodass vor allem die <sup>19</sup>F-Hauptsignale der PFCs dargestellt wurden. In Abbildung 4-6 A ist deutlich zu erkennen, dass diese Signalspitzen von <sup>A700</sup>PFTBH, <sup>A488</sup>PFCH, <sup>A425</sup>PFnO und <sup>A647</sup>PFCE alle aufgrund ihrer chemischen Verschiebungen unterschiedliche Resonanzfrequenzen aufweisen und sich spektral nicht überlappen. Anschließend wurde mit Hilfe der 2D-CSI-Methode eine <sup>19</sup>F-Messung und eine dazu korrespondierende <sup>1</sup>H-MRT-Aufnahme von <sup>A700</sup>PFTBH, <sup>A488</sup>PFCH, <sup>A425</sup>PFnO und <sup>A647</sup>PFCE durchgeführt. Mit Hilfe eines speziellen Programms (CSI-Tool) wurden die <sup>19</sup>F-



Signale quantifiziert, welches in Abbildung 4-6 B dargestellt ist. In Abbildung 4-6 C ist eine Überlagerung der  $^1\text{H}$ - und  $^{19}\text{F}$ -MRT-Aufnahmen dargestellt, welche mit dem CSI-Tool durchgeführt wurde.



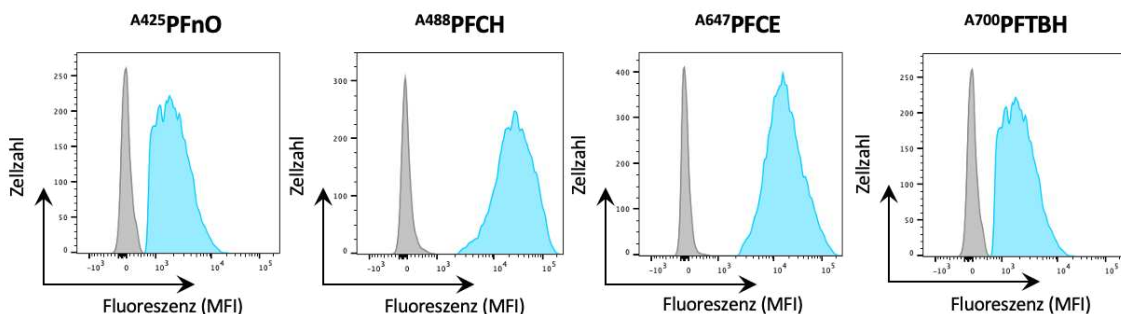
**Abbildung 4-6 –  $^{19}\text{F}$ -MRT-Untersuchungen von PFCs:** **A)**  $^{A700}\text{PFTBH}$ ,  $^{A488}\text{PFCH}$ ,  $^{A425}\text{PFnO}$  und  $^{A647}\text{PFCE}$  wurden gemeinsam in einem Reaktionsgefäß gemischt und anschließend mit Hilfe der Singlepulse-Methode  $^{19}\text{F}$ -Spektren der Hauptsignale der PFCs dargestellt. Die  $^{19}\text{F}$ -Signale stellen von links nach rechts betrachtet die charakteristischen chemischen Verschiebungen bezogen auf die  $\text{CF}_3$ -Gruppe des  $\text{PFnO}$  (0 ppm) dar. **B)** Dargestellt ist die Überlagerung von  $^1\text{H}$ - und  $^{19}\text{F}$ -2D-CSI-MRT-Aufnahmen (CSI = *Chemical Shift Imaging*) der PFCs. Die abgebildeten PFC-Proben wurden zirkulär um ein  $\text{H}_2\text{O}$ -gefülltes Gefäß angeordnet. Die PFC-Signale sind als Hotspots (hot iron) dargestellt. **C)** Es wurden die Hauptsignale der PFCs ausgewählt und daraus das  $^{19}\text{F}$ -Signal (SNR = Signal-Rausch Verhältnis) bestimmt. Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SD für  $n = 3$  Messungen. Die statistische Auswertung mittels Welch-ANOVA-Test und einem 95% Konfidenzintervall ergab, dass  $^{A700}\text{PFTBH}$  gegenüber  $^{A488}\text{PFCH}$ ,  $^{A425}\text{PFnO}$  und  $^{A647}\text{PFCE}$  ein signifikant höheres mittleres  $^{19}\text{F}$ -Signal aufweist (siehe \* in der Abbildung).

### 4.3 Zelluläre Aufnahme von PFCs

Über PFC-beladene immunkompetente Zellen können ortsspezifische Informationen, wie die Anzahl und die Verteilung der entsprechenden infiltrierenden Immunzellen innerhalb der entzündeten Bereiche gewonnen werden. Um zu untersuchen, ob die hergestellten PFCs auch von phagozytischen Zellen aufgenommen werden, wurde die passive zelluläre Aufnahme der PFCs anhand der murinen Makrophagen-Zelllinie J774A.1 mittels Durchflusszytometrie und  $^{19}\text{F}$ -MRT untersucht.

#### 4.3.1 Durchflusszytometrische Analyse der PFC-Aufnahme

Im ersten Schritt wurden J774A.1-Zellen über 40 Minuten mit PFCs inkubiert und das Fluoreszenzsignal mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der jeweiligen Fluoreszenzkanäle ( $A^{425}\text{PFnO}$  im Pacific-Blue-Kanal,  $A^{488}\text{PFCH}$  im FITC-Kanal,  $A^{647}\text{PFCE}$  im APC-Kanal,  $A^{700}\text{PFTBH}$  im APC-Cy7-Kanal) sind in Abbildung 4-7 dargestellt. Zu erkennen ist ein deutliches Fluoreszenzsignal nach 40 Minuten Inkubationszeit bei den Zellen mit PFCs (blau) im Vergleich zu Zellen, die nicht mit PFCs inkubiert wurden (grau).

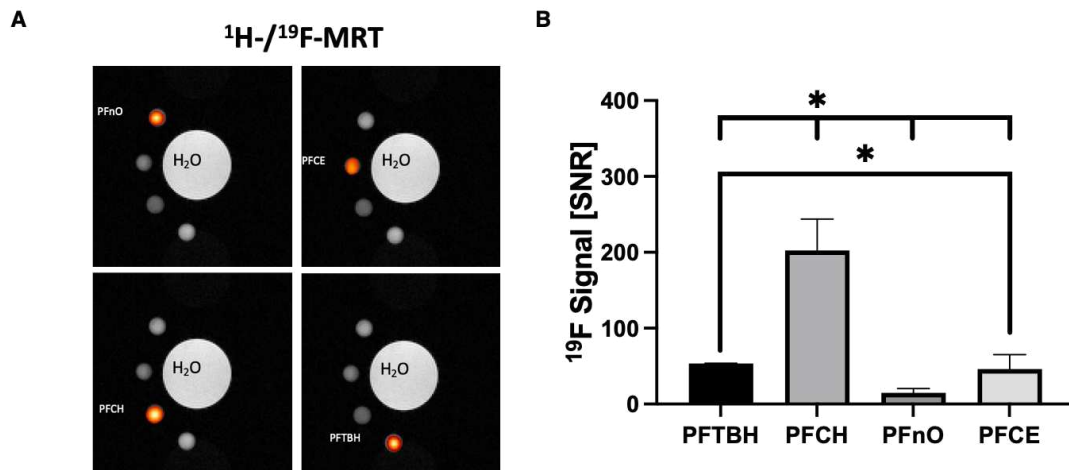


**Abbildung 4-7 – Zelluläre Aufnahme von PFCs durch murine Makrophagen (J774A.1):** Dargestellt ist die durchflusszytometrische Analyse von J774A.1-Makrophagen, die nicht mit PFCs inkubiert wurden (grau) und nach 40-minütiger Inkubation mit PFCs (blau). Die x-Achse entspricht der Fluoreszenzintensität der Zellen und die y-Achse der Anzahl der Zellen.

#### 4.3.2 Bestimmung der PFC-Aufnahme mittels $^{19}\text{F}$ -MRT

Da PFCs von phagozytischen Immunzellen im Blut aufgenommen werden können, wurde die zelluläre Aufnahme auch anhand von J774A.1-Makrophagen mittels  $^{19}\text{F}$ -MRT in vitro untersucht. Nach Inkubation der Zellen mit  $A^{425}\text{PFnO}$ ,  $A^{488}\text{PFCH}$ ,  $A^{647}\text{PFCE}$  und  $A^{700}\text{PFTBH}$  über Nacht wurden die Zellen intensiv gewaschen, um freie PFCs zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in Paraformaldehyd fixiert, sowie durch Zentrifugation pelletiert und im Messkopf platziert. Zunächst wurden orientierende  $^1\text{H}$ -MRT-Messungen angefertigt. Anschließend wurde eine  $^{19}\text{F}$ -2D-CSI-MRT-Messung der PFCs durchgeführt. Die Rekonstruktion der  $^{19}\text{F}$ -MRT-Datensätze, sowie die Überlagerung der  $^{19}\text{F}$ -Signale mit den  $^1\text{H}$ -Datensätzen für die jeweiligen PFCs ist in Abbildung 4-8 A dargestellt. Die Ergebnisse der quantitativen Auswertung der  $^{19}\text{F}$ -Signale (SNR) sind in Abbildung 4-8 B aufgeführt. Für die jeweiligen PFCs ergaben sich folgende  $^{19}\text{F}$ -Signalstärken (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung): PFTBH  $53.5 \pm 0.2$ ;

PFCH  $202.3 \pm 41.3$ ; PFnO  $14.5 \pm 5.6$ ; PFCE  $46.1 \pm 19.0$ . Dabei zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen  $A^{647}$ PFCE und  $A^{700}$ PFTBH sowie von  $A^{488}$ PFCH gegenüber  $A^{700}$ PFTBH,  $A^{425}$ PFnO und  $A^{647}$ PFCE (siehe \* in Abbildung 4-10 B).



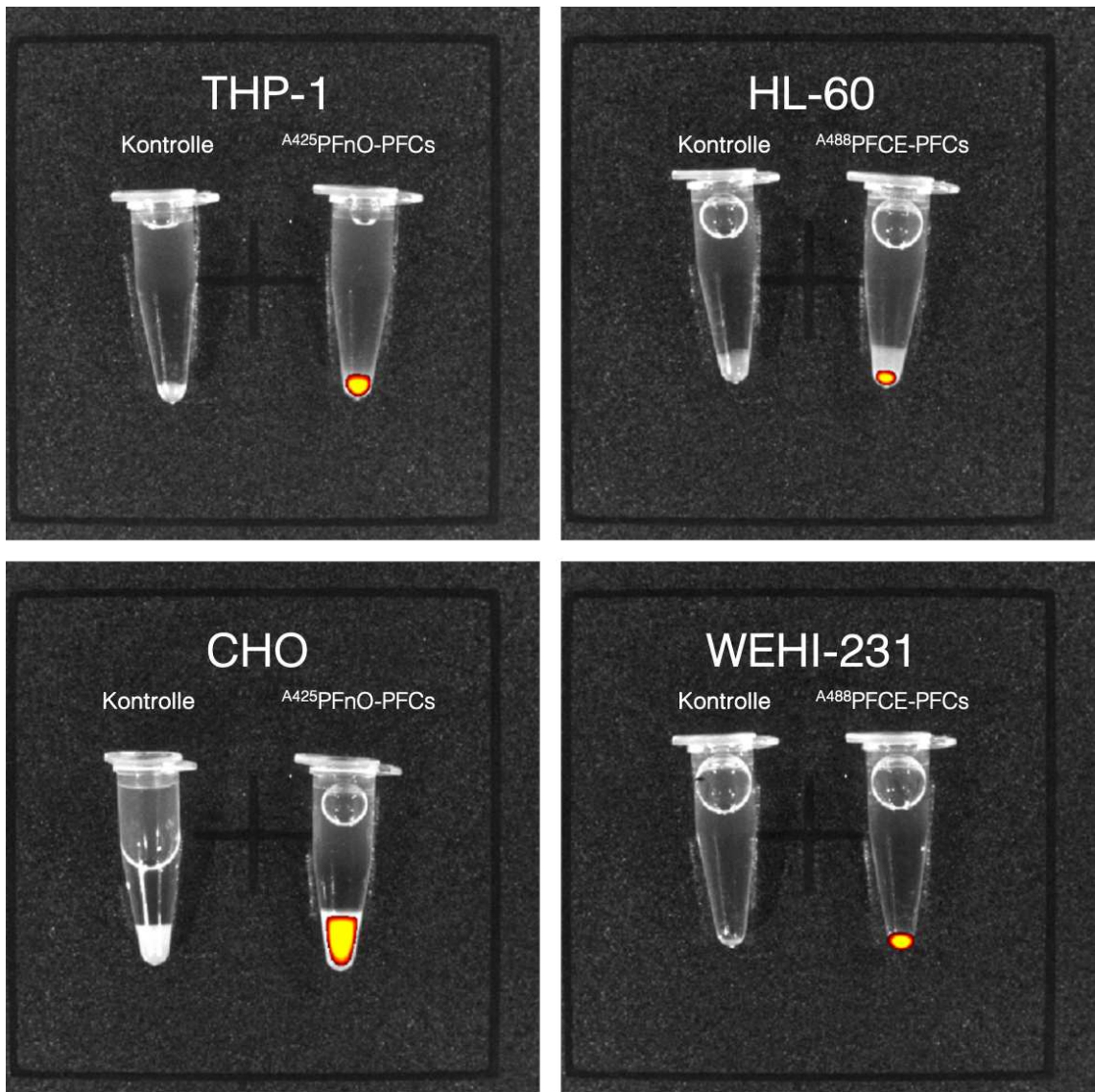
**Abbildung 4-8 – Darstellung der zellulären Aufnahme von PFCs mittels <sup>19</sup>F-MRT:** **A)** J774A.1-Makrophagen wurden mit PFCs inkubiert, gewaschen, mit PFA fixiert und das <sup>19</sup>F-Signal mittels <sup>19</sup>F-2D-CSI-MRT analysiert. Gezeigt ist eine Überlagerung der <sup>1</sup>H-/<sup>19</sup>F-MRT Datensätze. Die <sup>19</sup>F-Signale sind in der Überlagerung als gelb-rote Bereiche (hot iron) hervorgehoben. **B)** Quantifizierung des <sup>19</sup>F-Signals (SNR = Signal-Rausch Verhältnis). Die Daten entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  SD von  $n = 3$  unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung mittels Welch-ANOVA-Test und 95% Konfidenzintervall ergab, dass  $A^{488}$ PFCH gegenüber  $A^{700}$ PFTBH,  $A^{425}$ PFnO und  $A^{647}$ PFCE ein signifikant höheres mittleres <sup>19</sup>F-Signal aufweist. Weiterhin zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen  $A^{647}$ PFCE und  $A^{700}$ PFTBH. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch \* in der Abbildung hervorgehoben.

## 4.4 Darstellung verschiedener Immunzellsubtypen

Um festzustellen, ob vier verschiedene Immunzelltypen simultan mittels PFCs markiert und mittels <sup>1</sup>H-/<sup>19</sup>F-MRT und fluoreszenzbasiert unterschieden werden können, wurden vier immunologisch relevante Zelllinien durch Inkubation mit PFCs mittels IVIS und <sup>19</sup>F-MRT untersucht (siehe Methodenteil Tabelle 6). Dazu wurden THP-1 (Monozyten-ähnliche Zelllinie) mit  $A^{425}$ PFnO-PFCs; HL-60 (Neutrophilen-ähnliche Zelllinie) mit  $A^{488}$ PFCH-PFCs; CHO (Epithelzelllinie aus dem Ovar des chinesischen Zwerghamsters) mit  $A^{647}$ PFCE-PFCs; und WEHI-231 (murine B-Zelllinie) mit  $A^{700}$ PFTBH-PFCs inkubiert.

### 4.4.1 IVIS-Untersuchung

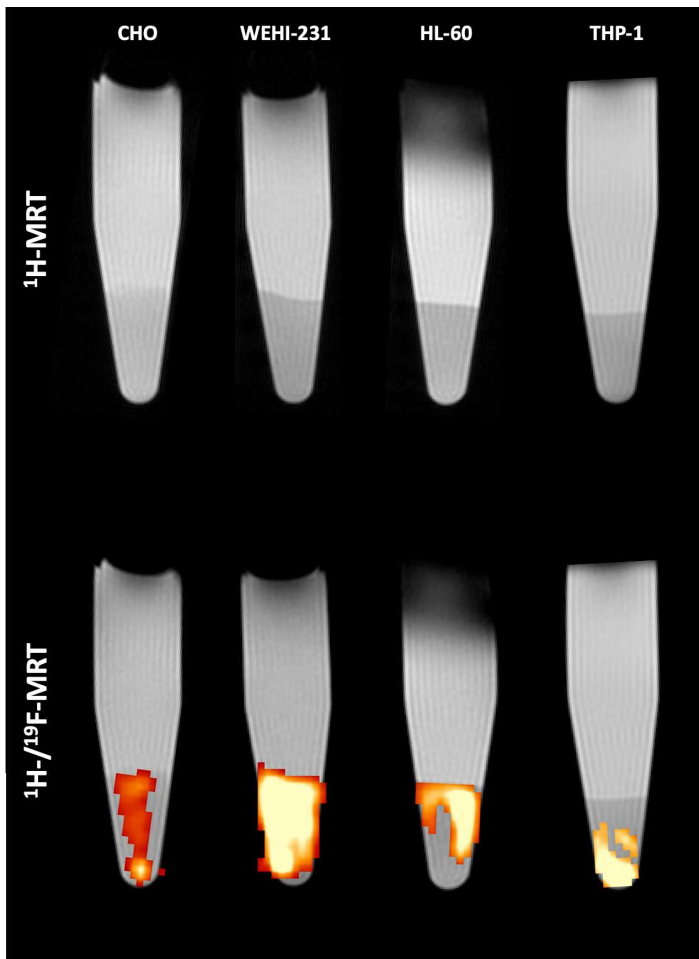
Um die PFC-Aufnahme durch die Zellen (s. o.) zu untersuchen, wurden die Zellen über zwei Stunden mit den PFCs inkubiert und das Fluoreszenzsignal mittels IVIS in verschiedenen Fluoreszenzkanälen untersucht. Die Ergebnisse der IVIS-Untersuchung der Proben sind in Abbildung 4-9 dargestellt. Die Teilabbildungen sind von links oben beginnend bis rechts unten sequenziell angeordnet. Die Proben wurden dabei jeweils durch unterschiedliche Filterkombinationen (Anregungswellenlänge / Emissionskanal) angeregt: (1) 430 nm / GFP, (2) 465 nm / GFP, (3) 640 nm / 720 nm, (4) 710 nm / ICG. Zu erkennen ist ein deutliches Fluoreszenzsignal nach zweistündiger Inkubationszeit bei der Probe mit den Zellen, welche PFCs enthalten (siehe Abb. rechte Probe). Als Kontrolle diente eine Probe mit unmarkierten Zellen (siehe Abb. linke Probe).



**Abbildung 4-9 – IVIS-Fluoreszenzmessungen zur Visualisation der zellulären PFC-Aufnahme:** Dargestellt sind IVIS-Fluoreszenzmessungen von THP-1-Zellen, HL-60-Zellen, CHO-Zellen und WEHI-231-Zellen nach zweistündiger Inkubation mit  $A^{425}PFnO$ ,  $A^{488}PFCH$ ,  $A^{647}PFCE$  und  $A^{700}PFTBH$  nach der in Tabelle 6 angegebenen Kombination (links oben – rechts unten). Es wurden jeweils Foto und Fluoreszenzsignal (hot iron) überlagert. Die Anregung erfolgte jeweils mit verschiedenen Anregungs- und Emissionsfilterkombinationen: 430 nm / GFP, 465 nm / GFP, 640 nm / 720 nm, 710 nm / ICG. Links im jeweiligen Bild ist die unmarkierte Probe dargestellt, welche als Kontrolle diente und nur die entsprechenden Zellen ohne PFCs enthält. Rechts in dem entsprechenden Bild sind die Zellen nach PFC-Aufnahme dargestellt.

#### 4.4.2 Multispektrale $^{19}\text{F}$ -MRT

Die Zellen wurden wiederum für zwei Stunden mit PFCs inkubiert und anschließend mit MACS-Puffer gewaschen und pelletiert. Die nachfolgend aufgeführte Methode der Aufreinigung und Zellseparation mittels Ficoll wurde bereits von Straub et. al. angewandt [96]. Um die freien (ungebundenen) PFCs zu entfernen, wurde das Zellpellet auf einen Ficoll-Gradienten gegeben und über 30 min bei 400 RPM zentrifugiert. Die Zentrifugation erfolgte bei 4 °C, um die Reaktion abzustoppen. Nach Entnahme der Zellen aus dem Gradienten erfolgte die Fixierung der Zellproben mit Paraformaldehyd. Anschließend wurden die fixierten Zellen mit MACS-Puffer gewaschen, bevor die Proben im Messkopf platziert wurden. Es folgte eine simultane  $^{19}\text{F}$ -Aufnahme aller markierten Zellen (siehe Methodenteil 3.3.6). Die Ergebnisse der Messung und die quantitative Analyse sind in Abbildung 4-10 dargestellt. Im unteren Teil der Abbildung erkennt man ein deutliches  $^{19}\text{F}$ -Signal der PFC-haltigen Zellen (gelb-rot) im Vergleich zu den unmarkierten Zellen (siehe oberer Teil der Abbildung).



**Abbildung 4-10 – Darstellung der zellulären Aufnahme von PFCs durch verschiedene Immunzellen mittels Multispektraler  $^{19}\text{F}$ -MRT:** THP-1-, HL-60-, CHO- und WEHI-231-Zellen wurden paarweise über zwei Stunden mit  $^{A425}\text{PFnO}$ -PFCs,  $^{A488}\text{PFCH}$ -PFCs,  $^{A647}\text{PFCE}$ -PFCs und  $^{A700}\text{PFTBH}$ -PFCs inkubiert, gewaschen, mit PFA fixiert und das  $^{19}\text{F}$ -Signal mittels  $^{19}\text{F}$ -2D-CSI-MRT analysiert. Abgebildet ist eine Überlagerung der  $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT Datensätze, wobei die  $^{19}\text{F}$ -Signal der PFC-haltigen Zellen in der Überlagerung als gelb-rote Bereiche (hot iron) dargestellt sind.

## 5 DISKUSSION

Im Jahre 2005 hat Ahrens et al. die In-vivo-Bildgebung immuntherapeutischer Zellen mittels  $^{19}\text{F}$ -MRT-Bildgebung veröffentlicht [50]. Hierbei wurden PFCs eingesetzt, um dendritische Zellen *ex vivo* zu markieren und deren Wanderungsbewegungen zu verfolgen. Mittels Überlagerung von anatomischer  $^1\text{H}$ -MRT und  $^{19}\text{F}$ -MRT konnten diese Zellen räumlich lokalisiert werden [126]. Einige Jahre später konnte dann Flögel et al. erstmals die PFC-Aufnahme durch Monozyten und Makrophagen nach intravenöser Injektion und die Anreicherung in entzündetem Gewebe mittels  $^{19}\text{F}$ -MRT zeigen [104].

In der Zwischenzeit gibt es eine große Anzahl an Veröffentlichungen, in welchen die Darstellung von unterschiedlichsten entzündlichen Prozessen mittels  $^{19}\text{F}$ -MRT gezeigt wird [67, 104, 106, 127-131]. In den meisten Veröffentlichungen zur  $^{19}\text{F}$ -MRT wurden bisher aber zumeist nur eine Zellpopulation mittels  $^{19}\text{F}$ -MRT dargestellt. Jedoch wurde in einigen wenigen Studien PFCs mit unterschiedlichen  $^{19}\text{F}$ -Spektren verwendet, um maximal zwei Zellpopulationen zu markieren [65, 84].

Da Perfluorkarbone eine vielfältige Substanzklasse sind, weisen einige von ihnen individuelle spektrale Signaturen auf, die es prinzipiell ermöglichen vier oder fünf unterschiedliche Zelltypen zu markieren. Das Ziel dieser Arbeit war zum einen die Herstellung von vier spektral unterscheidbaren PFCs und zum anderen diese dazu zu verwenden, um verschiedene immunologisch relevante Zellsubpopulationen mittels Multispektraler  $^{19}\text{F}$ -MRT darzustellen.

Es wurden im Rahmen dieser Arbeit  $^{A425}\text{PFnO-}$ ,  $^{A488}\text{PFCH-}$ ,  $^{A647}\text{PFCE-}$ , und  $^{A700}\text{PFTBH-}$  PFCs hergestellt. Diese PFCs wurden mittels dynamischer Lichtstreuung und Messung der Fluoreszenzsignale sowie  $^{19}\text{F}$ -MRT charakterisiert. Die Perfluorkarbone PFnO (Perfluor-n-octan), PFCH (Perfluor-1,3,5-Trimethylcyclohexan), PFCE (Perfluor-15-kronenether) und PFTBH (Perfluor-tert-butylcyclohexan), wurden mit Phospholipiden emulgiert und mittels Hochdruck-Homogenisation prozessiert, wodurch PFC-Nanoemulsionen hergestellt wurden. PFnO-PFCs, PFCH-PFCs und PFTBH-PFCs wurden im Herstellungsprozess zusätzlich ein ein semifluoriertes Alkan als Di-Block hinzugefügt, um die PFC-Nanopartikel zu stabilisieren. Die Charakterisierung der PFCs ergab, dass die Partikelgrößen der PFCs zwischen 100 nm und 160 nm lagen. Die gemessenen PDIs waren  $< 0.3$  für drei der PFCs, lediglich für PFTBH lag der PDI zwischen 0.4 und 0.5. Das  $\zeta$ -Potenzial der PFCs lag zwischen -30 mV und -50 mV. Um festzustellen, ob die PFCs aufgenommen werden, wurden J774A.1-Makrophagen aus der Zellkultur mittels  $^{19}\text{F}$ -MRT, IVIS und Durchflusszytometrie untersucht. Es wurde die Aufnahme der PFCs durch die Zellen durch diese Methoden bestätigt.

Abschließend wurde die passive zelluläre Aufnahme der PFCs durch vier weitere immunologisch relevante Zellpopulationen untersucht. Es wurden eine eine humane Monozyten-ähnliche Zelllinie (THP-1), eine Epithelzelllinie (CHO), eine murine B-Zelllinie (WEHI-231) und Neutrophilen-ähnliche Zellen (HL-60) ausgewählt. Die ausgewählten



Zelllinien wurden spektral unterscheidbaren PFCs markiert und die PFC-Aufnahme mittels multispektraler <sup>19</sup>F-MRT und IVIS untersucht. Hierbei zeigte sich, dass sich diese vier Zellarten separat darstellen ließen und im Gegensatz zu den unmarkierten Zellen ein Signal bei den PFC-markierten Zellen messbar war.

## 5.1 Herstellung und Charakterisierung von PFCs

Perfluorkarbone sind eine vielfältige Substanzklasse, die aus Kohlenstoffketten bestehen, deren <sup>1</sup>H-Gruppen vollständig durch Fluoratome substituiert sind. Aus dieser Substanzklasse wurden in dieser Arbeit die Perfluorkarbone PFnO (Perfluor-n-octan), PFCH (Perfluor-1,3,5-Trimethylcyclohexan), PFCE (Perfluor-15-kronen-5-ether) und PFTBH (Perfluor tert-butylcyclohexan) zur Herstellung von sog. Perfluorkarbon-Nanoemulsionen verwendet. Dazu wurden ein sogenannter Di-Block (1-(Perfluor-n-hexyl)decan) als Emulgator der Perfluorkarbone und der Lipidschicht bei PFnO, PFCH und PFTBH hinzugefügt und Fluoreszenz-markierte Lipide (ATTO 425 /488 /647 / 700 markiertes DPPE) im Herstellungsprozess in die Nanopartikel integriert.

Die Charakterisierung der für diese Arbeit hergestellten PFCs <sup>A425</sup>PFnO, <sup>A488</sup>PFCH, <sup>A647</sup>PFCE und <sup>A700</sup>PFTBH durch die dynamische Lichtstreuung ergab, dass die mittleren Partikelgrößen der PFCs zwischen 100 nm und 160 nm lagen. Für PFCs wird laut Patel et al. ein Partikeldurchmesser von < 200 nm und ein PDI (Polydispersitätsindex) von < 0.2 als optimal angesehen [79, 132]. Der PDI ist ein Maß für die Dichteverteilung der hydrodynamischen Durchmesser innerhalb der PFC-Nanoemulsionen. Ein geringer PDI spricht für eine annähernd monodisperse Emulsion. Die PDIs von drei PFCs (<sup>A425</sup>PFnO, <sup>A488</sup>PFCH und <sup>A647</sup>PFCE) waren < 0.3 und der PDI von <sup>A700</sup>PFTBH lag bei > 0.4, welches für Polydispersität spricht. Mayenfels et al. zeigten 2012, dass eine Erhöhung der Homogenisier-Zyklen nicht zu einer signifikanten Reduktion der PDI und der Partikelgrößen führt. Möglicherweise lasse sich jedoch durch Veränderungen der Emulgator-Konzentration ein geringerer PDI erzielen [79]. Für pharmazeutische Anwendungen von Nanoemulsionen wird ein PDI von < 0.3 als optimal angesehen [133, 134].

Eine breite Größenverteilung von Partikeln nach der PFC-Herstellung, wie sie bei den Messergebnissen festzustellen war, kann auf verschiedene Faktoren zurückzuführen sein, die während des Herstellungsprozesses auftreten. Da Nanoemulsionen disperse Systeme aus kleinen Öltröpfchen sind, die sich in einer wässrigen Phase verteilen, spielen die Größe der Tröpfchen eine entscheidende Rolle für ihre Stabilität und Anwendbarkeit. So kann eine unzureichende Emulgierung, Anwendungsfehler oder Schwankungen bei den Prozessparametern dazu führen, dass Partikel mit unterschiedlichen Größen erzeugt werden. Da die Lagerstabilität für die potentielle klinische Anwendung von PFCs eine Rolle spielt, sollten zwei Phänomene berücksichtigt werden, die für die Destabilisierung von PFCs im Laufe der Zeit ausschlaggebend sind: Die Koaleszenz (Verschmelzung der Teilchen) und die Ostwald-Reifung [135-138]. Beim

Prozess der Ostwald-Reifung lösen sich die kleineren Tröpfchen zugunsten der größeren Partikel schneller auf, da sie eine höhere Oberflächenspannung besitzen. Um eine schmalere Größenverteilung in Nanoemulsionen zu erreichen, sollte der Herstellungsprozess in Zukunft optimiert werden. Eine Auswahl und Konzentration von (Co-)Emulgatoren mit veränderter Lipo- und Fluorophilie kann besser geeignet sein, um eine verbesserte Stabilität zu erreichen. Auch können in zukünftigen Untersuchungen die Temperatur, der Prozessparameter wie der Druck, die Anzahl der Homogenisier-Zyklen die Mischgeschwindigkeit und -dauer sowie das Mischverhältnis der Emulsionen variiert werden, um eine schmale Größenverteilung zu erreichen.

Das  $\zeta$ -Potential der PFC-Nanoemulsionen entspricht ihrer Oberflächenladung. Stark negative geladene Nanopartikel-Tröpfchen tendieren dazu, sich voneinander abzustößeln, was die Stabilität der Dispersion erhöht [139]. Partikel mit positiverem oder null  $\zeta$ -Potential tendieren eher zur Verschmelzung, da die elektrostatische Abstoßung der Teilchen untereinander abnimmt [140]. Ein gleichbleibendes  $\zeta$ -Potential im zeitlichen Verlauf wird daher auch als Qualitätsmerkmal einer Nanoemulsion betrachtet [141, 142]. Das gemessene  $\zeta$ -Potential der für diese Arbeit hergestellten PFCs lag zwischen -30 mV und -50 mV, was laut Studien zur Stabilität der PFCs beiträgt [143-145]. Für nicht funktionalisierte PFCs wurde in der Arbeit von Mayenfels et al. ein  $\zeta$ -Potential von -35 mV und -45 mV angegeben [79]. Der wichtigste Faktor, der das  $\zeta$ -Potential beeinflusst, ist der pH-Wert des Mediums [146]. Dieser lag jedoch für alle untersuchten PFCs bei 7,00, da Reinstwasser verwendet wurde. Zu beachten ist jedoch, dass das  $\zeta$ -Potential innerhalb einer Emulsion variieren kann [147] und mit der Größenverteilung der PFC-Nanoemulsionen und den Hüllenbestandteilen der Partikel zusammenhängt. Die Ladungsdynamik der einzelnen Partikel wird durch die zugesetzten Lipide Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin bestimmt, welche in Lipoid® E 80 SN und DPPE enthalten sind. Durch ihre polaren Gruppen können sie die Oberfläche der Partikel stabilisieren, jedoch enthalten beide eine unterschiedliche Kopfstruktur. So hat Phosphatidylethanolamin eine geringfügig negativere Ladung als Phosphatidylcholin, welche somit die Gesamtladung der einzelnen Partikel beeinflusst. Es besteht die Möglichkeit, dass sich ein verändertes Mengenverhältnis der Lipide auf das  $\zeta$ -Potential und die Stabilität der Emulsion auswirken. Eine breite Größenverteilung, die für sowohl kleine als auch große Partikel einer Emulsion spricht, führt somit auch zu Ladungsunterschieden und einer größeren Variation des  $\zeta$ -Potenzials. Eine schmale Größenverteilung hat hingegen zu Folge, dass die Größe der Partikel und damit die Oberflächenladung der einzelnen Partikel, vergleichsweise ähnlich ist.

Wie bereits oben erwähnt ist der PDI ein Maß für die Größenverteilung der Partikel innerhalb einer Emulsion. Ein hoher PDI entspricht einer polydispersen Verteilung, wohingegen ein geringer PDI-Wert ein Indikator für Monodispersität einer Emulsion ist. In einer polydispersen Emulsion existieren sowohl große als auch kleine Partikel, die koaleszieren können [138, 148, 149]. Die Aggregation von Teilchen kann wiederum das  $\zeta$ -Potential verringern, da die elektrostatische Abstoßung dadurch abnimmt und sich die



Partikel einander annähern. Außerdem haben kleinere Partikel eine eher größere spezifische Oberfläche pro Volumeneinheit innerhalb einer Emulsion, was zu einer höheren Ladungsdichte und damit zu einem negativeren  $\zeta$ -Potenzial führen kann. In den Ergebnissen der DLS-Messungen war vergleichsweise festzustellen, dass <sup>A700</sup>PFTBH-PFCs mit > 0.4 den größten PDI aufweist und den positivsten Wert (-35mV) für das  $\zeta$ -Potenzial besaß (siehe Ergebnisteil Abb. 4-1). Für <sup>A425</sup>PFnO-PFCs, <sup>A488</sup>PFCH-PFCs, <sup>A647</sup>PFCE-PFCs lässt sich aus den ermittelten Werten jedoch kein solcher Zusammenhang feststellen. Vielmehr deutet die Streuung der Werte daraufhin, dass weitergehende Untersuchungen zum Herstellungsprozess stattfinden sollten.

Interessanterweise ergab die Charakterisierung der für diese Arbeit hergestellten <sup>A425</sup>PFnO-PFCs, <sup>A488</sup>PFCH-PFCs, <sup>A647</sup>PFCE-PFCs und <sup>A700</sup>PFTBH-PFCs mittels der <sup>19</sup>F-MRT-2D-CSI-Methode unterschiedliche Signalstärken für die einzelnen PFCs. Das stärkste <sup>19</sup>F-Signal wurde bei den Einzelmessungen der PFCs ohne zelluläre Aufnahme bei <sup>A700</sup>PFTBH mit einem mittleren SNR-Wert von annähernd 150 gemessen. Bei PFNO und PFCE lag der Wert bei annähernd 100 und bei PFCH bei annähernd 50. Für diese Arbeit wurden PFCs mit einem Perfluorkarbon-Reinsubstanz-Anteil von 20% hergestellt. Studien geben an, dass die gemessene <sup>19</sup>F-Signalstärke mit der Anzahl der am Haupt-<sup>19</sup>F-Signal beteiligten ortsständigen <sup>19</sup>F-Atome korreliert [83, 150]. PFCE (Perfluorkronen-5-Ether) ist ein zyklischer Ether, der 10 CF<sub>2</sub>-Gruppen enthält und vollständig fluoriert ist. Alle 20 enthaltenen Fluoratome der PFCE-Moleküle tragen zu einem einzigen Haupt-<sup>19</sup>F-Signal bei. Viele PFCs, die aufgrund ihrer chemischen Struktur komplexere <sup>19</sup>F-Spektren mit mehreren Resonanzfrequenzen aufweisen, besitzen geringere <sup>19</sup>F-Signalstärken [55]. PFnO (Perfluor-n-octan) enthält nur zwei endständige CF<sub>3</sub>-Gruppen und einige CF<sub>2</sub>-Gruppen. PFnO besitzt eine vollständig fluorierte lineare Kohlenwasserstoffkette, bei dem 6 von insgesamt 18 Fluor-Atomen zum Haupt-<sup>19</sup>F-Signal beitragen. Die restlichen 6 x 2 Fluor-Atome der mittelständigen CF<sub>2</sub>-Gruppen hingegen tragen nicht zum Haupt-<sup>19</sup>F-Signal bei. Eine dem PFnO ähnliche Molekülstruktur liegt bei PFOB (Perfluor-Octyl-Bromid) vor. Dieses weist aufgrund seiner chemischen Struktur eine geringere SNR-Effizienz auf, als beispielsweise PFCE [151]. PFCH (Perfluorotrimethylcyclohexan) und PFTBH (Perfluorotertbutylcyclohexan) enthalten jeweils einen Cyclohexan-Ring. Das <sup>19</sup>F-MR-Spektrum von PFCH und PFTBH ist aufgrund von Wechselwirkungen durch benachbarte <sup>19</sup>F-Kerne dreigliedrig aufgespalten [47, 150, 152, 153]. Das Haupt-<sup>19</sup>F-Signal des PFCH wird durch drei CF<sub>3</sub>-Gruppen gebildet. Die drei übrigen Kohlenstoffatome sind durch CF<sub>2</sub>-Gruppen und CF-Gruppen substituiert, welche nicht zum Haupt-<sup>19</sup>F-Signal beitragen. Bei PFTBH (Perfluor-tert-Butylcyclohexan) enthält der tert-Butyl-Substituent am C6-Atom des Cyclohexan-Rings drei CF<sub>3</sub>-Gruppen mit jeweils 3 Fluoratomen, die mit 9/20 Fluoratomen zum Haupt-<sup>19</sup>F-Signal beitragen. Es sind 11 zusätzliche Fluoratome (5 x CF<sub>2</sub>-Fluoratome, 1 x CF-Fluoratome) enthalten, welche nicht zum Haupt-<sup>19</sup>F-Signal beitragen. In Studien werden für Moleküle mit perfluorierten tert-Butylgruppen sowie

perfluorierte Cyclohexane mit Tri-Fluoro-Methylgruppen gute  $^{19}\text{F}$ -MRT-Signalstärken angegeben [152, 154-157].

Nach der Anzahl der  $^{19}\text{F}$ -Atome zu urteilen, sollte die  $^{19}\text{F}$ -Signalstärke des Hauptsignals bei PFCE am stärksten ausfallen, gefolgt von PFCH, PFTBH und PFnO. Die unterschiedlichen gemessenen Signalstärken deuten darauf hin, dass andere Faktoren zu dem Messergebnis beigetragen haben. Eine höhere Messkonzentration führt in der Regel zu einem stärkeren Signal. Ein Signalverlust durch ungleiche Messkonzentrationen, welche die Vergleichbarkeit der PFCs beeinträchtigen, ließen sich durch Prozessoptimierungen der PFC-Herstellung, des Messprotokolls und der instrumentellen Parameter erreichen.

## 5.2 Zelluläre Aufnahme von PFCs

### 5.2.1 $^{19}\text{F}$ -MRT

In der vorliegenden Arbeit wurde die zelluläre Aufnahme der PFCs zunächst anhand von J774A.1-Makrophagen untersucht, die eine hohe Phagozytosefähigkeit aufweisen [158]. Mittels Durchflusszytometrie und  $^{19}\text{F}$ -MRT-Messungen konnte gezeigt werden, dass J774A.1-Zellen, sowohl PFnO-, PFCH-, PFCE- und PFTBH-PFCs aufnehmen (siehe Ergebnisteil Abb. 4 - 7 & 4 - 8).

In den Messergebnissen war die  $^{19}\text{F}$ -Signalintensität in den J774A.1-Zellen je nach PFC unterschiedlich (siehe Abbildung 4 - 10). Eine mögliche Erklärung wäre beispielsweise ein unterschiedlicher  $^{19}\text{F}$ -Gehalt der PFCs untereinander. Studien zeigen weiterhin, dass größere PFC-Partikel effizienter von den Zellen aufgenommen werden als kleinere Partikel [95, 113]. Auch könnten sie anders innerhalb der Zellen verteilt werden, was zu Unterschieden in der Signalintensität führt [95, 113].

Auch die Oberflächenladung der Nanopartikel besitzt Einfluss auf die zelluläre Aufnahme der Partikel. So führe eine negative Oberflächenladung der Liposomen zu einer Verdreifachung der zellulären Aufnahme [79, 159]. In den Ergebnissen der durchflusszytometrischen Analysen der zellulären Aufnahme durch J774A.1-Makrophagen in der vorliegenden Arbeit konnte bei  $^{A488}\text{PFCH}$ -PFCs und  $^{A647}\text{PFCE}$ -PFCs ein stärkeres Fluoreszenzsignal festgestellt werden, als bei  $^{A425}\text{PFnO}$ -PFCs und  $^{A700}\text{PFTBH}$  (siehe Ergebnisteil Abbildung 4-7). Sowohl  $^{A488}\text{PFCH}$  und  $^{A647}\text{PFCE}$  wiesen ein leicht negativeres mittleres  $\zeta$ -Potenzial auf, als  $^{A488}\text{PFCH}$ -PFCs und  $^{A647}\text{PFCE}$ -PFCs (siehe Ergebnisteil Abb. 4-1). Jedoch kann aus der Ladung des  $\zeta$ -Potenzials nicht automatisch auf eine bessere zelluläre Aufnahme geschlossen werden, da diese von weiteren zellspezifischen Mechanismen abhängt [160]. So können auch je nach Zelltyp unterschiedliche Zonen der Oberflächenladung in den Plasmamembranen der jeweiligen Zellen vorliegen, die die Interaktion mit PFC-Nanoemulsionen beeinflusst [160].

Bereits in früheren Experimenten konnte gezeigt werden, dass J774A.1-Zellen effizient PFCs internalisieren [95]. In diesen Untersuchungen wurden bisher PFCE-PFCs mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 100 nm, 150 nm und 250 nm verwendet.

Dabei wurden größere Partikel bevorzugt von den Zellen aufgenommen [95]. In weiteren Untersuchungen wurde gezeigt, dass PFnO-PFCs durch Subpopulationen dendritischer Zellen aufgenommen werden [51]. PFCH-PFCs wurden zur Markierung von Thromben verwendet [104]. PFTBH-PFCs wurden genutzt, um Tumor-assoziierte Makrophagen und Gliazellen zu markieren [47].

Um festzustellen, ob eine passive Aufnahme der vier hergestellten PFCs durch Immunzellen möglich ist, wurde die zelluläre Aufnahme der  $A^{425}$ PFnO-PFCs,  $A^{488}$ PFCH-PFCs,  $A^{647}$ PFCE-PFCs und  $A^{700}$ PFTBH-PFCs zunächst mittels  $^{19}\text{F}$ -MRT und 2D-CSI-Messprotokoll *in vitro* untersucht. Aus den Ergebnissen der 2D-CSI- $^{19}\text{F}$ -MRT-Messung konnte die zelluläre Aufnahme dieser PFCs durch J774A.1-Makrophagenzellen festgestellt werden.

Die  $^{19}\text{F}$ -Signalstärke der PFC-Messungen nach zellulärer Aufnahme variierte zwischen den einzelnen PFCs. So war nach zellulärer Aufnahme das  $^{19}\text{F}$ -Signal der PFCH-PFCs mit einem mittleren SNR-Wert von 200 am stärksten, während das Signal der PFnO-PFCs mit einem mittleren SNR-Wert von 20 am schwächsten war. Die Signalstärke der PFTBH-PFCs und PFCE-PFCs wurde bei einem mittleren SNR-Wert von 50 gemessen. Bei den PFCE-PFCs, welche die meisten  $^{19}\text{F}$ -Atome enthielten, lag die Signalstärke sowohl vor und nach zellulärer Aufnahme im mittleren Bereich. Auch bei den PFTBH-PFCs, welche bei den Messungen ohne zelluläre Aufnahme ein deutlich stärkeres Signal als die anderen PFCs aufwiesen, wurde ein mittelgradig starkes  $^{19}\text{F}$ -Signal gemessen.

Zu erwarten wäre gewesen, dass die Zellproben mit den PFTBH-PFCs aufgrund des höheren Gehalts an  $^{19}\text{F}$ -Atomen von PFTBH ein stärkeres Signal haben. Auffallend ist, dass die Signalstärke der PFCH-PFCs bei den Messungen ohne zelluläre Aufnahme am stärksten war, während sie bei den Messungen nach zellulärer Aufnahme der PFCs am schwächsten war. Zu untersuchen gilt es daher auch, ob die zelluläre Aufnahme und verschiedene Zellarten die PFCs in gleichem Maße internalisieren. In Studien zeigte sich eine Diskrepanz der  $^{19}\text{F}$ -Signalstärke vor und nach zellulärer Aufnahme und dass sie auch von Faktoren, wie der Partikelgröße und der Umgebung der PFCs abhängt [161-163]. Wie bereits zuvor erwähnt, werden größere Partikel bevorzugt durch Makrophagen aufgenommen, was durch den erhöhten  $^{19}\text{F}$ -Gehalt zu einem stärkeren Signal führt [163]. So war in dieser Arbeit bei den DLS-Messungen die mittlere Partikelgröße der PFCH-PFCs, bei welchen auch das stärkste  $^{19}\text{F}$ -Signal gemessen wurde, am größten. PFnO-PFCs, bei welchen korrespondierend dazu das schwächste  $^{19}\text{F}$ -Signal nach zellulärer Aufnahme gemessen wurde, enthielten den kleinsten mittleren Partikeldurchmesser. Ähnlich dazu stellten Bouvain et al. 2019 bei Untersuchungen fest, dass zu einer stärkeren zellulären Aufnahme größerer Partikel kommt [162].

## 5.2.2 Fluoreszenzbasierte Verfahren

Die zelluläre Aufnahme der in der Arbeit hergestellten PFCs wurde mittels fluoreszenzbasierter Verfahren, wie der IVIS-Bildgebung oder der Durchflusszytometrie, untersucht und bestätigt. Für die Untersuchungen wurden die PFCs zusätzlich mit

Lipiden markiert, welche Fluoreszenzfarbstoffe besitzen. Die eingesetzten Farbstofflipide enthalten verschiedene Absorptions- und Emissionsspektren, um eine Darstellung in verschiedenen Fluoreszenzkanälen simultan zu ermöglichen. Vor der zellulären PFC-Aufnahme wurde in den fluoreszenzspektroskopischen Messungen bestätigt, dass die Anregungs- und Emissionsspektren unterscheidbar waren.

Zur Markierung der PFCs wurden in dieser Arbeit Farbstofflipide von Attotec® (ATTO 425 markiertes DPPE, ATTO 488 markiertes DPPE, ATTO 647 markiertes DPPE und ATTO 700 markiertes DPPE) genutzt. Attotec®-Fluoreszenzlipide fanden bei der PFC-Herstellung bisher vereinzelt Anwendung [46, 164], jedoch wurden Atto425-DPPE, Atto488-DPPE, Atto647-DPPE und Atto700-DPPE, welche in dieser Arbeit verwendet wurden, bisher nicht in Kombination eingesetzt. In einer Studie von Srinivas et al. aus dem Jahre 2010 wurden beispielsweise PFCE-PFCs mit den Fluorochromen ATTO 647-DPPE, Carboxyfluorescein und DyLight488 NHS-Ester hergestellt und dendritische Zellen markiert [48]. Darüber hinaus lassen sich PFCs mit einer Vielzahl an weiteren Fluorochromen herstellen, wie es in zahlreichen Studien gezeigt wurde [83, 165-169]. Weitere Beispiele für Fluoreszenzfarbstoffe, die in den letzten Jahren bei der PFC-Herstellung genutzt wurden, sind GFP (Green Fluorescent Protein) [170], das grüne Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) [171], Carboxyfluorescein [48], das tiefrot-Fluorochrom Cy5 (Cyanin 5) [172] oder Cy7 (Cyanin 7) [173].

#### **5.2.2.1 IVIS**

Die Messergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die für diese Arbeit hergestellten PFCs  $A^{425}PFnO$ ,  $A^{488}PFCH$ ,  $A^{647}PFCE$ , und  $A^{700}PFTBH$  in vier Fluoreszenzkanälen detektierbar waren und sich die ausgewählten Fluorochrome von Attotec® eignen. Zwar variierte die Fluoreszenzintensität je nach verwendetem Fluoreszenzfarbstoff, jedoch waren die Signale Fluoreszenzfarbstoff-markierter PFCs insgesamt signifikant stärker als die Fluoreszenzsignale unmarkierter PFCs und der Wasserkontrolle. Die IVIS-Messungen der mit den PFCs-markierten Zellen ergaben, dass sich die PFCs mit der vorhandenen Geräteausstattung anregen ließen, es jedoch bei zweien der PFCs bei den verfügbaren Filterkombinationen zu spektralen Überlappungen kam. So konnten mittels vorliegender Anregungs- und Emissionsfilterkombination zwar nicht alle Fluorochrome selektiv angeregt werden, jedoch wäre dies mit einer anderen Geräteausstattung theoretisch möglich.

#### **5.2.2.2 Durchflusszytometrie**

Für die Untersuchungen der zellulären Aufnahme in dieser Arbeit wurden J774A.1-Makrophagen genutzt. Bei den durchflusszytometrischen Messungen konnte die zelluläre Aufnahme von  $A^{425}PFnO$ -PFCs,  $A^{488}PFCH$ -PFCs,  $A^{647}PFCE$ -PFCs, und  $A^{700}PFTBH$ -PFCs durch J774A.1-Makrophagen nach 40-minütiger Inkubation in vier Fluoreszenzkanälen (Pacific-Blue, FITC, APC, APC-Cy7) im Vergleich zu unmarkierten Zellen bestätigt werden (siehe Ergebnisteil Abb. 4-7).

Die fluoreszenzbasierte Darstellung der zellulären PFC-Aufnahme von Makrophagen und andere Immunzellarten durch verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe wurde bisher auch in einigen Zellstudien beschrieben [48, 78, 165, 167]. In einer Veröffentlichung von Flögel et al. aus dem Jahr 2008 wurde die Oberfläche von PFC-Nanopartikel mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff, wie Rhodamin, für die Immunhistochemie und Durchflusszytometrie zur Zwecken der Markierung verschiedener Zellpopulationen *ex vivo* modifiziert [40]. Die zelluläre Aufnahme von Rhodamin-PFCs durch Zellen des Monozyten/Makrophagen-Systems, T-Zellen, B-Zellen aus einer Blutprobe sowie RAW 264.7-Makrophagen aus der Zellkultur wurden von Flögel et al. 2008 durchflusszytometrisch und immunhistochemisch festgestellt [40]. Flögel et al. zeigten, dass die PFC-Aufnahme durch humane Monozyten, Granulozyten, und B-Zellen *in vitro* dem murinen System ähnlich ist [174]. Auch in weiteren Untersuchungen wurden Rhodamin-PFCE- und Rhodamin-PFOB-Nanoemulsionen zur Molekular-Bildgebung und Zellmarkierung eingesetzt [47, 175-177]. 2022 zeigten Croci et al., dass Tumor-assoziierte Makrophagen *in vivo* bei Mäusen durch Rhodamin-gefärbte PFCs verfolgt werden können [47].

### 5.3 Multispektrale <sup>19</sup>F-Magnetresonanztomographie

Die Möglichkeit, unterschiedliche Immunzellsubpopulationen nichtinvasiv innerhalb eines Entzündungsherdens darzustellen, könnte es ermöglichen, entzündliche Prozesse nicht nur einfach zu detektieren, sondern u.a. auch das Stadium, die Qualität und den Schweregrad zu ermitteln. Die simultane Darstellung mehrerer Zellen und Strukturen ist prinzipiell durch die sogenannte multispektrale <sup>19</sup>F-MRT möglich, was bisher in einigen wenigen Studien untersucht wurde [65, 108-110].

Eine Besonderheit des <sup>19</sup>F-Kerns liegt darin, dass die <sup>19</sup>F-Signale von unterschiedlichen Perfluorkarbonen oder anderen fluorierten Verbindungen je nach chemischer Umgebung eine Verschiebung der Resonanzfrequenz aufweisen (Chemical Shift). Dieser Bereich ist bei dem <sup>19</sup>F-Kern sehr groß und erstreckt sich über mehrere hundert ppm [53, 56, 178-180], was bedeutet, dass <sup>19</sup>F-Verbindungen mitunter individuelle spektrale Signaturen besitzen. Die <sup>19</sup>F-MRT bietet daher, wie bereits oben erwähnt, gute Voraussetzungen, um am Entzündungsgeschehen beteiligte Moleküle oder beteiligte Immunzellen, wie Neutrophile Granulozyten, T-Zellen, oder M1/M2-Makrophagen simultan darzustellen.

Um sich diesem Ansatz zu nähern, wurden in dieser Arbeit vier unterschiedliche Perfluorkarbone (PFnO, PFCH, PFCE, PFTBH) zur Darstellung jeweils einer immunologisch relevanter Zelllinie verwendet. Die Haupt-<sup>19</sup>F-Signale der verwendeten PFCs sind deutlich voneinander getrennt und lassen sich daher selektiv anregen und detektieren (siehe Abb. 4-4). Hierzu wurden THP-1-Zellen, HL-60-Zellen, WEHI-231 und CHO-Zellen verwendet. Bei den THP-1-Zellen handelt es sich um eine humane Zelllinie leukämischen Ursprungs, welche Monozyten-ähnliche Eigenschaften aufweist und für *in*

*in vitro* Zellstudien genutzt wird [181, 182]. Die Zellen sind spontan immortalisiert und wurden ursprünglich durch Laukapherese aus dem peripheren Blut eines einjährigen Jungen gewonnen, welcher an akuter monozytärer Leukämie erkrankt war [183]. Sie sind laut Studien sowohl zur Endozytose als auch zur Phagozytose von Nanopartikeln fähig [184]. HL-60-Zellen sind humane promyelozytäre Zellen, die ähnliche Eigenschaften wie Neutrophile Granulozyten aufweisen und zur Opsonisierung [185] und Phagozytose von Bakterien fähig sind [117]. Ein weiterer Abwehrmechanismus von Neutrophilen-Granulozyten, der sogenannte intrinsische NADPH-Oxidase-Komplex, ist bei HL-60-Zellen ebenfalls vorhanden [117]. In einer *ex vivo* Studie von Bisso et al. aus dem Jahr 2019 wird angegeben, dass Neutrophile Granulozyten bevorzugt größere liposomale Partikel bis 200 nm passiv aufnehmen [118]. CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary Cells) sind eine Epithelzelllinie, die aus den Ovarien eines chinesischen Zwerghamsters stammt. Sie sind keine spezialisierten Phagen, ihre Fähigkeit zur Endozytose und Aufnahme von Nanopartikeln wurde jedoch experimentell bestätigt [119-121]. Bei den WEHI-231-Zellen handelt es sich um eine murine B-Zelllinie. Studien haben gezeigt, dass WEHI-Zellen eine ausgeprägte Fähigkeit zur Aufnahme von Nanopartikeln aufweisen und zur Phagozytose und Endozytose fähig sind [122-125]. Die THP-1 wurden mit  $^{A425}$ PFnO-PFCs, die HL-60 mit  $^{A488}$ PFCH-PFCs, die CHO mit  $^{A647}$ PFCE-PFCs und die WEHI-231 mit  $^{A700}$ PFTBH-PFCs *in vitro* markiert. Über die IVIS-Bildgebung wurde zunächst die Aufnahme der PFCs verifiziert (siehe Ergebnisteil Abb. 4-9). Anschließend wurden die Zellpellets aller Zelltypen simultan mittels Multispektraler  $^{19}\text{F}$ -MRT (siehe Ergebnisteil Abb. 4-10) gemessen.

Mittels  $^{19}\text{F}$ -MRT und der 2D-CSI-Methode war eine eindeutige spektrale Unterscheidung der PFCs möglich, was mittels IVIS-Fluoreszenzbildgebung nicht abschließend gelang, da die Anregung mit den gewählten Filtern teilweise zu einem messbaren Signal in mehr als einem Fluoreszenzkanal führte (siehe Ergebnisteil Abb. 4-5). Bei der  $^{19}\text{F}$ -MRT-Bildgebung lagen die Unterschiede in der Resonanzfrequenz zwischen diesen Haupt-Signalspitzen bei ca. 10 ppm, was ausreichend ist um bei der verwendeten Bildgebungsmethode (*Chemical Shift Imaging*) keinen Signalübertrag zu erzeugen. Zwar besitzen PFTBH, PFCH und PFnO weitere  $^{19}\text{F}$ -Signale aufgrund von  $\text{CF}_2$  und  $\text{CF}$ -Gruppen, jedoch überlappen diese teilweise (siehe Abb. 4-6 A), sodass sie nicht zur Unterscheidung der Perfluorkarbone genutzt werden können. Das bedeutet jedoch auch, dass ein Teil der  $^{19}\text{F}$ -Atome nicht detektiert wird und somit ggf. die Sensitivität etwas geringer ausfällt.

Dass die Multispektrale  $^{19}\text{F}$ -MRT-Bildgebung für die Diagnostik und Therapie entzündlicher Erkrankungen mit mehreren beteiligten Zelltypen prinzipiell geeignet ist, wurde in einigen Studien dargelegt, wenngleich die klinischen Möglichkeiten für die Multispektrale  $^{19}\text{F}$ -MRT *in vivo* zunächst limitiert blieben [104, 108, 186-188]. Bisher konnten zwei oder drei verschiedene Zellarten simultan in einem Untersuchungshergang mittels  $^{19}\text{F}$ -MRT *in vivo* dargestellt werden [65, 104, 110, 189]. Partlow et al. verwendeten 2007 erstmals eine Kombination von PFCE und PFOB zur Markierung humaner

hämatopoietischer Stammzellen [84]. Die PFCs wurden passiv durch die Zellen aufgenommen. Auch 2008 wurde von Janjic et al. gezeigt, dass zwei verschiedene PFCs durch phagozytierende und nicht-phagozytierende Zellen aufgenommen werden können [169]. Chirizzi et al. untersuchten 2019 mittels  $^{19}\text{F}$ -MRT-Technik die passive Aufnahme von zwei spektral unterschiedlichen PFCs durch mononukleäre Zellen bei Mäusen [65]. Flögel et. al. zeigten 2021 die kombinatorische  $^{19}\text{F}$ -Bildgebung von drei verschiedenen PFCs am Mausmodell [104]. Monozyten/Makrophagen und thrombotische Prozesse wurden dafür simultan über aktives Targeting durch spezifische Peptide (Fbn,  $\alpha 2\text{AP}$ ) mit PFOB, PFCH und PFTBH gezielt angesteuert. Es wurden akute, subakute und chronische Thromben unterschieden und in der  $^{19}\text{F}$ -MRT sowie Fluoreszenzbildgebung untersucht.

In dieser Arbeit konnten erstmals vier unterschiedliche Zellarten mit Hilfe von spektral unterscheidbaren PFCs dargestellt werden. Auf der Grundlage dieser Arbeit bietet die Multispektrale  $^{19}\text{F}$ -MRT mit spektral unterscheidbaren PFCs somit die Möglichkeit zur Darstellung und Quantifizierung von mindestens vier Immunzellarten *in vivo*. Auch konnte gezeigt werden, dass sich die vier hergestellten PFCs für die fluoreszenzbasierte Darstellung von vier Zellarten eignen.

## 5.4 Limitationen und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit und die Ansätze bisheriger Forschungen deuten darauf hin, dass PFCs ein großes Potenzial für die simultane Darstellung mehrerer Immunzelltypen mittels multispektraler  $^{19}\text{F}$ -MRT bieten. Chirizzi et al. untersuchten 2019 die Anwendung zweier verschiedener PFCs simultan, um mononukleäre Zellen zu verfolgen [65]. Flögel et. al. zeigten 2021 die kombinatorische  $^{19}\text{F}$ -Bildgebung von drei verschiedenen PFCs am Mausmodell [104]. Mittels der in dieser Arbeit vorgestellten Methode können nun auch bis zu vier Immunzelltypen mittels  $^{19}\text{F}$ -MRT und hergestellten PFCs simultan dargestellt und spektral unterschieden werden. In Studien wurde gezeigt, dass PERFECTA-PFCs ebenfalls für die kombinatorische  $^{19}\text{F}$ -MRT-Bildgebung mehrerer Zelltypen eingesetzt wurden und sich möglicherweise für die spektral getrennte Darstellung von vier Zelltargets eignen [128, 189].

In der vorliegenden Arbeit wurden für die  $^{19}\text{F}$ -MRT-Messungen eine FT-basierte CSI-Methode (*Chemical Shift Imaging*) angewandt, um simultane  $^{19}\text{F}$ -Messungen mehrerer Perfluorkarbone durchzuführen. Mit Hilfe der Fourier-Transformation (FT), einer mathematischen Operation, werden die Bildinformationen umgerechnet und die Signale der entsprechenden Frequenzbereiche in ihre Frequenzkomponenten transformiert. Bei der CSI-Methode handelt es sich um eine Erweiterung der MR-Spektroskopie, bei der nach jedem Phasenkodierschritt Voxel für Voxel ein NMR-Spektrum aufgenommen wird und anschließend die Spektren zu einer zweidimensionalen Karte zusammengesetzt werden. Die CSI-Methode ist nur phasenkodiert und die Intervallzeit zwischen den Anregungspulsen ist relativ lang. Es existiert jedoch eine weitere Bildgebungssequenz,

die eine deutlich kürzere Aufnahmedauer besitzt. Für zukünftige *in vivo* Versuche, oder sogar klinische Anwendungen eignet sich diese mCSSI-RARE-Methode (*Multiple Chemical Shift Selective RARE Imaging*) [104, 190]. Mit der mCSSI-Sequenz können verschiedene chemischer Verbindungen im Körper dargestellt werden, indem spezifische Frequenzbereiche hervorgehoben oder unterdrückt werden. Mögliche Herausforderungen sind die Komplexität der Datenerfassung und der Datenverarbeitung und eine anspruchsvollere Interpretation der gewonnenen MR-Daten, da eine genaue Kenntnis der chemischen Eigenschaften und dem Verhalten der kontrastgebenden Substanzen erfordert.

Zusätzliche bildgebende Möglichkeiten für die Zellmarkierung mit PFCs ergeben sich durch die Inkorporation von Fluoreszenzfarbstoff-Lipiden bei der PFC-Herstellung [78, 98, 166, 168, 175]. So könnte beispielsweise mit einer Fluoreszenzkamera, die über Blutgefäße gehalten wird, die Halbwertszeit von im Blut befindlichen Zellen bestimmt werden. Es existieren verschiedene Möglichkeiten, um Fluoreszenzfarbstoff-PFC-Konjugate zu erzeugen. In dieser Arbeit wurden fluoreszierende Lipide durch Hochdruck-Emulgierung in die Oberfläche der PFC-Nanopartikel eingefügt. Eine weitere Methode besteht darin, die Fluoreszenzfarbstoffe kovalent mit PLGA-Nanopartikeln zu konjugieren [191]. Dies setzt voraus, dass die Perfluorkarbone in PLGA-Nanopartikel eingekapselt wurden [51].

In der vorliegenden Arbeit waren die Signale der Lipidgebundenen Fluorochrome in den entsprechenden Fluoreszenzkanälen messbar und quantifizierbar. Eine Multispektrale Bildgebung ist auch mittels Fluoreszenzbildgebung möglich, wie in vorherigen Studien und der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde [192]. Zwar waren mit den ausgewählten Filterkombinationen im IVIS-Fluoreszenzdetektor nicht alle Fluoreszenzfarbstoffe selektiv erregbar, jedoch kann dies möglicherweise durch eine bessere Geräteausstattung oder eine andere Auswahl der Fluorochrome behoben werden. Die Durchflusszytometrie bietet die Möglichkeit mehrere Zielstrukturen mittels Fluoreszenzantikörpern zu markieren und zu untersuchen [193]. In den Messergebnissen der durchflusszytometrischen Analyse der PFC-Aufnahme durch J774A.1-Makrophagen aus der Zellkultur konnte gezeigt werden, dass sich die Fluoreszenzsignale der PFC-markierten Zellen im Vergleich zur unmarkierten Zellen klar unterscheiden lassen (siehe Ergebnisteil Abb. 4-7) und sich somit prinzipiell für eine simultane Markierung mehrerer Zielstrukturen eignen können. Zwar existieren bereits Methoden, wie die *Imaging Mass Cytometry*, welche eine Ansteuerung von bis zu 40 Proteinen erlaubt [194], jedoch ist es nötig dafür aus Organen Biopsien zu entnehmen, was zum einen invasiv ist und mit einer Belastung für den Patienten einhergeht [194-196]. Diese Methode ist daher weniger geeignet, um ein heterogenes, multilokuläres Entzündungsgeschehen zu untersuchen. Weiterhin ist sie wegen des Stichprobenfehlers begrenzt nutzbar. Auch lassen sich die Fluoreszenzsignale zwar gut über eine zweidimensionale Detektorplatte detektieren, jedoch existiert keine fluoreszenzbasierte Methode, die eine derart hochauflösende dreidimensionale



Darstellung innerhalb des Entzündungsgewebes erlaubt, wie die Multispektrale  $^{19}\text{F}$ -Bildgebung.

Anhand der Messungen mittels  $^{19}\text{F}$ -MRT und Fluoreszenz-Bildgebung in dieser Arbeit wurde festgestellt, dass die hergestellten PFCs durch verschiedene immunrelevante Zellen aufgenommen wurden. In Studien wurden bereits einige Immunzellarten (T-Zellen, B-Zellen, dendritische Zellen, und neurale Stammzellen) mittels  $^{19}\text{F}$ -MRT untersucht [65, 72-74]. Abhängig von PFC-Typ und Zelllinie zeigte sich in den Messergebnissen dieser Arbeit, dass mit Hilfe der  $^{19}\text{F}$ -MRT und der 2D-CSI-Methode unterschiedliche Signalstärken messbar waren, was auf einen weiteren Optimierungsbedarf hindeutet. Um eine Vergleichbarkeit der Proben zu ermöglichen, sollte in zukünftigen Untersuchungen die Konzentration der PFCs für den entsprechenden Zelltyp normiert werden. In den Ergebnissen war erkennbar, dass die  $^{19}\text{F}$ -Signalstärke nach zellulärer Aufnahme bei  $^{19}\text{F}$ -PFCH deutlich niedriger war, als bei den Messungen der PFCs alleine. Die variierenden  $^{19}\text{F}$ -Signale bei den simultanen Messungen der PFCs in paarweiser Kombination mit verschiedenen Zellartpopulationen deuten darauf hin, dass einige Zellarten die PFCs besser aufnehmen. Dies sollte jedoch in Zukunft untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die untersuchten Zellpopulationen nur über Phagozytose bzw. Endozytose markiert. Zwar sind diese Eigenschaften bei vielen Zellarten vorhanden, jedoch können dadurch keine Zellen erreicht werden, bei denen Phagozytose und Endozytose nicht oder nur mäßig stark ausgeprägt ist. Um verschiedene Immunzellarten oder Thrombozyten *in vivo* selektiv anzusteuern, wäre ein sogenanntes aktives Targeting notwendig. Beispiele für Zielantigene von Immunzellen sind CCR2 (Monozyten), CD177 (Neutrophile Granulozyten), CAM/CD31 (Endothelzellen), CD8/CD4 (T-Zellen) und CD19/CD20 (B-Zellen und ihre Vorstufen). Eine Internalisierung von PFC-Partikeln in die Immunzellen ist nicht zwingend erforderlich, wohl aber eine stabile Bindung an einen Targeting-Liganden der Zielstruktur. Im Herstellungsprozess können spezifische Targeting-Liganden in der PFC-Oberfläche integriert werden, um die Bindung zu den Immunzellen zu vermitteln [79]. Zur Oberflächenmodifikation der PFC-Nanopartikel wurden in der Vergangenheit zwei Verfahren angewandt: Die Sterol-basierte Postinsertionstechnik (SPIT) sowie der Einbau von Lipiden mit reaktiven Gruppen, wie Maleimid, während des Herstellungsprozesses der PFCs [49, 96, 112]. Durch die Integration sogenannter PEG (PEGylierte Lipide) in die PFCs lässt sich die passive Aufnahme durch phagozytierende Zellen unterdrücken [162]. Bei der Entwicklung des aktiven Targetings wurden bereits einige Fortschritte gemacht. So konnte von unserer Arbeitsgruppe bereits 2015 gezeigt werden, dass PFCs mit dem  $\alpha$ 2-Antiplasmin-Peptid modifiziert werden können, um gezielt eine Bindung an das Fibrinnetzwerk herzustellen, um auf diese Weise frühe venöse Thromben in Mäusen sichtbar zu machen [49]. Bouvain et al. zeigten 2023, dass PFCs für ein aktives Targeting an humane neutrophile Granulozyten durch ein spezifisches Peptid (NG2) modifiziert werden können [95]. 2020 wurde von Straub et al.

2020 der Einsatz von EP9-markierten PFCs demonstriert, um eine hochaffine Verbindung zu epikardialen stromalen Zellen (EpiSCs) herzustellen.

Insgesamt ist die Multispektrale  $^{19}\text{F}$ -MRT-Bildgebung von mehr als drei Immuzellsubpopulationen mittels PFCs eine zukunftsweisende Technologie, deren prinzipielle Machbarkeit in dieser Arbeit gezeigt wurde. Fraglich ist noch, für welche klinischen Einsatzgebiete am Menschen die Multispektrale  $^{19}\text{F}$ -MRT-Bildgebung einen signifikanten Nutzen in der Diagnostik bieten könnte. Bedeutsam könnte die Multispektrale  $^{19}\text{F}$ -MRT-Bildgebung für die Beurteilung entzündlicher Prozesse sein. Sie könnte das Auffinden der beteiligten Zelltypen erheblich vereinfachen und die Möglichkeit bieten, verschiedene Aspekte einer Entzündungsreaktion gleichzeitig zu visualisieren. Durch die Markierung unterschiedlicher beteiligter Immuzellpopulationen, wozu auch Stammzellen gezählt werden, könnte die Multispektrale  $^{19}\text{F}$ -MRT-Bildgebung daher eine bedeutende Stütze für diagnostische Prozesse und für die Überwachung von Therapieerfolgen sein.

Bei der rheumatoiden Arthritis kann die Multispektrale  $^{19}\text{F}$ -MRT-Bildgebung eine Hilfe sein, um mehrere am entzündlichen Prozess beteiligte Zellpopulationen simultan in den betroffenen Gelenken zu lokalisieren, quantifizieren und Therapieeffekte zu untersuchen sowie die Zellinteraktionen im zeitlichen Verlauf besser zu verstehen. Die  $^{19}\text{F}$ -MRT-Bildgebung wurde bereits zur Markierung einzelner Zelltypen, wie LPS-aktivierten Makrophagen und Tumorzellen im Mausmodell angewandt [11]. Auch bei der Untersuchung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen, wie Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa, können durch die Multispektrale  $^{19}\text{F}$ -MRT-Bildgebung mehrere beteiligte Zelltypen, wie Makrophagen, dendritischen Zellen und T-Zellen, identifiziert und sogar eine Echtzeit-Darstellung im aktuellen Krankheitsstadium ermöglicht werden, wodurch potenzielle Komplikationen im Therapieverlauf frühzeitig erkannt werden können.  $^{19}\text{F}$ -MRT wurde zur Untersuchung dieser Erkrankungen bereits in der Vergangenheit angewandt und kann bei der Implementierung mehrerer Tracer eine bedeutendere Rolle spielen [197].

## 6 LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS

1. Front, D., et al., *Technetium-99m-labeled red blood cell imaging*. Semin Nucl Med, 1984. **14**(3): p. 226-50.
2. Rövekamp, M.H., *Indium-111 labelled leucocyte scintigraphy in the diagnosis of inflammatory disease*. 1982.
3. Seeger, F.H., et al., *p38 mitogen-activated protein kinase downregulates endothelial progenitor cells*. Circulation, 2005. **111**(9): p. 1184-91.
4. Gambhir, S.S., *Molecular imaging of cancer with positron emission tomography*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(9): p. 683-93.
5. Bensch, F., et al., *(89)Zr-atezolizumab imaging as a non-invasive approach to assess clinical response to PD-L1 blockade in cancer*. Nat Med, 2018. **24**(12): p. 1852-1858.
6. Mettler, F.A., et al., *Effective Doses in Radiology and Diagnostic Nuclear Medicine: A Catalog*. Radiology, 2008. **248**(1): p. 254-263.
7. Ha, S., et al., *Comparison of SPECT/CT and MRI in diagnosing symptomatic lesions in ankle and foot pain patients: diagnostic performance and relation to lesion type*. PLoS One, 2015. **10**(2): p. e0117583.
8. Ahrens, E.T. and J.W.M. Bulte, *Tracking immune cells in vivo using magnetic resonance imaging*. Nature Reviews Immunology, 2013. **13**(10): p. 755-763.
9. Ibrahim, M.A., B. Hazhirkarzar, and A.B. Dublin, *Gadolinium Magnetic Resonance Imaging*, in *StatPearls*. 2022: Treasure Island (FL).
10. Stoll, G., et al., *Visualization of inflammation using (19)F-magnetic resonance imaging and perfluorocarbons*. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol, 2012. **4**(4): p. 438-47.
11. Vu-Quang, H., et al., *Imaging Rheumatoid Arthritis in Mice Using Combined Near Infrared and (19)F Magnetic Resonance Modalities*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 14314.
12. Yeh, T.C., et al., *In vivo dynamic MRI tracking of rat T-cells labeled with superparamagnetic iron-oxide particles*. Magn Reson Med, 1995. **33**(2): p. 200-8.
13. Bulte, J.W., et al., *Frequency dependence of MR relaxation times. II. Iron oxides*. J Magn Reson Imaging, 1993. **3**(4): p. 641-8.
14. Bulte, J.W., *In vivo MRI cell tracking: clinical studies*. AJR. American journal of roentgenology, 2009. **193**(2): p. 314.
15. Bulte, J.W., et al., *Specific MR imaging of human lymphocytes by monoclonal antibody-guided dextran-magnetite particles*. Magn Reson Med, 1992. **25**(1): p. 148-57.
16. Tombach, B. and W. Heindel, *Value of 1.0-M gadolinium chelates: review of preclinical and clinical data on gadobutrol*. European Radiology, 2002. **12**(6): p. 1550-1556.
17. Arbab, A.S., et al., *Efficient magnetic cell labeling with protamine sulfate complexed to ferumoxides for cellular MRI*. Blood, 2004. **104**(4): p. 1217-23.
18. Bulte, J.W. and D.L. Kraitchman, *Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging*. NMR Biomed, 2004. **17**(7): p. 484-99.
19. Shapiro, E.M., S. Skrtic, and A.P. Koretsky, *Sizing it up: cellular MRI using micron-sized iron oxide particles*. Magn Reson Med, 2005. **53**(2): p. 329-38.
20. Bulte, J.W.M., et al., *Neurotransplantation of magnetically labeled oligodendrocyte progenitors: Magnetic resonance tracking of cell migration and myelination*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999. **96**(26): p. 15256-15261.

21. Weissleder, R., et al., *Magnetically labeled cells can be detected by MR imaging*. J Magn Reson Imaging, 1997. **7**(1): p. 258-63.
22. Müller, K., et al., *Effect of ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles (Ferumoxtran-10) on human monocyte-macrophages in vitro*. Biomaterials, 2007. **28**(9): p. 1629-1642.
23. Wang, Y.-X.J., S.M. Hussain, and G.P. Krestin, *Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging*. European radiology, 2001. **11**(11): p. 2319-2331.
24. Thomas, R., I.-K. Park, and Y.Y. Jeong, *Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Multimodal Imaging and Therapy of Cancer*. International Journal of Molecular Sciences, 2013. **14**(8): p. 15910-15930.
25. Bulte, J.W.M. and H.E. Daldrup-Link, *Clinical Tracking of Cell Transfer and Cell Transplantation: Trials and Tribulations*. Radiology, 2018. **289**(3): p. 604-615.
26. Yona, S., et al., *Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis*. Immunity, 2013. **38**(1): p. 79-91.
27. Lawrence, T. and G. Natoli, *Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity*. Nature reviews immunology, 2011. **11**(11): p. 750-761.
28. Scholtze, D., *Präoperative Diagnostik primärer und sekundärer Lebertumoren mit Hilfe der Magnetresonanztomografie: Vergleich von Gadolinium-DTPA und Eisenoxid-verstärkter MRT*. 2004.
29. Albes, G., *Facharztprüfung Radiologie*. Auflage, 2013. **1450**: p. 536.
30. Maier, J., *Synthese und Anwendung von FERR-b-PEO stabilisierten SPIO Partikeln als Kontrastmittelsystem für die Magnetresonanztomographie*. 2008, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
31. von Vopelius-Feldt, J., *Experimentelle Studie zur Wertigkeit von neuen Eisenoxid-Kontrastmitteln für die Magnet Resonanz Tomographie der Arthritis*. 2008, Technische Universität München.
32. Singh, N., et al., *Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION)*. Nano Rev, 2010. **1**.
33. Caravan, P., et al., *Gadolinium (III) chelates as MRI contrast agents: structure, dynamics, and applications*. Chemical reviews, 1999. **99**(9): p. 2293-2352.
34. Lin, W., et al., *Gadolinium-enhanced high-resolution MR angiography with adaptive vessel tracking: preliminary results in the intracranial circulation*. Journal of Magnetic Resonance Imaging, 1992. **2**(3): p. 277-284.
35. High, W.A., et al., *Gadolinium is detectable within the tissue of patients with nephrogenic systemic fibrosis*. J Am Acad Dermatol, 2007. **56**(1): p. 21-6.
36. Grobner, T., *Gadolinium--a specific trigger for the development of nephrogenic fibrosing dermopathy and nephrogenic systemic fibrosis?* Nephrol Dial Transplant, 2006. **21**(4): p. 1104-8.
37. Sadowski, E.A., et al., *Nephrogenic systemic fibrosis: risk factors and incidence estimation*. Radiology, 2007. **243**(1): p. 148-57.
38. Behzadi, A.H., et al., *Immediate Allergic Reactions to Gadolinium-based Contrast Agents: A Systematic Review and Meta-Analysis*. Radiology, 2017. **286**(2): p. 471-482.
39. Dillman, J.R., et al., *Allergic-like breakthrough reactions to gadolinium contrast agents after corticosteroid and antihistamine premedication*. AJR Am J Roentgenol, 2008. **190**(1): p. 187-90.
40. Flögel, U., et al., *In vivo monitoring of inflammation after cardiac and cerebral ischemia by fluorine magnetic resonance imaging*. Circulation, 2008. **118**(2): p. 140-8.

41. Ebner, B., et al., *Early assessment of pulmonary inflammation by <sup>19</sup>F MRI in vivo*. *Circ Cardiovasc Imaging*, 2010. **3**(2): p. 202-10.
42. Hertlein, T., et al., *Visualization of abscess formation in a murine thigh infection model of Staphylococcus aureus by <sup>19</sup>F-magnetic resonance imaging (MRI)*. *PLoS One*, 2011. **6**(3): p. e18246.
43. Flögel, U., et al., *Selective Activation of Adenosine A2A Receptors on Immune Cells by a CD73-Dependent Prodrug Suppresses Joint Inflammation in Experimental Rheumatoid Arthritis*. *Science Translational Medicine*, 2012. **4**(146): p. 146ra108-146ra108.
44. Jacoby, C., et al., *Visualization of immune cell infiltration in experimental viral myocarditis by <sup>19</sup>F MRI in vivo*. *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine*, 2014. **27**(1): p. 101-106.
45. Balducci, A., et al., *A novel probe for the non-invasive detection of tumor-associated inflammation*. *Oncoimmunology*, 2013. **2**(2): p. e23034.
46. Constantinides, C., et al., *Fast, quantitative, murine cardiac <sup>19</sup>F MRI/MRS of PFCE-labeled progenitor stem cells and macrophages at 9.4 T*. *PLoS One*, 2018. **13**(1): p. e0190558.
47. Croci, D., et al., *Multispectral fluorine-19 MRI enables longitudinal and noninvasive monitoring of tumor-associated macrophages*. *Science Translational Medicine*, 2022. **14**(667): p. eabo2952.
48. Srinivas, M., et al., *Customizable, multi-functional fluorocarbon nanoparticles for quantitative in vivo imaging using <sup>19</sup>F MRI and optical imaging*. *Biomaterials*, 2010. **31**(27): p. 7070-7.
49. Temme, S., et al., *Noninvasive Imaging of Early Venous Thrombosis by <sup>19</sup>F Magnetic Resonance Imaging With Targeted Perfluorocarbon Nanoemulsions*. *Circulation*, 2015. **131**(16): p. 1405-14.
50. Ahrens, E.T., et al., *In vivo imaging platform for tracking immunotherapeutic cells*. *Nat Biotechnol*, 2005. **23**(8): p. 983-7.
51. Srinivas, M., et al., *PLGA-encapsulated perfluorocarbon nanoparticles for simultaneous visualization of distinct cell populations by <sup>19</sup>F MRI*. *Nanomedicine*, 2015. **10**(15): p. 2339-2348.
52. Hof, S., et al., *A Toolbox to Investigate the Impact of Impaired Oxygen Delivery in Experimental Disease Models*. *Impaired Oxygen Delivery in Experimental Disease Models: Pathogenesis, Diagnostics and Treatment Strategies*, 2022.
53. Waiczies, S., et al., *Functional Imaging Using Fluorine (<sup>19</sup>F) MR Methods: Basic Concepts*, in *Preclinical MRI of the Kidney: Methods and Protocols*, A. Pohlmann and T. Niendorf, Editors. 2021, Springer US: New York, NY. p. 279-299.
54. Torrisi, L., et al., *Depth distribution of fluorine in enamel teeth by <sup>19</sup>F(p, α0)16O reaction*. *Il Nuovo Cimento D*, 1985. **5**(2): p. 164-174.
55. Wu, L., et al., *Perfluorocarbons-Based (<sup>19</sup>F) Magnetic Resonance Imaging in Biomedicine*. *Int J Nanomedicine*, 2020. **15**: p. 7377-7395.
56. Ruiz-Cabello, J., et al., *Fluorine (<sup>19</sup>F) MRS and MRI in biomedicine*. *NMR Biomed*, 2011. **24**(2): p. 114-29.
57. Chen, J., G.M. Lanza, and S.A. Wickline, *Quantitative magnetic resonance fluorine imaging: today and tomorrow*. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2010. **2**(4): p. 431-40.
58. Peterson, K.L., K. Srivastava, and V.C. Pierre, *Fluorinated Paramagnetic Complexes: Sensitive and Responsive Probes for Magnetic Resonance Spectroscopy and Imaging*. *Frontiers in Chemistry*, 2018. **6**.
59. Wawer, I., B. Diehl, and U. Holzgrabe, *NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis*. 2008: Elsevier Science.

60. Slichter, C.P., *Principles of magnetic resonance*. Vol. 1. 2013: Springer Science & Business Media.
61. Claridge, T., *High Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*. 2016, United Kingdom: Oxford.
62. Allemann, B., et al., *<sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie*, in *Laborpraxis Band 4: Analytische Methoden*, aprentas, Editor. 2017, Springer International Publishing: Cham. p. 181-242.
63. Sacchi, R. and L. Paolillo, *NMR for food quality and traceability*. Advances in food diagnostics, 2007: p. 101-117.
64. Heußel, C.P., et al., *Funktionelle MRT der Lunge unter Verwendung von hyperpolarisiertem <sup>3</sup>Helium-Gas*. Medizinische Klinik, 2005. **100**(7): p. 413-424.
65. Chirizzi, C., et al., *Multispectral MRI with Dual Fluorinated Probes to Track Mononuclear Cell Activity in Mice*. Radiology, 2019. **291**(2): p. 351-357.
66. Chapelin, F., C.M. Capitini, and E.T. Ahrens, *Fluorine-19 MRI for detection and quantification of immune cell therapy for cancer*. Journal for ImmunoTherapy of Cancer, 2018. **6**(1): p. 105.
67. O'Hanlon, C.F., et al., *Integrating a <sup>19</sup>F MRI Tracer Agent into the Clinical Scale Manufacturing of a T-Cell Immunotherapy*. Contrast Media Mol Imaging, 2017. **2017**: p. 9548478.
68. Fink, C., et al., *(<sup>19</sup>F)-perfluorocarbon-labeled human peripheral blood mononuclear cells can be detected in vivo using clinical MRI parameters in a therapeutic cell setting*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 590.
69. Temme, S., et al., *Technical advance: monitoring the trafficking of neutrophil granulocytes and monocytes during the course of tissue inflammation by noninvasive <sup>19</sup>F MRI*. J Leukoc Biol, 2014. **95**(4): p. 689-97.
70. Modo, M., et al., *Mapping the acute time course of immune cell infiltration into an ECM hydrogel in a rat model of stroke using (<sup>19</sup>F) MRI*. Biomaterials, 2022. **282**: p. 121386.
71. Stoll, G., et al., *Visualization of inflammation using <sup>19</sup>F-magnetic resonance imaging and perfluorocarbons*. WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology, 2012. **4**(4): p. 438-447.
72. Waiczies, H., et al., *Monitoring dendritic cell migration using <sup>19</sup>F / <sup>1</sup>H magnetic resonance imaging*. J Vis Exp, 2013(73): p. e50251.
73. Cooke, F., et al., *Fluorine labelling of therapeutic human tolerogenic dendritic cells for (<sup>19</sup>F)-magnetic resonance imaging*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 988667.
74. Gonzales, C., et al., *In-Vivo Detection and Tracking of T Cells in Various Organs in a Melanoma Tumor Model by <sup>19</sup>F-Fluorine MRS/MRI*. PLoS One, 2016. **11**(10): p. e0164557.
75. Cosco, D., et al., *Perfluorocarbon-loaded micro and nanosystems for medical imaging: A state of the art*. Journal of Fluorine Chemistry, 2015. **171**: p. 18-26.
76. Matsumoto, S., *Clinical Application of Perfluorocarbons for Organ Preservation*. Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology, 2005. **33**(1): p. 75-82.
77. Liu, Y., et al., *A brief review for fluorinated carbon: synthesis, properties and applications*. Nanotechnology Reviews, 2019. **8**(1): p. 573-586.
78. Winter, P.M., *Perfluorocarbon Nanoparticles: Evolution of a Multimodality and Multifunctional Imaging Agent*. Scientifica, 2014. **2014**: p. 746574.
79. Mayenfels, F., *Fluorcarbonhaltige Nanoemulsionen zur Anwendung in der <sup>1</sup>H/<sup>19</sup>F-Magnetresonanztomographie*. 2012.
80. O'Hagan, D., *Understanding organofluorine chemistry. An introduction to the C-F bond*. Chem Soc Rev, 2008. **37**(2): p. 308-19.

81. Stahl, T., D. Mattern, and H. Brunn, *Toxicology of perfluorinated compounds*. Environmental Sciences Europe, 2011. **23**(1): p. 38.
82. Riess, J.G., *Understanding the fundamentals of perfluorocarbons and perfluorocarbon emulsions relevant to in vivo oxygen delivery*. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol, 2005. **33**(1): p. 47-63.
83. Janjic, J.M. and E.T. Ahrens, *Fluorine-containing nanoemulsions for MRI cell tracking*. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol, 2009. **1**(5): p. 492-501.
84. Partlow, K.C., et al., *<sup>19</sup>F magnetic resonance imaging for stem/progenitor cell tracking with multiple unique perfluorocarbon nanobeacons*. Faseb j, 2007. **21**(8): p. 1647-54.
85. Srinivas, M., et al., *Labeling cells for in vivo tracking using (<sup>19</sup>F) MRI*. Biomaterials, 2012. **33**(34): p. 8830-40.
86. MEYER, K.L., et al., *Fluorinated blood substitute retention in the rat measured by fluorine-19 magnetic resonance imaging*. Investigative radiology, 1992. **27**(8): p. 620-626.
87. Mason, R.P., et al., *Perfluorocarbon imaging in vivo: a <sup>19</sup>F MRI study in tumor-bearing mice*. Magnetic resonance imaging, 1989. **7**(5): p. 475-485.
88. Shimizu, M., et al., *Tumor imaging with anti-CEA antibody labeled <sup>19</sup>F emulsion*. Magnetic resonance in medicine, 1987. **5**(3): p. 290-295.
89. Holland, G.N., P.A. Bottomley, and W.S. Hinshaw, *<sup>19</sup>F magnetic resonance imaging*. Journal of Magnetic Resonance (1969), 1977. **28**(1): p. 133-136.
90. McFarland, E., et al., *In vivo <sup>19</sup>F NMR imaging*. Journal of computer assisted tomography, 1985. **9**(1): p. 8-15.
91. LEVINE, E.M. and K.K. TREMPER, *Perfluorochemical emulsions: potential clinical uses and new developments*. International Anesthesiology Clinics, 1985. **23**(1): p. 211-230.
92. Ma, N., et al., *Influence of nanoparticle shape, size, and surface functionalization on cellular uptake*. J Nanosci Nanotechnol, 2013. **13**(10): p. 6485-98.
93. Haley, B. and E. Frenkel, *Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment*. Urol Oncol, 2008. **26**(1): p. 57-64.
94. Zhang, S., et al., *Layer-by-layer assembly in nanochannels: assembly mechanism and applications*. Nanoscale, 2021. **13**(16): p. 7471-7497.
95. Bouvain, P., *Visualisierung spezifischer Zelltypen mittels nicht-invasiver <sup>19</sup>F-MR-Bildgebung*. 2018.
96. Straub, T., et al., *MRI-based molecular imaging of epicardium-derived stromal cells (EpiSC) by peptide-mediated active targeting*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 21669.
97. Patrick, M.J., et al., *Intracellular pH measurements using perfluorocarbon nanoemulsions*. J Am Chem Soc, 2013. **135**(49): p. 18445-57.
98. Wang, Y.G., et al., *Indocyanine green-loaded perfluorocarbon nanoemulsions for bimodal (<sup>19</sup>F)-magnetic resonance/nearinfrared fluorescence imaging and subsequent phototherapy*. Quant Imaging Med Surg, 2013. **3**(3): p. 132-40.
99. Gore, J.C., et al., *Magnetic resonance in the era of molecular imaging of cancer*. Magnetic resonance imaging, 2011. **29**(5): p. 587-600.
100. Kaplan, O., et al., *In-Vivo Magnetic Resonance Spectroscopy III: In-Vivo MR Spectroscopy: Potential and Limitations*. NMR Basic Principles and Progress 28. 1992: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
101. Goodman, L.S. and A. Gilman, *The pharmacological Basis of Therapeutics*. 11th ed. 2005: McGraw-Hill.

102. Köhler, G. and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature, 1975. **256**(5517): p. 495-497.
103. Yu, J.X., et al., *19F: a versatile reporter for non-invasive physiology and pharmacology using magnetic resonance*. Curr Med Chem, 2005. **12**(7): p. 819-48.
104. Flögel, U., et al., *Multi-targeted 1H/19F MRI unmasks specific danger patterns for emerging cardiovascular disorders*. Nature Communications, 2021. **12**(1): p. 5847.
105. Morel, P.A., et al., *Dendritic cells, T cell tolerance and therapy of adverse immune reactions*. Clin Exp Immunol, 2003. **133**(1): p. 1-10.
106. Wang, G., et al., *Quantitative CT and 19F-MRI tracking of perfluorinated encapsulated mesenchymal stem cells to assess graft immunorejection*. Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine, 2019. **32**(1): p. 147-156.
107. Ottoboni, L., B. von Wunster, and G. Martino, *Therapeutic plasticity of neural stem cells*. Frontiers in neurology, 2020. **11**: p. 148.
108. Akazawa, K., et al., *Perfluorocarbon-Based 19F MRI Nanoprobes for In Vivo Multicolor Imaging*. Angewandte Chemie International Edition, 2018. **57**(51): p. 16742-16747.
109. Schoormans, J., et al., *An iterative sparse deconvolution method for simultaneous multicolor (19) F-MRI of multiple contrast agents*. Magn Reson Med, 2020. **83**(1): p. 228-239.
110. Bulte, J.W.M., *Detecting Different Cell Populations Using Multispectral (19)F MRI*. Radiology, 2019. **291**(2): p. 358-359.
111. Krafft, M., A. Chittofrati, and J. Riess, *Emulsions and microemulsions with a fluorocarbon phase*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2003. **8**: p. 251-258.
112. Krämer, W., *Optimization of perfluorocarbon nanoemulsions for molecular imaging by 19F MRI*. Nanomedicine, 2014. **2014**.
113. Grapentin, C., *Development and in vitro as well as in vivo characterization of perfluorocarbon nanoemulsions for passive or site-specific targeting applications in 19F magnetic resonance imaging*. 2016.
114. Jacoby, C., et al., *Probing different perfluorocarbons for in vivo inflammation imaging by 19F MRI: image reconstruction, biological half-lives and sensitivity*. NMR Biomed, 2014. **27**(3): p. 261-71.
115. ATCC. J774A.1 - TIB-67™. Available from: <https://www.atcc.org/products/tib-67>.
116. Feito, M., et al., *Response of RAW 264.7 and J774A. 1 macrophages to particles and nanoparticles of a mesoporous bioactive glass: A comparative study*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2021. **208**: p. 112110.
117. Arroyo, A., et al., *NADPH oxidase-dependent oxidation and externalization of phosphatidylserine during apoptosis in Me2SO-differentiated HL-60 cells: role in phagocytic clearance*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(51): p. 49965-49975.
118. Bisso, P.W., et al., *Nanomaterial Interactions with Human Neutrophils*. ACS Biomater Sci Eng, 2018. **4**(12): p. 4255-4265.
119. He, Q., et al., *Endocytosis of a functionally enhanced GFP-tagged transferrin receptor in CHO cells*. PloS one, 2015. **10**(3): p. e0122452.
120. Zhou, C., et al., *Nanomaterial endocytosis: Estimation of particles per cell by magnetic measurement*. IEEE Magnetism Letters, 2018. **9**: p. 1-5.



121. Rapoport, N.Y., et al., *Micellar delivery of doxorubicin and its paramagnetic analog, ruboxyl, to HL-60 cells: effect of micelle structure and ultrasound on the intracellular drug uptake*. *Journal of Controlled Release*, 1999. **58**(2): p. 153-162.
122. Anselmo, A.C., et al., *Monocyte-mediated delivery of polymeric backpacks to inflamed tissues: a generalized strategy to deliver drugs to treat inflammation*. *Journal of Controlled Release*, 2015. **199**: p. 29-36.
123. Al-Obaidy, R., et al., *Targeted delivery of paclitaxel drug using polymer-coated magnetic nanoparticles for fibrosarcoma therapy: in vitro and in vivo studies*. *Scientific Reports*, 2023. **13**(1): p. 3180.
124. Kaiser, T.K., et al., *Highly selective organ distribution and cellular uptake of inorganic-organic hybrid nanoparticles customized for the targeted delivery of glucocorticoids*. *Journal of Controlled Release*, 2020. **319**: p. 360-370.
125. Goldman, R., *Effect of retinoic acid on the proliferation and phagocytic capability of murine macrophage-like cell lines*. *Journal of cellular physiology*, 1984. **120**(1): p. 91-102.
126. Lowe, K.C., *Engineering blood: synthetic substitutes from fluorinated compounds*. *Tissue engineering*, 2003. **9**(3): p. 389-399.
127. Behm, P., *Darstellung pulmonaler Inflammation mittels der Perfluorcarbone PFD, PFOB sowie F-44E in der 19F-MR-Bildgebung: Vergleich der Sensitivitäten sowie der kinetischen Profile im Mäusemodell*. 2016.
128. Chirizzi, C., et al., *Multicolor 19F-MRI for in vivo imaging of immune cells activity in a model of multiple sclerosis*. *MULTIPLE SCLEROSIS*, 2018. **24**: p. 178-179.
129. Darçot, E., et al., *Towards Quantification of Inflammation in Atherosclerotic Plaque in the Clinic—Characterization and Optimization of Fluorine-19 MRI in Mice at 3 T*. *Scientific reports*, 2019. **9**(1): p. 17488.
130. Nienhaus, F., et al., *Quantitative assessment of angioplasty-induced vascular inflammation with 19F cardiovascular magnetic resonance imaging*. *Journal of cardiovascular magnetic resonance*, 2023. **25**(1): p. 54.
131. Rothe, M., et al., *In vivo 19 F MR inflammation imaging after myocardial infarction in a large animal model at 3 T*. *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine*, 2019. **32**: p. 5-13.
132. Patel, S.K., J. Williams, and J.M. Janjic, *Cell labeling for 19F MRI: new and improved approach to perfluorocarbon nanoemulsion design*. *Biosensors*, 2013. **3**(3): p. 341-359.
133. Badran, M., *FORMULATION AND IN VITRO EVALUATION OF FLUFENAMIC ACID LOADED DEFORMABLE LIPOSOMES FOR IMPROVED SKIN DELIVERY*. *Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures (DJNB)*, 2014. **9**(1).
134. Danaei, M., et al., *Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems*. *Pharmaceutics*, 2018. **10**(2).
135. Koroleva, M., T. Nagovitsina, and E. Yurtov, *Nanoemulsions stabilized by non-ionic surfactants: stability and degradation mechanisms*. *Phys Chem Chem Phys*, 2018. **20**(15): p. 10369-10377.
136. Voorhees, P.W., *The theory of Ostwald ripening*. *Journal of Statistical Physics*, 1985. **38**: p. 231-252.
137. Tadros, T., *Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions*. *Advances in colloid and interface science*, 2004. **108**: p. 227-258.
138. Tadros, T.F. *Emulsionen*. 2023, Berlin, Boston: De Gruyter.
139. Midekessa, G., et al., *Zeta potential of extracellular vesicles: toward understanding the attributes that determine colloidal stability*. *ACS omega*, 2020. **5**(27): p. 16701-16710.

140. Deshiikan, S.R. and K.D. Papadopoulos, *London-van der Waals and EDL effects in the coalescence of oil drops: II. Ionic strength and pH effects*. Journal of colloid and interface science, 1995. **174**(2): p. 313-318.
141. Bhatt, N., et al., *Stability study of O/W emulsions using zeta potential*. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 2010. **2**(1): p. 512-527.
142. Stachurski, J. and M. Michałek, *The effect of the  $\zeta$  potential on the stability of a non-polar oil-in-water emulsion*. Journal of colloid and interface science, 1996. **184**(2): p. 433-436.
143. Zhou, Z., et al., *Two-stage oxygen delivery for enhanced radiotherapy by perfluorocarbon nanoparticles*. Theranostics, 2018. **8**(18): p. 4898.
144. Fernandes, D.A., et al., *Synthesis of stable multifunctional perfluorocarbon nanoemulsions for cancer therapy and imaging*. Langmuir, 2016. **32**(42): p. 10870-10880.
145. Shah, R., et al., *Optimisation and stability assessment of solid lipid nanoparticles using particle size and zeta potential*. Journal of physical science, 2014. **25**(1).
146. Karmakar, S., *Particle size distribution and zeta potential based on dynamic light scattering: Techniques to characterize stability and surface charge distribution of charged colloids*. Recent Trends Mater. Phys. Chem, 2019: p. 117-159.
147. Bhattacharjee, S., *DLS and zeta potential—what they are and what they are not?* Journal of controlled release, 2016. **235**: p. 337-351.
148. Jafari, S.M., et al., *Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification*. Food hydrocolloids, 2008. **22**(7): p. 1191-1202.
149. Urbina-Villalba, G., M. García-Sucre, and J.T. Mendoza, *Influence of polydispersity and thermal exchange on the flocculation rate of O/W emulsions*. Molecular Simulation, 2003. **29**(6-7): p. 393-404.
150. Darçot, E., et al., *A characterization of ABL-101 as a potential tracer for clinical fluorine-19 MRI*. NMR in Biomedicine, 2019. **33**.
151. Goette, M.J., et al., *Balanced UTE-SSFP for 19F MR imaging of complex spectra*. Magnetic Resonance in Medicine, 2015. **74**(2): p. 537-543.
152. Emsley, J., *Electric fields in fluorocyclohexanes and the magnitude of 19F chemical shifts*. Molecular Physics, 1965. **9**(4): p. 381-394.
153. Diehl, P., E. Fluck, and R. Kosfeld, *Basic principles and progress*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York, 1978. **5**: p. 110-129.
154. Gervits, L.L., et al., *High-Contrast and Fast-Removable 19F-MRI Labels with Perfluoro-tert-Butyl Substituents*. ChemMedChem, 2023. **18**(18): p. e202300239.
155. Lindner, P.E. and D.M. Lemal, *Perfluorinated Cyclic and Acyclic Keto–Enol Systems: A Remarkable Contrast*. Journal of the American Chemical Society, 1997. **119**(14): p. 3259-3266.
156. Weigert, F.J. and W. Mahler, *NMR parameters of the individual fluorines of the trifluoromethyl group*. Journal of the American Chemical Society, 1972. **94**(15): p. 5314-5318.
157. McMillan, D.E., P. Hazendonk, and P. Hodgkinson, *Interference of homonuclear decoupling and exchange in the solid-state NMR of perfluorocyclohexane*. Journal of Magnetic Resonance, 2003. **161**(2): p. 234-241.
158. Geroldinger, G., et al., *Techniques to study phagocytosis and uptake of Leishmania tarentolae by J774 macrophages*. Experimental parasitology, 2019. **197**: p. 57-64.
159. Hsu, M.J. and R.L. Juliano, *Interactions of liposomes with the reticuloendothelial system. II: Nonspecific and receptor-mediated uptake of liposomes by mouse peritoneal macrophages*. Biochim Biophys Acta, 1982. **720**(4): p. 411-9.

160. Schifter, C.-R., *Untersuchungen zum Einfluss der Größe von Liposomen auf deren Endozytose in verschiedenen Zelllinien*. 2008, Freiburg (Breisgau), Univ., Diss., 2008.
161. Kulkarni, S.A. and S.-S. Feng, *Effects of particle size and surface modification on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles for drug delivery*. *Pharmaceutical research*, 2013. **30**: p. 2512-2522.
162. Bouvain, P., et al., *Dissociation of 19 F and fluorescence signal upon cellular uptake of dual-contrast perfluorocarbon nanoemulsions*. *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine*, 2019. **32**: p. 133-145.
163. Waiczies, H., et al., *Perfluorocarbon particle size influences magnetic resonance signal and immunological properties of dendritic cells*. *PLoS one*, 2011. **6**(7): p. e21981.
164. Staal, A.H., et al., *In vivo clearance of 19F MRI imaging nanocarriers is strongly influenced by nanoparticle ultrastructure*. *Biomaterials*, 2020. **261**: p. 120307.
165. Mulder, W.J., et al., *Magnetic and fluorescent nanoparticles for multimodality imaging*. 2007.
166. Akers, W.J., et al., *Noninvasive photoacoustic and fluorescence sentinel lymph node identification using dye-loaded perfluorocarbon nanoparticles*. *ACS Nano*, 2011. **5**(1): p. 173-82.
167. Swider, E., et al., *Clinically-applicable perfluorocarbon-loaded nanoparticles for in vivo photoacoustic, 19F magnetic resonance and fluorescent imaging*. *Nanotheranostics*, 2018. **2**(3): p. 258.
168. Janjic, J.M., et al., *Perfluorocarbon nanoemulsions with fluorescent, colloidal and magnetic properties*. *Biomaterials*, 2014. **35**(18): p. 4958-68.
169. Janjic, J.M., et al., *Self-delivering nanoemulsions for dual fluorine-19 MRI and fluorescence detection*. *Journal of the American Chemical Society*, 2008. **130**(9): p. 2832-2841.
170. Temme, S., et al., *Synthetic cargo internalization receptor system for nanoparticle tracking of individual cell populations by fluorine magnetic resonance imaging*. *ACS nano*, 2018. **12**(11): p. 11178-11192.
171. Hsu, Y.-C., et al., *Reduced phagocytosis of colloidal carriers using soluble CD47*. *Pharmaceutical research*, 2003. **20**: p. 1539-1542.
172. Xu, M., et al., *Multifunctional theragnostic ultrasmall gold nanodot-encapsulated perfluorocarbon nanodroplets for laser-focused ultrasound sequence irradiation (LFSI)-based enhanced tumor ablation*. *Journal of Materials Chemistry B*, 2022. **10**(47): p. 9816-9829.
173. Ma, X., et al., *High intensity focused ultrasound-responsive and ultrastable cerasomal perfluorocarbon nanodroplets for alleviating tumor multidrug resistance and epithelial-mesenchymal transition*. *ACS nano*, 2020. **14**(11): p. 15904-15918.
174. Temme, S., et al., *19F magnetic resonance imaging of endogenous macrophages in inflammation*. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2012. **4**(3): p. 329-43.
175. Bae, P.K., et al., *Bimodal perfluorocarbon nanoemulsions for nasopharyngeal carcinoma targeting*. *Molecular imaging and biology*, 2013. **15**: p. 401-410.
176. Giraudeau, C., et al., *19F molecular MR imaging for detection of brain tumor angiogenesis: in vivo validation using targeted PFOB nanoparticles*. *Angiogenesis*, 2013. **16**: p. 171-179.
177. Kaneda, M.M., et al., *Perfluorocarbon nanoemulsions for quantitative molecular imaging and targeted therapeutics*. *Annals of biomedical engineering*, 2009. **37**: p. 1922-1933.

178. Börnert, P., W. Dreher, and W. Schneider, *19F chemical shift imaging in perfluorocarbons*. NMR Biomed, 1989. **2**(5-6): p. 278-83.
179. Hall, L.D., V. Rajanayagam, and S. Sukumar, *Chemical-shift-resolved tomography using four-dimensional FT imaging*. Journal of Magnetic Resonance (1969), 1985. **61**(1): p. 188-191.
180. Jacoby, C., et al., *Simultaneous 19F MR imaging at different resonance frequencies using multi chemical shift selective RARE*. 2014.
181. Chanput, W., J.J. Mes, and H.J. Wichers, *THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach*. Int Immunopharmacol, 2014. **23**(1): p. 37-45.
182. Auwerx, J., *The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation*. Experientia, 1991. **47**(1): p. 22-31.
183. Odero, M.D., et al., *Cytogenetic and molecular analysis of the acute monocytic leukemia cell line THP-1 with an MLL-AF9 translocation*. Genes Chromosomes Cancer, 2000. **29**(4): p. 333-8.
184. Gallauner, S., *THP-1 Zellen als Modell für Phagozytose*. 2009: na.
185. Fleck, R., S. Romero-Steiner, and M. Nahm, *Use of HL-60 cell line to measure opsonic capacity of pneumococcal antibodies*. Clinical and Vaccine Immunology, 2005. **12**(1): p. 19-27.
186. Jiang, Y., et al., *Multicolor 19F magnetic resonance imaging: A promising medical technique for in vivo visualization of multiple biological targets*. Fundamental Research, 2023. **3**(4): p. 529-533.
187. Bouvain, P., S. Temme, and U. Flögel, *Hot spot 19F magnetic resonance imaging of inflammation*. Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology, 2020. **12**(6): p. e1639.
188. Starke, L., et al., *First in vivo fluorine-19 magnetic resonance imaging of the multiple sclerosis drug siponimod*. Theranostics, 2023. **13**(4): p. 1217-1234.
189. Koshkina, O., et al., *Nanoparticles for "two color" (19)F magnetic resonance imaging: Towards combined imaging of biodistribution and degradation*. J Colloid Interface Sci, 2020. **565**: p. 278-287.
190. Bernarding, J., et al., *Low-cost LED-based Photo-CIDNP Enables Biocompatible Hyperpolarization of 19F for NMR and MRI at 7 T and 4.7 T*. ChemPhysChem, 2018. **19**(19): p. 2453-2456.
191. Zhukova, V., et al., *Fluorescently Labeled PLGA Nanoparticles for Visualization In Vitro and In Vivo: The Importance of Dye Properties*. Pharmaceutics, 2021. **13**(8).
192. Kobayashi, H., et al., *Multimodal nanoprobe for radionuclide and five-color near-infrared optical lymphatic imaging*. ACS nano, 2007. **1**(4): p. 258-264.
193. Baumgarth, N. and M. Roederer, *A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping*. Journal of immunological methods, 2000. **243**(1-2): p. 77-97.
194. Ijsselsteijn, M.E., et al., *A 40-marker panel for high dimensional characterization of cancer immune microenvironments by imaging mass cytometry*. Frontiers in immunology, 2019. **10**: p. 2534.
195. Baars, M.J., et al., *MATISSE: a method for improved single cell segmentation in imaging mass cytometry*. BMC biology, 2021. **19**(1): p. 1-10.
196. Chang, Q., et al., *Imaging mass cytometry*. Cytometry part A, 2017. **91**(2): p. 160-169.
197. Shin, S.-H., D.K. Kadayakkara, and J.W.M. Bulte, *Hot spot 19F MR imaging of inflammation predicts colitis-associated cancer*. Cancer Research, 2015. **75**(15\_Supplement): p. 1480-1480.

## **DANKSAGUNG**

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Jürgen Schrader und Prof. Dr. Ulrich Flögel für die Möglichkeit zur Nutzung der Labore, Gerätschaften und des Materials für meine Versuche bedanken. Ohne diese Gegebenheiten wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Mein außerordentlicher Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer PD Dr. Sebastian Temme, der mich zu Beginn herzlich ins Team aufnahm und es mir als Zahnmediziner ermöglicht hat, im Institut für Molekulare Kardiologie an der Heinrich-Heine-Universität zu promovieren. Vielen Dank für die zielführende fachliche Betreuung und die unermüdliche Geduld, die Kooperation, den Ansporn und die Ermutigungen bei den Experimenten.

Nachfolgend möchte ich mich bei allen weiteren Personen bedanken, sich für das Gelingen dieser Arbeit eingesetzt haben.

Mein großer Dank gilt Dr. Tuba Gueden-Silber für die Zusammenarbeit in weiten Teilen der Fluoreszenzspektroskopie und der PFC-Herstellung, die sonst nicht Teil dieser Arbeit geworden wären. Auch bei Zeynep-Büşra Tiren möchte ich ganz besonders bedanken, die mich sehr bei der Immunzell-Bildgebung und darüber hinaus unterstützt hat. Meiner Kollegin Shiwa Kadir bin ich ebenfalls zu großem Dank verpflichtet. Für die Unterstützung und unterhaltsame Zeit im Labor möchte ich Bodo Steckel, Pascal Bouvain, Tamara Straub und Patricia Kleimann danken, die mir bei meinen Versuchen stets eine große Hilfestellung waren und mit hilfreichen Ratschlägen zur Seite standen.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Kardiologie an der Heinrich-Heine-Universität möchte ich auf diesem Wege für die ertragreichen gemeinsamen Stunden im Labor meinen herzlichen Dank aussprechen.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Kommilitonen für die studienbegleitende Zeit und die fachliche Unterstützung bedanken. Und auch meinen Freunden vielen Dank für die Unternehmungen, die mir eine gute Abwechslung vom Alltag waren.

Ich möchte mich zuletzt auch bei meiner Familie bedanken, welche mich in verschiedenen Lebenslagen vielfältig unterstützt hat. Meinen lieben Eltern Alexander und Sofie Zielinski danke ich für den immerwährenden Rückhalt und die finanzielle Unterstützung während meines Studiums der Medizin und der Zahnmedizin. Außerdem bedanke ich mich herzlich bei meinen beiden Geschwistern Dominik und Laura, auf die ich mich immer verlassen konnte.