

**Aus dem Institut für Röntgendiagnostik
(Direktor Prof. Dr. med. E. J. Rummeny)
und dem Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung
(Direktor Prof. Dr. med. B. Gänsbacher)
der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München**

**vorgelegt über den Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie
(Vorstand Prof. Dr. med. vet. W. Schmahl)
des Institutes für Tierpathologie der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Nachweis Kontrastmittel-markierter humaner hämatopoetischer
Vorläuferzellen im Mausmodell mit der Magnetresonanztomographie**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München**

von
Sandra Obermann
aus Göttingen

München 2004

Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.2004

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Schmahl

2. Gutachter: Prof. Dr. Fred Sinowatz

1	Einleitung	4
2	Schrifttum	6
2.1	Physikalische Grundlagen	6
2.1.1	Beeinflussung der magnetresonanztomographischen Bildgebung durch Kontrastmittel	7
2.2	Indikationen für die Anwendung von Kontrastmitteln	9
2.3	Superparamagnetische (SPIO) und ultrakleine superparamagnetische (USPIO) Eisenoxid-Kontrastmittel	10
2.3.1	Allgemeines zu SPIO und USPIO	10
2.3.2	Ferumoxides (Endorem®)	12
2.3.3	Das Eisenoxidkontrastmittel P7228	14
2.4	T1-Kontrastmittel	17
2.4.1	Allgemeines zu T1-Kontrastmitteln	17
2.4.2	Gadophrin	18
2.5	Hämatopoetische Vorläuferzellen	21
2.5.1	Hämatopoese und Stammzelltransplantation	21
2.5.2	Methoden der Zellmarkierung und bildgebende Verfahren	23
2.6	Tiermodell Maus	26
3	Eigene Untersuchungen	27
3.1	Zielsetzung	27
3.2	Material und Methoden	27
3.2.1	Versuchstiere	27
3.2.2	Versuchsplan	28
3.2.2.1	Versuchsdurchführung	28
3.2.2.2	Anästhesie	30
3.2.2.2.1	Injektionsnarkose	30
3.2.3	Zellextraktion und Markierung der Zellen mit MR-Kontrastmitteln	32
3.2.3.1	Endorem	32
3.2.3.2	P7228	33
3.2.3.3	Gadophrin	33

3.2.3.4	Kolonie-Assay	33
3.2.3.5	Injektion	33
3.2.3.6	MR-Kontrastmittel	34
3.2.4	MRT-Gerät und Pulssequenzen	35
3.2.5	Optical Imager	35
3.2.6	Histologische Aufarbeitung	35
3.2.6.1	Präparation und Fixation der Gewebeproben	35
3.2.6.2.	Histologie	35
3.2.6.2.1.	Immunhistochemische Färbung	36
3.2.7	Auswertung der MR-Daten	37
3.2.8	Statistische Berechnung und Dokumentation	37
3.3	Ergebnisse	38
3.3.1.1	Kontrastmittelinjektion: Endorem und P7228	38
3.3.1.2	Zellinjektion der mit Endorem und P7228 markierten Zellen	40
3.3.1.2.1	Knochenmark	43
3.3.1.2.2	Milz	45
3.3.1.2.3	Leber	46
3.3.1.2.4	Histologie	48
3.3.1.2.5	Kolonie-Assay	50
3.3.1.3	Injektion von mit Gadophrin markierten Zellen	51
3.3.1.3.1	Knochenmark	51
3.3.1.3.2	Milz	53
3.3.1.3.3	Leber	55
3.3.1.3.4	Ergebnisse des Optical Imaging	59
4	Diskussion	60
5	Zusammenfassung	65
6	Summary	67
7	Literaturverzeichnis	69
8	Abbildungsverzeichnis	78
9	Tabellenverzeichnis	79
10	Abkürzungsverzeichnis	80
11	Lebenslauf	82
12	Danksagung	83

1 Einleitung

Die Grundlage für die Zell- und Organentwicklung, die Angiogenese und für immunologische Prozesse ist die Migration von Zellen im Organismus. Auch der Erfolg von Stammzell- bzw. Knochenmarktransplantationen bei Erkrankungen wie z.B. Leukosen, Plasmozytomen u.v.m. hängt unter anderem von der Zellwanderung ab. Die Möglichkeit, die Zellmigration nichtinvasiv in vivo darzustellen und zu verfolgen, würde das Verständnis dieser Prozesse verbessern, das Monitoring von Zelltransplantationen optimieren und neue Methoden der zellbasierten Pharmakotherapie und Immunotherapie eröffnen.

Die Stammzelltransplantation hat seit 1975 in der Hämatologie/Onkologie (z.B. Leukämien, Lymphome), bei Erkrankungen des Immunsystems und bei der Behandlung einiger solider Tumoren, die mit herkömmlichen Behandlungsmethoden nicht heilbar waren, stark an Bedeutung gewonnen. Weitere Anwendungsgebiete der Zellersatztherapie liegen in der Kardiologie (Myokard-Infarkt), Unfallchirurgie/Orthopädie (z.B. Knorpelersatz) und Neurologie (Schlaganfall, neurodegenerative Erkrankungen). Die Basis für diese vielfältigen Einsatzmöglichkeiten bildet die hohe Proliferations- und Differenzierungskapazität der Stammzellen.

Die Darstellung transplantierte Zellen in vivo ist bisher nicht möglich, es gibt zur Zeit erst wenige Arbeitsgruppen, die sich mit dieser Fragestellung beschäftigen. Vorhergehende Versuche, markierte Zellen mit der Magnetresonanztomographie aufzufinden, waren entweder limitiert durch eine zu geringe Sensitivität der MR-Geräte oder eine zu geringe Aufnahme der Kontrastmittel in die Zellen. Aus diesem Grund wurden MR-Geräte mit sehr hohen Feldstärken benutzt, bis zu 14 Tesla; die Feldstärke der MR-Geräte in klinischer Nutzung beträgt nur 1,5 Tesla. Außerdem sind die in vorhergehenden Studien genutzten MR-Kontrastmittel für die Anwendung am Menschen nicht zugelassen (WEISSLEDER et al. 1997, JOSEPHSON et al. 1999, LEWIN et al. 2000, BULTE et al. 2001).

Die Magnetresonanztomographie ermöglicht eine Bildgebung mit hoher anatomischer Auflösung und hohem Weichteilkontrast. Durch die Entwicklung neuer zellspezifischer MRT-Kontrastmittel können unter anderem auch Stammzellen markiert werden. Eisenoxid-Kontrastmittel werden hierbei bevorzugt verwendet, da sie in den Eisenstoffwechsel der Zellen aufgenommen werden und zu keinen toxischen oder funktionellen Beeinträchtigungen führen (DALDRUP-LINK et al. 2003, RUDELIUS et al. 2003). Im Gegensatz zu anderen neuen Verfahren der Zellmarkierung (z.B. Magnetodendrimere, superparamagnetische Parti-

kel konjugiert an HIV-Tat-Peptide, Rezeptor-Imaging (JOSEPHSON et al. 1999, BULTE et al. 2001) bieten Eisenoxide außerdem den Vorteil, dass sie in klinischen Magnetresonanztomographen bei 1,5 Tesla Feldstärke nachgewiesen werden können. Viele andere Techniken benötigen eine Feldstärke von 4 bis 14 Tesla, und diese MRT-Geräte sind bisher für die Untersuchung von Patienten nicht zugelassen.

Das Optical Imaging basiert auf der Darstellung von Absorption, Reflexion oder Biolumineszenz durch optische Systeme. Auf diese Weise kann die potentielle Fluoreszenz von Proteinen direkt sichtbar gemacht werden, ohne exogen Fluorochrome hinzufügen zu müssen. Es wird ein exzellentes Auflösungsvermögen erreicht, welches beispielsweise die Darstellung von Genexpressionen in vivo ermöglicht (MAHMOOD et al. 2002). Nachteilig ist die geringe räumliche Auflösung und die beschränkte Eindringtiefe.

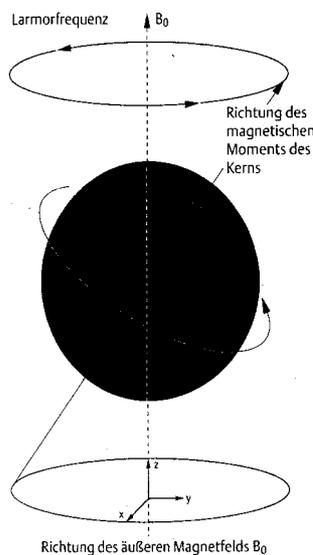
Ziel der vorliegenden Studie ist es, mit Kontrastmitteln (von denen eines zur Anwendung am Menschen bereits zugelassen ist und seit mehreren Jahren eingesetzt wird) markierte hämatopoetische Vorläuferzellen in vivo in der Maus mit der Magnetresonanztomographie (im klinischen Bereich bei 1,5 Tesla), die eine hohe anatomische Auflösung aber relativ geringe Sensitivität bietet, kombiniert mit der optischen Bildgebung, die eine hohe Sensitivität aber relativ geringe anatomische Auflösung bietet, darzustellen und ihre Migration und ihr Homing im Organismus zu verfolgen. Die Vor- und Nachteile dieser beiden bildgebenden Methoden sollen untersucht werden.

2 Schrifttum

2.1 Physikalische Grundlagen

Atome bestehen aus einem Protonen-Neutronenkern, der von einer Elektronenhülle umgeben ist. Bei Kernen mit ungerader Ordnungs- und Massenzahl kommt es durch die positive Protonenladung zur Ausbildung eines Eigendrehimpulses, dem Kernspin. Diese Rotation der Kernladung verursacht ein magnetisches Moment. Der Kern kann damit auch als magnetischer Dipol bzw. als Stabmagnet gesehen werden (THURN et al. 1998).

Wasserstoff, mit einem Proton im Kern, ist das im Körper am häufigsten vorkommende Element mit einem magnetischen Moment und ist aufgrund seines relativ großen magnetischen Momentes als Kernspinresonanzsignal leicht nachweisbar (LAUBENBERGER 1990).



Normalerweise sind die magnetischen Momente regellos ausgerichtet und neutralisieren sich gegenseitig.

Sobald ein äußeres Magnetfeld (B_0 -Feld) angelegt wird, richten sich die Kernmagneten parallel oder antiparallel zu dem externen Feld aus.

Dabei kreisen oder präzedieren die einzelnen Dipole mit einer bei gegebener Feldstärke charakteristischen Larmorfrequenz um die Magnetfeldlinien des Hauptfeldes (Z-Richtung).

Abb. 1: Präzession eines Atomkerns mit magnetischem Moment um die Achse eines äußeren Magnetfelds (nach Philips, aus: THURN et al. 1998)

Die Geschwindigkeit bzw. die Anzahl der Präzessionen um die Achse pro Sekunde, mit der die Protonen kreisen, bezeichnet man als Präzessionsfrequenz (LISSNER UND SEIDERER 1990, THURN et al. 1998).

Die antiparallelen Ausrichtungen weisen ein höheres Energieniveau auf. Die energieärmere, parallele Ausrichtung wird von den Kernen bevorzugt, so dass die Kerne parallel zum externen Magnetfeld, in Z-Richtung, überwiegen. Es entsteht ein messbares magnetisches Summationsmoment, da die magnetischen Kräfte sich in dieser Richtung addieren. Die magnetischen Kräfte der in entgegengesetzte Richtungen zeigenden Protonen heben sich gegenseitig auf, und zwar in allen anderen Richtungen (z.B. XY, siehe Abb.1). Die Magneti-

sierung entlang des externen Magnetfeldes bezeichnet man als Longitudinalmagnetisierung, die Magnetisierung quer zum externen Magnetfeld, in der XY-Ebene, als Transversal- oder Quermagnetisierung. Messbar ist lediglich die Transversalmagnetisierung (THURN et al. 1998).

Durch Einstrahlung von hochfrequenten elektromagnetischen Wellen definierter Amplitude und Dauer kann der Summenmagnetisierungsvektor in einem definierten Winkel ausgelenkt werden: die Längsmagnetisierung kippt teilweise in die XY-Ebene ("Anregung"). Der Anteil des magnetischen Summationsmoments, der in der XY-Achse liegt, nimmt nach Beendigung des Anregungspulses ab. Dieser Vorgang wird als Relaxation bezeichnet und wird durch zwei Zeitkonstanten charakterisiert, die gleichzeitig, aber unabhängig voneinander ablaufen (LAUBENBERGER 1990, LISSNER UND SEIDERER 1990).

Die Längs- oder Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 beschreibt die Zeitkonstante der Rückkehr der Z-Komponente des Summenmagnetisierungsvektors zum Ausgangswert. Die bei der Anregung aufgenommene Energie wird wieder abgegeben, wobei die Geschwindigkeit von der Beweglichkeit des angeregten Kernes innerhalb des Gitters, d. h. des Molekülverbandes, abhängt.

Die Quer- oder Spin-Spin-Relaxationszeit T_2 ist die Zeitkonstante des exponentiellen Abfalls des Magnetismus in XY-Richtung. Hier präzedieren die Spins zunächst synchron, phasenkohärent, in einem Winkel (Phase) in der XY-Ebene. Aufgrund von Wechselwirkungen der atomaren Dipole kommt es zunehmend zu Phasendifferenzen. Dadurch entsteht eine Reduktion des MR-Signals, da sich die Magnetvektoren gegenseitig aufheben, anstatt sich zu addieren. Zusätzlich wird diese Phasenverschiebung noch durch Inhomogenitäten des Magnetfeldes, verursacht durch das MR-Gerät und das untersuchte Gewebe, beschleunigt. Die Kombination dieser Dephasierungen verursacht einen beschleunigten Zerfall des Signals mit der Zeitkonstante T_2^* (LAUBENBERGER 1990, LISSNER und SEIDERER 1990, THURN et al. 1998).

2.2.1. Beeinflussung der Magnetresonanztomographischen Bildgebung durch Kontrastmittel

Die Bildkontraste in der MRT lassen sich einerseits auf gerätespezifische Parameter wie die Feldstärke, die Gradienten und die Sequenzen und andererseits auf gewebespezifische Parameter wie die Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 , die Spin-Spin-Relaxationszeit T_2 , die Protonendichte und die Flussgeschwindigkeit zurückführen (THURN et al. 1998).

Für die Kontrastverstärkung durch Kontrastmittel spielt nur die Beeinflussung der Relaxationszeiten der Protonen eine Rolle. Diese Beeinflussung bezeichnet man als indirekten Wirkmechanismus (RUMMENY et al. 2002).

Auf T1-gewichteten Bildern erkennbar, verstärken T1-MR-Kontrastmittel das Resonanzsignal aus dem Gewebe durch eine Verkürzung der T1-Relaxationszeiten. Im Gegensatz dazu verringern T2-Kontrastmittel das Signal durch eine Verkürzung der T2-Relaxationszeiten, sichtbar in T2-gewichteten Bildern. Dabei besteht eine komplexe Abhängigkeit zwischen Protonendichte, Protonenbindung und der Kontrastmittelkonzentration (THURN et al. 1998). Kontrastmittel, die die T1-Relaxationszeiten verkürzen, führen zu einer weiteren Zunahme des T1-Signals. Kontrastmittel, die die T2-Relaxationszeiten verkürzen, führen zu einer weiteren Abnahme des T2-Signals. Die Konzentration des Kontrastmittels im Gewebe beeinflusst zusätzlich das Signalverhalten. Bei relativ geringen Kontrastmittelkonzentrationen im Zielgewebe sind die Konzentrationen von T1-Kontrastmitteln proportional zum T1-Signal der Zielgewebe, die Konzentrationen der T2-Kontrastmittel dagegen umgekehrt proportional zum T2-Signal der Zielgewebe. Für höhere Konzentrationen der Kontrastmittel im Zielgewebe ergibt sich eine logarithmische bzw. umgekehrte Beziehung der Konzentration zum erhaltenen Signal (HERMANN 1998).

Substanzen, die als Kontrastmittel geeignet sind, müssen zur Beeinflussung der Relaxation von Protonen ungepaarte Elektronen aufweisen, wobei jedes dieser ungepaarten Elektronen in einem separaten Elektronenorbital (Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Elektrons) platziert ist. Alle diese ungepaarten Elektronen weisen einen parallelen Spin auf, der sich zu einem Netto-Elektronenspin addiert. Dies bezeichnet man als Paramagnetismus. Durch das entstehende magnetische Moment der ungepaarten Elektronen entsteht ein starkes, fluktuierendes magnetisches Wechselfeld neben den Protonen, das deren Relaxation stimuliert: Die mit der Präzessionsfrequenz von Protonen übereinstimmende Frequenzkomponente verkürzt die T1-Relaxationszeit. Die Verkürzung der T2-Relaxationszeit ist eine Folge von Schwankungen des lokalen Magnetfeldes und des daraus resultierenden Verlustes an Phasenkohärenz (REISER und SEMMLER 1997, RUMMENY et al. 2002).

Die Relaxivitäten R_1 und R_2 (mmol s^{-1}) sind ein Maß für die Wirksamkeit eines Kontrastmittels und unabhängig von dessen Konzentration (RUMMENY et al. 2002).

Tab. 1: Magnetisches Moment und Anzahl ungepaarter Elektronen von Metallionen (RUMMENY et al. 2002)

Metallionen	Anzahl ungepaarter Elektronen	Magnetisches Moment (Bohr-Magnetom)
Übergangsmetalle:		
Cu ²⁺	1	1,7-2,2
Ni ²⁺	2	2,8-4,0
Cr ³⁺	3	3,8
Fe ²⁺	4	5,1-5,5
Mn ²⁺	5	5,9
Fe ³⁺	5	5,9
Lathaniden :		
Gd ³⁺	7	8,0

In einem externen magnetischen Feld wie in einem Magnetresonanztomographen führt die Anordnung paramagnetischer Atome der superparamagnetischen Kontrastmittel (Eisenoxide) in einem Kristallgitter zu einer Verstärkung des magnetischen Moments um den Faktor 10 bis 1000. Bei diesen Substanzen wird die parallele Orientierung des Spins nach der Entfernung aus einem äußeren magnetischen Feld durch die Brown-Molekularbewegung wieder aufgehoben und es resultiert keine Netto-Magnetisierung (RUMMENY et al. 2002).

2.2 Indikationen für die Anwendung von Kontrastmitteln

Kontrastmittel gelten im Sinne des Arzneimittelgesetzes als Medikamente und müssen viele Anforderungen wie organspezifische Anreicherung, gute Verträglichkeit, leichte und zumutbare Applikation, Stoffwechsellinaktivität, schnelle Ausscheidung und ökonomische Verordnungsweise erfüllen (KAUFFMANN et al. 1996).

Durch die Entwicklung von MR-Kontrastmitteln konnte die diagnostische Aussagekraft verbessert und das Indikationsspektrum der MRT erweitert werden. Durch die parallele Entwicklung neuer, schneller MR-Techniken und einer Vielzahl von Kontrastmitteln erfolgte eine rasante Weiterentwicklung und die Erschließung neuer Anwendungsgebiete der MRT. Zukünftig sind Fortschritte z.B. in der Koronarangiographie und in der Darstellung der Tumorangienese zu erwarten (RUMMENY et al. 2002).

Klinische Anwendungen von Kontrastmitteln in der MRT haben wesentliche Vorteile der kontrastverstärkenden Untersuchungen gegenüber Nativuntersuchungen gezeigt. Dazu gehören eine verbesserte Sensitivität, bessere Detailerkennbarkeit und die Möglichkeit nichtinvasiver funktioneller Untersuchungen (RUMMENY et al. 2002).

Auch können bei der Verwendung von Kontrastmitteln Aussagen über Perfusions-eigenschaften von Organen und die Kapillarpermeabilität z.B. bei Störungen der Blut-Hirn-Schranke und der Knochenmark-Blut-Schranke gemacht werden (TAVASSOLI und YOFFEY 1985).

Die Klassifizierung der Kontrastmittel erfolgt anhand der Bioverteilung. Von der Selektivität der Bioverteilung und der absoluten Konzentration des Kontrastmittels im Zielgewebe hängt der diagnostische Wert einer Kontrastmittelunterstützten MRT ab (RUMMENY et al. 2002).

2.3 Superparamagnetische (SPIO) und ultrakleine superparamagnetische (USPIO) Eisenoxid-Kontrastmittel

2.3.1 Allgemeines zu SPIO und USPIO

Eisenoxid-Kontrastmittel enthalten Magnetite oder Ferrite. Sie bestehen aus einem Kristallkern mit multiplen Eisenoxid-Aggregaten, der von einer stabilisierenden Hülle aus Dextran- oder Carboxydextran-Molekülen umgeben ist (REISER und SEMMLER 1997). Dieses „coating“ verbessert die Verträglichkeit und verhindert eine In-vivo-Aggregation (RUMMENY et al. 2002). Die Größe der Partikel variiert von 20 bis 120 nm. Zu den Anwendungsgebieten zählen die Leber- und Lymphknotenuntersuchung durch die MRT, und neuerdings auch die MRT des Knochenmarkes, die MR-Angiographie, Lymphozyten-Marking und Rezeptor-Imaging (EARLS und BLUEMKE 1999). SPIO und USPIO besitzen paramagnetische Eigenschaften, d.h. sie entwickeln in einem äußeren Magnetfeld selbst schwach magnetische Eigenschaften. Bei Anreicherung im Gewebe führen sie zu einer Abschwächung bzw. Auslöschung des MRT-Signals, das Gewebe stellt sich schwarz dar (VOGL et al. 1999). Die Eisenoxid-Kontrastmittel zeigen primär einen T2-Effekt, der zu einer Signalabschwächung auf T2-gewichteten Bildern führt (WEISSLEDER et al. 1990). Hierbei ist die T2-Relaxationszeit umgekehrt proportional zum Partikeldurchmesser und proportional zur Partikelanzahl. Aus diesem Grund besitzen die SPIO einen deutlich stärkeren T2-Effekt als die USPIO (CHAMBON et al. 1993). Superparamagnetische Kontrastmittel gelten als „Störfelder“, die die Homogenität des von außen angelegten Feldes B_0 beeinflussen. Verantwortlich

dafür sind lokale Effekte, die aufgrund weiterreichender Wechselwirkungen durch das große magnetische Moment Feldinhomogenitäten erzeugen (REISER und SEMMLER 1997). In T2-gewichteten Bildern ist dies erkennbar durch einen konsekutiven Signalabfall des entsprechenden Zielgewebes, also einer negativen SI (REISER und SEMMLER 1997, WEISSLEDER et al. 1990). Aus diesem Grund bezeichnet man superparamagnetische Kontrastmittel auch als negative Kontrastmittel.

Auf T1-gewichteten Bildern wird die T1-Relaxationszeit von Blut und Gewebe durch die SPIO selektiv verkürzt. Daraus resultiert eine Erhöhung der SI auf T1-gewichteten Bildern. Die T1-Relaxivität der superparamagnetischen Kontrastmittel ist um den Faktor zwei bis sechs schwächer als ihre T2-Relaxivität. Der T1-Effekt der USPIO ist dagegen deutlich größer als der der SPIO (SMITH et al. 1989, MOORE und DAWSON 1990, DALDRUP-LINK et al. 2000).

Die Aufnahme in die Zellen ist für die einzelnen Kontrastmittel zellspezifisch und erfolgt auf unterschiedliche Weise, sie ist bei den jeweiligen Kontrastmitteln beschrieben. Eisenoxid-Kontrastmittel werden von den Organen des retikuloendothelialen System wie Leber, Milz, Lymphknoten und Knochenmark spezifisch aufgenommen und unterliegen dem physiologischen Eisenmetabolismus (WEISSLEDER et al. 1990, JUNG 1995, REISER und SEMMLER 1997, VAN DE BERG et al. 1999). Bedingt durch die unterschiedliche Partikelgröße werden SPIO überwiegend von den RES-Zellen der Leber und in geringerem Maße von denen der Milz aufgenommen, USPIO reichern sich dagegen vergleichsweise stärker in den Lymphknoten an (REISER und SEMMLER 1997).

Die Eisenoxide werden in den physiologischen Eisenstoffwechsel eingeschleust, also in das Hämoglobin eingebaut. Dort zeigen sie auch das gleiche Eliminationsverhalten wie endogenes Eisen: eine sehr langsame Ausscheidung. Beim Menschen liegt die Eisenausscheidung bei ca. 1 mg pro Tag, bei menstruierenden Frauen verdoppelt sich diese Menge annähernd (PETERSEIN et al. 1996). Die Eisenpartikel verbleiben mehrere Wochen im Organismus und werden dann überwiegend über die Fäces ausgeschieden. Die Urinausscheidung liegt bei < 1%. Nach 84 Tagen sind 16-21% des injizierten Eisens wieder ausgeschieden (PETERSEIN et al. 1996).

Die Eisenoxide haben ein Molekulargewicht von > 1 kDa. Die Größe ist mit der von Plasmaproteinen vergleichbar. Physiologisch verhalten sich diese Kontrastmittel daher als

Makromoleküle. Ihr Verteilungsvolumen entspricht annähernd dem Blutvolumen von Geweben (RUMMENY et al. 2002).

2.3.2 Ferumoxides (Endorem®)

Das superparamagnetische Eisenoxidkontrastmittel Endorem® (Laboratoire Guerbet, Aulnay-sous-Bois, Frankreich) besteht aus Magnetite $\text{Fe}^2\text{O}^3/\text{Fe}^3\text{O}_4$ -Partikeln ($\text{Fe}_{24}\text{O}_{32}$). Synonyme sind advanced magnetic imaging (AMI-25), der Name während der klinischen Entwicklung, und Ferridex®, der Handelsname in den USA, über die Firma Berlex.

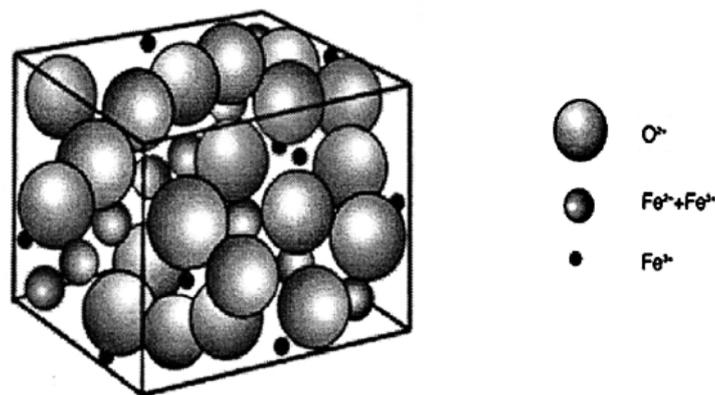


Abbildung 2: Kristallstruktur von Endorem® ($\text{Fe}_{24}\text{O}_{32}$), (LABORATOIRE GUERBET 1995)

Die mit Dextran ummantelten Eisenoxid-Partikel weisen einen Durchmesser von 80 bis 120 nm auf (LABORATOIRE GUERBET 1995, VAN DE BERG et al. 1999). Die Ladung der Hülle ist neutral. Die Osmolalität beträgt 340 mOsm/kg und der pH-Wert liegt bei 6,0 bis 8,0.

Ferumoxides gehört zu den zellspezifischen Kontrastmitteln, die sich im RES von Leber, Milz, Lymphknoten und Knochenmark anreichern. Die Aufnahme in die Zelle erfolgt durch Phagozytose. In einem gesunden Organismus werden ca. 80% der Injektionsdosis von den Kupfferschen Sternzellen der Leber, 6% von den Makrophagen der Milz und nur ein geringer Teil vom Knochenmark aufgenommen (WEISSLEDER 1994, VAN DE BERG et al. 1999). Mit dieser geringen Menge wird bereits eine verbesserte Detektion von Knochenmark-Tumoren erreicht (SAINI et al. 1987, BELLIN et al. 1994, VAN DE BERG et al. 1999).

Bei Leberkranken kann sich die Kontrastmittel-Aufnahme der Milz gegenüber der Leber verstärken, und die Leber kann die Kontrastmittel unregelmäßig aufnehmen (EARLS und BLUEMKE 1999). Da sich in malignen Lebertumoren keine RES-Zellen befinden, nehmen diese das Kontrastmittel nicht auf. Dadurch erscheint das gesunde Lebergewebe nach Kontrastmittelinjektion auf T2-gewichteten MR-Bildern signalarm, und das Tumorgewebe meist signalreich (REISER und SEMMLER 1997).

Das seit 1994 zugelassene Endorem® wurde bisher primär für die Diagnostik von fokalen Leberläsionen eingesetzt (BELLIN et al. 1994, WEISSLEDER 1994). Klinische Untersuchungen zeigen, dass durch den Einsatz von Endorem® die Sensitivität der MRT für die Detektion von Lebertumoren gegenüber der nativen MRT gesteigert werden konnte (VOGL et al. 1994).

Seit 1988 wurde Ferumoxides im Rahmen zahlreicher Studien erforscht und stellt das erste Beispiel für injizierbare Nanopartikel dar (LABORATOIRE GUERBET 1995).

Endorem® ist eine injizierbare Suspension von schwarzer bis braun-rötlicher Farbe und liegt als Infusionslösungskonzentrat vor. Eine 8 ml-Ampulle enthält 120 bis 133 mg paramagnetisches Eisen (II, III)-oxid. Dies entspricht 89,6 mg Eisen. Zusätzliche Bestandteile sind Dextran 10, wasserfreie Citronensäure, Mannitol und Wasser für Injektionszwecke. Eine Dosis Endorem® sollte mit 100 ml 5%iger Glucoselösung als Infusion über 30 Minuten gegeben werden. Die Bluthalbwertszeit liegt beim Menschen bei ca. 20 Min. (VAN DE BERG et al. 1999). Endorem® ist bei sachgemäßer Anwendung gut verträglich und hat wenig Nebenwirkungen. In der klinischen Erprobung eines ersten Präparates traten zum Teil folgende unerwünschte Wirkungen auf: Schmerzen im Lumbalbereich (4,8 %), Thoraxschmerzen (1,5 %), Flush (1 %), Hitzegefühl (1 %), Dyspnoe (0,7 %), leichte Blutdruckveränderungen (0,7 %), Kopfschmerzen (0,6 %) und Übelkeit (0,6 %) (LANIADO und CHACHUAT 1995). Durch Austausch des Lösungsmittels und Applikation geringerer Dosierungen konnten Überempfindlichkeitsreaktionen reduziert werden. Die Dosierung beträgt 0,84 mg (10 bis 15 µmol) Eisen/kg Körpergewicht (LABORATOIRE GUERBET 1995).

Tabelle 2: Zusammensetzung und physikalische Eigenschaften von Endorem®: a) pro Ampulle (8ml) und b) pro 100 ml (LABORATOIRE GUERBET 1995)

Wirkstoff	Menge	
	a) spezifisch	b) zentesimal
Eisenoxid	q.s. 89,6 mg Eisen	q.s. 1,12 g Eisen
Andere Bestandteile		
Dextran	60,8 mg	0,76 g
Citrat	2,7 mg	0,034 g
Mannitol	490,4 mg	6,13 g
Wasser z Injektion	q.s. 8 ml	q.s. 100 ml

Eigenschaften	Parameter	
Osmolalität	340 mOsm/kg	
Viskosität	1,3 mPa.s (20°C)	
PH	6,0-8,0	

2.3.3 Das Eisenoxid-Kontrastmittel P7228

Das ultrakleine superparamagnetische Eisenoxid-Kontrastmittel P7228 (Laboratoire Guerbet, Aulnay-sous-Bois, Frankreich) ist ein USPIO der zweiten Generation und für die klinische Anwendung noch nicht zugelassen. P7228 ist identisch aufgebaut wie Ferumoxtran (Synonyme AMI 227, Combidex®), das als Sinerem™ (Laboratoire Guerbet) in Kürze zugelassen werden soll. Im Unterschied zu P7228 besitzt Sinerem™ jedoch eine neutral geladene Dextran-Umhüllung (LABORATOIRE GUERBET 2001).

P7228 besteht aus einem Kristallkern mit multiplen Eisenoxid-Aggregaten, die von einer anionischen Carboxydextranderivat-Hülle ummantelt sind. Die Eisenoxide haben eine Größe von 20 bis 40 nm. Aufgrund der negativen Ladung besteht die Möglichkeit, die Partikel über kationische Liposomen in die Zelle einzubringen. Dies ermöglicht grundsätzlich ein Labeln aller Zellen, auch solcher, die nicht zur Phagozytose befähigt sind, wie z.B. CD34+ hämatopoetische Stammzellen (RUDELIUS et al. 2003, DALDRUP-LINK et al. 2003).

Liposomen sind Transfektionsagentien, die häufig zur Lipofektion embryonaler und neuronaler Zelllinien Verwendung finden. Sie werden u.a. auch in der Gentherapie eingesetzt, um rekombinante Gene in somatische Zellen einzubringen und nach Integration in das Genom der Wirtszelle zur Expression zu bringen (MALONE et al. 1989).

Lipofectin® Reagent (Fa. Invitrogen Corporation, Life Technologies, Carlsbad, USA) ist eine 1:1 (w/w) Liposomen-Formulierung der kationischen Lipide N-[1-(2,3dioleoyloxy)propyl]-n,n,n-trimethyl-ammonium chloride (DOTMA) und dioleoyl phosphatidylethanolamine (DOPE), in Membran gefiltertem Wasser gelöst. Lipofectin® Reagent interagiert spontan mit DNS und formt einen DNS-Liposomen-Komplex. Durch die effiziente Aufnahme der DNS und die darauffolgende Expression erfolgt die Fusion dieses Komplexes mit der Zelle (LIFE TECHNOLOGIES 2002).

Über modifizierte Transfektions-Protokolle hat sich Lipofectin für die effiziente Aufnahme von Kontrastmitteln in Stammzellen ebenfalls als geeignete Substanz erwiesen. Die positiv geladenen Liposomen fusionieren mit den von einer negativ geladenen Hülle umschlossenen Eisenoxid-Partikeln. Die Effizienz der Aufnahme der Kontrastmittel in die Zellen liegt für Lipofectin bei 1,8 mg Fe/1,0E+06 Zellen. Die Fähigkeit zur Proliferation und Differenzierung wird durch das Markieren der Zellen nicht beeinträchtigt (DALDRUP-LINK et al. 2003, RUDELIUS et al. 2003).

Die USPIO sind erheblich kleiner als die SPIO. Nach intravenöser Applikation werden sie daher langsamer als die größeren SPIOs vom RES aufgenommen und haben eine deutlich längere Bluthalbwertszeit (24 Stunden) im menschlichen Organismus (DALDRUP et al. 1999). Aufgrund der längeren Halbwertszeit und der dadurch verlängerten intravasalen Verweildauer sind die USPIO auch als Blutpool-Kontrastmittel geeignet. Sinerem™ kann noch nach Tagen in Leber, Milz, Lymphknoten und im Knochenmark nachgewiesen werden (LABORATOIRE GUERBET 2001).

Die Eisenoxid-Partikel werden enzymatisch in den Lysosomen abgebaut, die Abbauprodukte werden im physiologischen Eisenstoffwechsel des Organismus weiterverwendet (RUMMENY et al. 2002).

P7228 liegt in flüssiger Form vor. In einem ml sind 30 mg Eisen enthalten, die Dosierung beim Menschen beträgt 2,6 mg Eisen/kg Körpergewicht, das entspricht 0,086 ml.

Tab. 3 Nebenwirkungen von Sinerem™ (LABORATOIRE GUERBET 2001)

Bauchschmerzen	3,10%
Rückenschmerzen	3,70%
Kopfschmerzen	4,20%
Übelkeit	2,40%
Juckreiz	2,80%
Urtikaria	3,20%
Flush	3,30%
Atembeschwerden	1,60%

USPIO befinden sich derzeit in klinischer Prüfung für die Verwendung in der Diagnostik der Erkrankungen von Leber, Milz, Lymphknoten, Knochenmark sowie in Perfusionsstudien von Myocard und ZNS (SMALL et al. 1993, BENDERBOUS und BONNEMAIN 1995, SAINI et al. 1995, MERGO et al. 1996). P7228 soll in der klinischen Anwendung vor allem der Detektion metastatischer Lymphknoten dienen.

Die Aufnahme in das Knochenmark beträgt etwa 5% der injizierten Dosis. Diese geringe Menge erzeugt bereits MRT-detektierbare Veränderungen (SENETERRE et al. 1991). Sinerem™ verbleibt lang genug im Blutstrom, um in den Lymphknoten zu akkumulieren (EARLS und BLUEMKE 1999). In klinischen Studien zeigte Ferumoxtran nach intravenöser Applikation einen Signalabfall in normalen Lymphknoten auf T2-gewichteten Aufnahmen, während Tumordinfiltrate und entzündliche Veränderungen der Lymphknoten das Kontrastmittel nicht aufnehmen (GUIMARAES et al. 1993). Es ist daher ein geeignetes Kontrastmittel für onkologische Fragestellungen (REISER und SEMMLER 1997).

Sehr kleine Eisenoxidpartikel (< 30 nm) haben einen ausgeprägten T1-Effekt (RUMMENY et al. 2002). Auf T1-gewichteten Bildern entstehen effektiv positive Kontraste, auf T2-gewichteten Bildern negative Kontraste (DALDRUP et al. 1999).

Ferumoxtran führt zu einem Signalverlust des Knochenmarkes auf T2-gewichteten Pulssequenzen. Zudem zeigt Sinerem™ eine hohe R_1 -Relaxivität. Daher kommt es zu einem signifikanten Signalanstieg des Blut-Poolen auf T1-gewichteten Bildern (WEISSLEDER et al. 1990, EARLS und BLUEMKE 1999).

Die USPIO können als T1-Blut-Pool-Kontrastmittel eingesetzt werden. Diesen Effekt kann man für die Darstellung der Knochenmarkperfusion nutzen (RUMMENY et al. 2002).

In ersten klinischen Studien (PETERSEIN et al. 1996) wurden gesunde Probanden und Patienten mit Ferumoxtran untersucht.

2.4 T1-Kontrastmittel

2.4.1 Allgemeines zu T1-Kontrastmitteln

MR-Kontrastmittel, die eine Verkürzung der T1-Relaxationszeit bewirken, nennt man T1-Kontrastmittel. Sie verstärken die Signalintensität von Blut und Geweben auf T1-gewichteten Bildern. T1-Kontrastmittel sind um so wirksamer, je länger die T1-Relaxationszeiten ohne Kontrastmittel sind. Klassische Vertreter der T1-Kontrastmittel sind Gadolinium-haltige Kontrastmittel wie z.B. Gadolinium-DTPA (Diethylentriaminpentaacetat, Magnevist®, Fa. Schering, Berlin), das ein Molekulargewicht von < 1000 Dalton hat.

Die in freier Form hohe Toxizität des Gadoliniums ist durch eine Einbindung in den DTPA-Komplex vollständig eliminiert (LAUBENBERGER 1990).

Die intravenös applizierten niedermolekularen, hydrophilen Gd-Chelate, die nicht an Plasmaproteine binden, werden aufgrund des unspezifischen Anreicherungsverhaltens als unspezifische Kontrastmittel bezeichnet. Aufgrund ihrer Verteilung im extrazellulären Raum nennt man sie auch extrazelluläre Kontrastmittel. Das Verteilungsvolumen entspricht ungefähr dem Extrazellulärvolumen (RUMMENY et al. 2002).

Durch sieben ungepaarte Elektronen besitzen sie ein starkes magnetisches Moment und damit einen maximalen T1-Relaxationszeitverkürzungseffekt (BRASCH et al. 1984). Sie gelangen aus dem intravaskulären Raum bereits während des First Pass in das Interstitium, da die Blut-Körper-Schranke fehlt, und reichern sich unspezifisch in allen Organen außerhalb des ZNS an. Die Einstellung eines Gleichgewichtes zwischen Intravaskulärraum und Interstitium erfolgt schnell, das Kontrastmittel wird über glomeruläre Filtration über die Nieren ausgeschieden. Die biologische Halbwertszeit z.B. des Gd-DTPA beträgt nur 20 Minuten (LISSNER und SEIDERER 1990, BRASCH 1992). Gebunden an Lipofectin gelang es, Gd-DTPA in Stammzellen einzubringen (RUDELIUS et al. 2003).

2.4.2 Gadophrin

Gadophrin-2 ist ein T1-Kontrastmittel auf Porphyrin-Basis (Schering AG, Berlin). Es erzeugt auf T1-gewichteten MR-Bildern ein stark positives Signal und fluoresziert. Daher kann es zusätzlich fluoreszenzmikroskopisch und mit einer High Resolution Digital B/W CCD Camera (Hamamatsu ORCA II ER) durch das Optical Imaging bei 499 nm nachgewiesen werden. Es sollte vor Licht geschützt bei 4° C aufbewahrt werden.

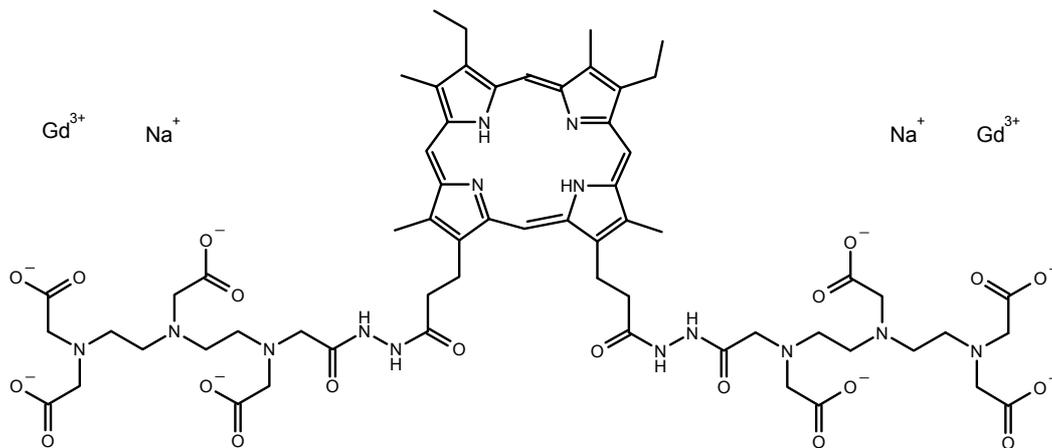


Abb. 3 Gadophrin-2 (SCHERING 1997)

Gadophrin-2 besteht aus einem Porphyrinring mit zwei kovalent gebundenen Gd-DTPA-Anteilen. Das Molekulargewicht beträgt 1697,25 Dalton, die Blut-Plasma-Halbwertszeit liegt bei der Maus bei etwa 120 Minuten. Gadophrin-2 liegt in flüssiger Form vor, die Lösung enthält 100 mmol Gadophrin/Liter (SCHERING 1997).

Die Dosierung beträgt 25 bis 50 μmol Gadophrin pro kg Körpergewicht i.v., die Ausscheidung erfolgt zu über 90 % renal. Die akute Toleranz bei der Maus bei intravenöser Gabe liegt bei über 5 mmol/kg. Die Plasmaproteinbindung beträgt ca. 83 %. Die Relaxivität pro mol Gadolinium R1 in Plasma liegt bei $19,8 \pm 0,1 \text{ l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, R2 beträgt $30,0 \pm 1,0 \text{ l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, jeweils bei 37°C und 20 MHz. Das Verteilungsvolumen beträgt $0,12\text{-}0,14 \text{ l} \cdot \text{kg}^{-1}$ (SCHERING 1997).

Gadophrin-2 hat eine hohe Affinität zu nekrotischem Gewebe. Dies wurde bereits in mehreren Studien untersucht, bei Herz- und Leberinfarkten und nekrotisierendem Tumorgewebe. Im MRT geben diese Nekrosen durch Gadophrin-2 ein verstärktes Signal (HOFMANN et al. 1999, PISLARU et al. 1999, NI et al. 2001, BARKHAUSEN et al. 2002).

Aufgrund der fluoreszierenden Eigenschaften von Gadophrin kann es durch das Optical Imaging mit digital verstärkter Fluoreszenzmikroskopie im lebenden Organismus visualisiert werden.

Die High Resolution Digital B/W CCD Kamera (Hamamatsu ORCA II ER) ist eine Digitalvideokamera mit sehr niedrigem Rauschen und Kühlung für echte On-Chip-Integration mit erhöhter Empfindlichkeit im Spektralbereich > 400 nm. Spezial-Filter ermöglichen die Darstellung von Gadophrin-2, 25 nm Exzitation (500 nm, Eosin, Sp. Gold), 40 nm Emission bandpass filter (617 nm, TRITC, Hamamatsu photonics). Der Porphyrinring des Gadophrin erzeugt die fluoreszierenden Eigenschaften, wobei die Exzitation bei 499 nm, das Emmissionsmaximum bei 617 nm liegt.

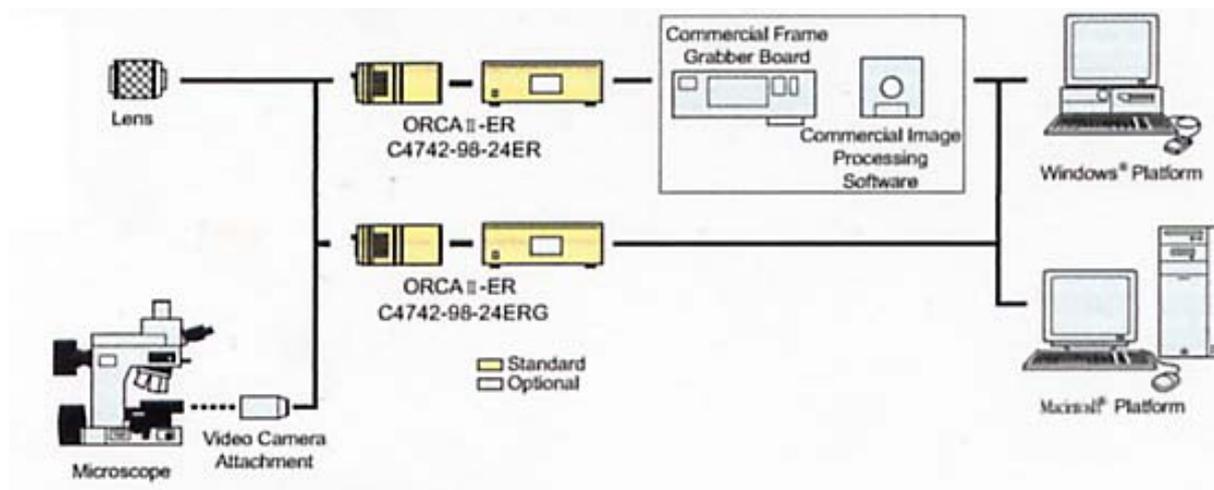


Abb. 4 Systemkonfiguration Digital B/W CCD Kamera (HAMAMATSU PHOTONICS 2001)

Die Digitalkamera besitzt eine hohe Übertragungsrate, extrem niedriges Ausleserauschen von 3 Elektronen pro Pixel und zwei Auslesemodi. Sie ist geeignet zur Fluoreszenz-Mikroskopie, Immunfluoreszenz, DNA-Zytometrie, Motility and Motion Analysis, Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, Chemie/Bio-Lumineszenz, Langzeitbeobachtung lichtschwacher Objekte (Sterne) und Green-fluorescent-protein-Anwendungen. Mit dem ER-150-CCD-Chip hat die Kamera ein Spektrum von 350 bis 850 nm. Durch den wartungsfreien Peltier gekühlten „hermetic vacuum sealed“ Kamerakopf ist eine stabile CCD Kühlung auf unter -60°C möglich. Damit wird ein extrem niedriger Dunkelstrom erreicht, der eine rauschfreie Belichtungszeit bis in den Stundenbereich ermöglicht. Die Auflösung liegt bei $1280 * 1024$ Pixeln (HAMAMATSU PHOTONICS 2001).

Fluoreszenz ist das Resultat eines Prozesses, der in einigen Molekülen stattfindet, meist polyaromatische Kohlenwasserstoffe oder Heterocyklen. Die erste Phase ist die Exzitation, bei der ein Photon mit der Energie $h\nu_{EX}$ durch eine externe Lichtquelle angeregt und von der fluoreszierenden Substanz absorbiert wird. Diese geht damit in einen angeregten Zustand S_1' über. Der angeregte Zustand dauert eine bestimmte Zeit lang an, in der Regel 1 bis 10 Nanosekunden. Während dieser Zeit durchläuft die fluoreszierende Substanz konformationelle Veränderungen und ist Ziel möglicher Interaktionen mit seiner molekularen Umgebung. Konsequenzen sind, dass die Energie von S_1' teilweise abgegeben wird, es erreicht einen Status S_1 , aus dem die Fluoreszenz-Emission entsteht. Hierbei wird ein Photon mit der Energie $h\nu_{EM}$ abgegeben, womit die fluoreszierende Substanz zu ihrem Ausgangszustand S_0 zurückkehrt. Entsprechend dem Verlust an Energie während des angeregten Zustandes ist die Energie des Photons $h\nu_{EM}$ geringer und die Wellenlänge größer als das Photon mit der Energie $h\nu_{EX}$. Die Energie- oder Wellenlängendifferenz, charakterisiert als $(h\nu_{EX} - h\nu_{EM})$, nennt man Stokes shift (www.MI-central.org 2003).

Der Vorgang der Fluoreszenz ist zyklisch: wenn die fluoreszierende Substanz im angeregten Zustand nicht zerstört wurde, kann das gleiche Fluorophor wiederholt angeregt und detektiert werden. Aus diesem Grund sind Fluoreszenz-Detektions Techniken sehr sensitiv (www.MI-central.org 2003).

2.5 Hämatopoetische Vorläuferzellen

2.5.1 Hämatopoese und Stammzelltransplantation

Alle Zellen des Blutes entwickeln sich aus mesenchymalen Retikulumzellen, die im retikulären Gewebe des Knochenmarkes als pluripotente Stammzellen bezeichnet werden. Die Differenzierung der Blutzellen erfolgt in der Embryonalphase zunächst in der Wand des Dottersackes, geht dann auf Leber und Milz über und wird in der fortschreitenden intrauterinen Entwicklung, und dann zeitlebens, vom roten Knochenmark übernommen (KOLB und HOLLER 1997). Die Vorläuferzellen für die Blutzellbildung bezeichnet man als Hämoytoblasten; diese wandeln sich in unipotente Vorläuferzellen um, die Stammzellen für die Bildung der unterschiedlichen Blutzellen darstellen (LIEBICH 1993). Diese sogenannten determinierten Stammzellen besitzen zahlreiche zellspezifische Oberflächenrezeptoren, die der Identifikation der unterschiedlichen Zellen dienen; die primitive humane pluripotente Stammzelle exprimiert u. a. CD 34 (KEMPURAJ et al. 1999). Stammzellen haben die Fähigkeit zur Autoreproduktion, die ihren Bestand aufrechterhält, und sie bilden differenziertere Nachkommen. Aus den Vorläuferzellen gehen Kolonien von weiter differenzierten Zellen hervor, daher werden sie auch CFU (colony forming units) genannt. Aus einem CFU_{GEMM} werden z.B. viele Granulozyten, Erythrozyten, Monozyten und Megakaryozyten (SCHMIDT und THEWS 1995). Die hämatopoetische Stammzelle wurde in vielen Studien untersucht. Sie wurden charakterisiert nach Oberflächenantigenen, Genexpression, Zellwachstum in vitro und in vivo und ihrer Fähigkeit, nach Transplantation anzuwachsen und sich zu vermehren (SPANGRUDE 1991, 1992, 1994, QUESENBERRY 1992, QUESENBERRY et al. 1997, 1999, PHILIPS et al. 2000, ADAMS et al. 2003).

Als Homing bezeichnet man die Eigenschaft intravenös infundierter hämatopoetischer Stammzellen, sich im Knochenmark und nicht in anderen Organen letztendlich anzusiedeln. Bei der Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen stellt dies einen wesentlichen Schritt dar, um anzuwachsen und die Hämatopoese zu gewährleisten (JETMORE et al. 2002). Im adulten Organismus ist nur im Knochenmark die für das Wachstum der hämatopoetischen Stammzellen notwendige Mikroökologie vorhanden (KOLB und HOLLER 1997). Für den Erfolg von Stammzelltransplantationen ist es daher wichtig, die Prozesse zu verstehen, die die Wanderung und das Homing der transplantierten Zellen steuern. Vermutlich hängt das Homing primär von Adhäsions-Molekül-Interaktionen zwischen Stammzellen, Stromazellen und Extrazellulärmatrix ab (CERNY et al. 2000). Die Wanderung der Zellen durch einzelne Or-

gane wurde eingehend untersucht; bereits 2 bis 4 Stunden nach Stammzellinjektion befinden sich in Milz und Knochenmark annähernd so viele der transplantierten Zellen wie nach 24 Stunden; die Konzentration der Zellen in der Lunge nimmt nach 4 Stunden wieder ab (OOSTENDORP et al. 2000, KOLLET et al. 2001). Die Leber fängt eine große Anzahl von Zellen auf; nur 2,3 bis 7 % transplantiertes humaner CD34+ Stammzellen aus Nabelschnurblut konnten nach 24 Stunden p.i. im Knochenmark von NOD/SCID-Empfängern (nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice) aufgefunden werden, wobei die Anzahl der Zellen im Knochenmark 5-10 mal höher war als in der Milz (VAN HENNIK et al. 1999, CASHMAN und EAVES 2000, JETMORE et al. 2002). Stammzellen, die aus peripherem Blut oder Knochenmark entnommen wurden, gelangen in noch geringerer Anzahl in das Knochenmark, ca. 1 %. Die Verteilung von CD34- und CD34+ Zellen in vivo ist dabei gleich (VAN HENNIK et al. 1999). Transplantationen von humanen hämatopoetischen Stammzellen aus Nabelschnurblut in BALB/c-AnNCrI-Mäuse zeigten, dass trotz Xeno-Transplantation die Zellen anwachsen und ihre Funktion ausüben (LAN et al. 2000).

Quellen für hämatopoetische Stammzellen in der klinischen Anwendung im Rahmen von Stammzelltransplantationen sind nicht nur das Knochenmark über multiple Beckenkamm-punktionen, sondern auch durch geeignete Wachstumsfaktoren mobilisierte Stammzellen aus dem peripheren Blut (PAPAYANNOPOULOU 2000, LEVESQUE et al. 2003) und Nabelschnurblut nach der Geburt (KOLB et al. 1997, BUG und EICHLER 2003).

Die Transplantation von Stammzellen aus Nabelschnurblut ist in der Pädiatrie bereits etabliert und wird in zahlreichen Studien zur Anwendung am Adulten erforscht (BARKER und WAGNER 2003). In mehr als 2000 durchgeführten Transplantationen wurde erwiesen, dass Nabelschnurblut als alternative Stammzellquelle für hämatologische Patienten ohne geeigneten Knochenmarkspender genutzt werden kann (BUG und EICHLER 2003). Die Entnahme von Nabelschnurblut erfolgt nach der Geburt durch Punktion der Nabelschnur aus dem Plazentarestblut; ein durchschnittliches Volumen von 70 bis 100 ml kann ohne Schaden für das Kind entnommen werden (KOLB und HOLLER 1997). In Nabelschnurbanken eingelagerte Stammzellen können, eingefroren in flüssigem Stickstoff, 15 Jahre und länger ohne wesentlichen Funktionsverlust überstehen (BUG und EICHLER 2003).

Vorteile dieser Form der Stammzellentnahme sind eine schnelle Verfügbarkeit, ein geringes Infektionsrisiko und bei autologer Transplantation keine, bei allogener Transplantation geringe Graft-versus-host-Reaktionen (Transplantat-gegen-Empfänger-Reaktion) aufgrund der zwar vollständig entwickelten T- und B-Lymphozyten, die jedoch ihre Funktion ohne weitere

Aktivierung noch nicht ausüben können. Daher muss die Übereinstimmung der HLA-Moleküle (Human Leukozyte Antigen, für jeden Menschen spezifische, charakteristische Oberflächenmoleküle) zwischen Spender und Empfänger nicht so streng eingehalten werden wie bei Stammzellen von erwachsenen Spendern (BUG und EICHLER 2003, www.medicine-worldwide.de 2003). Durch das gesteigerte proliferative Potential der hämatopoetischen Zellen aus Nabelschnurblut im Gegensatz zu den adulten Zellen kann die Regeneration des Blut- und Immunsystems des Empfängers mit einem Zehntel der Zellen, die für eine herkömmliche Knochenmark- oder Stammzelltransplantation benötigt werden, erfolgen. Für erwachsene Empfänger könnten die wenigen im einzelnen Nabelschnurblutpräparat enthaltenen Zellen jedoch trotzdem nicht ausreichen, und es resultiert eine verlängerte Zeit bis zur Blutbilderholung. Dadurch steigt das Infektionsrisiko und das Risiko eines Transplantatversagens (BUG und EICHLER 2003).

Nabelschnurblut enthält neben hämatopoetischen auch mesenchymale Stammzellen, die in Knorpel-, Fett-, Neuroglia- und Hepatozytenähnliche Zellen differenzieren können (LAGASSE et al. 2000, ORLIC et al. 2001 a und b, TOMA et al. 2002, JIANG et al. 2002, LEE et al. 2003, HOU et al. 2003).

2.5.2 Methoden der Zellmarkierung und bildgebende Verfahren

Um die natürliche Barriere der Zellmembran zu überwinden, wurde eine Vielfalt von Strategien entwickelt, unterschiedliche Agentien über Trägersubstanzen in die Zellen zu schleusen. Anwendungsgebiete ergeben sich u.a. in der Molekularbiologie (MALONE et al. 1989), der Genforschung (CHEN und OKAYAMA 1988) und im Zuge hämatologischer Erkrankungen (Leukämie, Lymphome, aplastische Anämie), Immunsuppressionen, malignen hämatologischen oder nichthämatologischen Neoplasien nach Zelltransplantation zur nichtinvasiven Überwachung des Therapieerfolges. Herkömmliche histologische Verfahren sind invasiv und haben den Nachteil, dass eine langfristige, wiederholte Verfolgung der angewachsenen Zellen in vivo nicht möglich ist.

Für die Anwendung am Menschen sind nichtinvasive, wiederholbare Diagnoseverfahren erforderlich, wie die PET (ADONAI et al. 2002), die MRT (ALLPORT und WEISSLEDER 2001, BULTE et al. 2001, 2002) und das Optical Imaging (LANZKRON et al. 1999, HARDY et al. 2001, MAHMOOD et al. 2002). Die Möglichkeit, Zellen in nahezu mikroskopischer Auflösung im lebenden Organismus zu verfolgen, würde viele Fragen im Bereich der Zelltherapie beantworten.

Man versucht, die Verfolgung von mit radioaktiven Stoffen markierten Zellen mit der Positronenemissionstomographie (PET) durchzuführen. Über die radioaktive Markierung kann die Migration von Zellen *in vivo* detektiert werden (BLOCKLET et al. 2003, AICHER et al. 2003). Radioaktive Stoffe üben allerdings radiotoxische Wirkungen auf die Zielzelle aus, was die Verwendung dieser Methode der Zellmarkierung *in vivo* limitiert. Außerdem ist die Verfolgung von radioaktiv markierten Zellen durch den Abfall der Radioaktivität zeitlich begrenzt (FAWWAZ et al. 1985). Die PET bietet zudem keine ausreichende Auflösung und Sensitivität, um einzelne Zellen in Organen aufzufinden (ADONAI et al. 2002).

Die Magnetresonanztomographie (MRT) ist ein nichtinvasives bildgebendes Verfahren mit nahezu mikroskopischer Auflösung. Sie ermöglicht die dreidimensionale Darstellung biologischer Strukturen bis hin zu einer Auflösung von 25 bis 50 μm (BULTE et al. 2002).

Computer-verstärkte Fluoreszenzmikroskopie (Optical Imaging) ermöglicht eine hochauflösende Bildgebung, die ganze Gewebe und Organismen (100 bis 300 μm) durchdringen kann, verfügt jedoch über eine geringe anatomische Auflösung. Mit dem Optical imaging können die Befunde der MRT verifiziert werden (HÜBNER et al. 1998, HARDY et al. 2001, www.MI-central.org 2003).

Die Strategien der Zellmarkierung umfassen u. a. Phagozytose (SIPE et al. 1999, YEH et al. 1993, DALDRUP-LINK et al. 2003) und die Verwendung von Transfektions-Agentien (MALONE et al. 1989, DALDRUP-LINK et al. 2003, RUDELIUS et al. 2003).

Andere Verfahren nutzen Agentien, die für die klinische Anwendung noch nicht zugelassen sind. Sie sind aufwendig in ihrer Synthese und werden mit der MRT bei Feldstärken von 4 bis 14 Tesla visualisiert; die meisten MRT-Geräte in klinischem Gebrauch haben eine Feldstärke von bis zu 1,5 Tesla (RUDELIUS et al. 2003).

Eines dieser Verfahren ist die Rezeptor vermittelte Endozytose, mit der Dextran gecoatete MION-46L Eisenoxid-Nanopartikel in die Zelle gelangen. Dafür werden sie zunächst kovalent an einen an den Antitransferrin-Rezeptor bindenden monoklonalen Antikörper gebunden und dann über Endozytose in die Zelle aufgenommen. Damit können Stammzellen während ihrer normalen Expansion *in vitro* gelabelt werden. Diese Methode ist limitiert durch die Erfordernis eines speziellen Monoklonalen Antikörpers, der ein spezifisches Zelloberflächenantigen erkennt, und sie ist spezies-spezifisch (SHEN 1993, BULTE et al. 1999, 2001).

Membran-Translokations-Signale internalisieren Proteine, Peptide, Oligonukleotide, Nukleinsäuren von Peptiden und Plasmid-DNA. Zu diesen gehören z.B. die HIV-Tat-Peptide, das VP22-Herpes-Virus-Protein und andere synthetische Peptide (BHORADE et al. 2000, JOSEPHSON et al. 1999, LEWIN et al. 2000).

Das Membrantranslokations-Signal des HIV-Tat-Peptides kann genutzt werden, um superparamagnetische Eisenoxid-Partikel in nichtphagozytierende Zellen einzubringen (BULTE et al. 1999, BHORADE et al. 2000). Es gelang, Chelate dieser Kontrastmittel, angehängt an das HIV-Tat-Peptid, in humane natürliche Killerzellen, in Mäuselymphozyten und Humane Cervix-Karzinom-Zellen einzubringen. Die dabei erreichten Konzentrationen waren ausreichend, um die Zellen in vitro im MRT bei 1,5 Tesla zu detektieren (BHORADE et al. 2000).

Mit Hilfe von polykationischen, Eisenoxid-assoziierten Polymeren, den sogenannten Magnetodendrimeren, wurde eine effiziente Möglichkeit gefunden, neuronale und mesenchymale Stammzellen nichtinvasiv im Magnetresonanztomographen bei 4,7 und auch bei $\leq 1,5$ Tesla darzustellen (BULTE et al. 2001, 2002). Die Dendrimere binden über elektrostatische Interaktionen an die SPIOs und werden durch Endozytose in die Zelle aufgenommen. Der Vorteil dieser Methode ist, dass sie nichtspezifisch ist. Damit kann theoretisch jede Säugetierzelle markiert werden, einschließlich multipotenter humaner Stammzellen.

Für die Markierung mit fluoreszierenden Stoffen stehen bifunktionelle Stoffe zur Verfügung, die sowohl die optische, Computer verstärkte Lichtmikroskopie, als auch die magnetresonanztomographische Darstellung ermöglichen. Die erste Klasse dieser Komplexe besteht aus Gadolinium-DOTA mit niedrigem Molekulargewicht, kovalent gebunden an Tetramethylrhodamin. Sie wird genutzt zur Untersuchung der Membranpermeabilität, Interaktion von Gapjunctions und von Läsionen. Die zweite Klasse stellen nicht-membrangängige Polymere mit hohem Molekulargewicht dar, die, einmal in eine Zelle injiziert, dort verbleiben. Der Komplex besitzt ebenfalls einen Metall-Chelator, der paramagnetische Ionen binden kann, das Gadolinium (Gd^{3+}) und ein kovalent gebundenes fluoreszierendes Agens, Tetramethylrhodamin (HÜBNER et al. 1998, MODO et al. 2002). Gadoliniumionen sind toxisch. Eine ausreichende Verträglichkeit ist nur in Form eines Chelates mit fester Bindung des Gadoliniums zu erzielen (Gd-DTPA). Die Komplexe sind umhüllt von einem Polymer-Gerüst mit hohem Molekulargewicht, meist Dextran (BRASCH et al. 1984). Weitere bifunktionelle Stoffe setzen sich zusammen aus Arginyl-Peptiden, die an magnetische Nanopartikel und das fluoreszierende Indocyanin Cy 5,5 gebunden sind (JOSEPHSON et al. 2002).

Die Darstellung von Fluorochromen in vivo mit dem Optical Imager (Digital CCD-Kamera) wird zur Zeit im Tierversuch evaluiert (www.MI-central.org 2003).

Neue große endosomal aufgenommene Eisenoxid-Kontrastmittel, die außerdem ein Fluorophor besitzen (Superparamagnetic divinyl benzene inert polymer microspheres mit Eisenoxidkomponente und Fluorescein-5-isothiocyanat mit einer Größe von $0,9 \mu m$), ermög-

lichen die Darstellung von einzelnen hämatopoetischen CD-34+ Stammzellen und mesenchymalen Zellen mit der MRT bei 11,7 Tesla auf zellulärer Ebene und eine Evaluierung der Ergebnisse über die Fluoreszenzmikroskopie (HINDS et al. 2003).

2.6 Tiermodell Maus

Aufgrund der nicht vorhersehbaren Reaktionen im Organismus durch die Injektion von mit Kontrastmitteln markierten hämatopoetischen Stammzellen sind Tierversuche vor der Anwendung am Menschen obligat.

Durch ihre hohe Stoffwechselaktivität und damit schnellen Umlauf der MRT-Kontrastmittel bzw. der injizierten Zellen, gute Möglichkeiten des Handlings und einen geringen Narkotikaverbrauch hat sich die Maus als optimales Tiermodell erwiesen. Für die Injektion von humanen Zellen ist es notwendig, bei den Empfängertieren keine Immunreaktionen auszulösen. In vielen Studien wurden bereits immundefiziente Mäuse nach Injektion humaner Stammzellen auch über einen längeren Zeitraum beobachtet (BROXMEYER et al. 2003, YAHATA et al. 2003, LAN et al. 2000). Die Anzahl der zu injizierenden Zellen ist durch die geringe Größe der Maus begrenzt. Ein Flüssigkeitsvolumen von 300 µl stellt die maximale Infusionsmenge bei der Maus dar. Das Blutvolumen einer gesunden Maus beträgt 2 bis 3 ml (GABRISCH und ZWART 2001).

Bei den in der vorliegenden Arbeit genutzten Tieren handelt es sich um homozygote Mäuse für eine nackte, spontane Mutation des Stammes BALB/c-AnCrl mit zwei hauptsächlichen Gen-Defekten, und zwar abnormales Haarwachstum und defekte Entwicklung des Thymusepithels. Obwohl die Mäuse haarlos erscheinen, werden sie mit funktionellen, aber fehlerhaften Haarfollikeln geboren.

Außerdem besitzen die Nacktmäuse eine rudimentäre, nicht funktionelle Thymusanlage, was durch einen Entwicklungsfehler des Thymus begründet ist. Infolgedessen fehlen den homozygoten Nacktmäusen T-Zellen und sie leiden an einer mangelnden zellvermittelten Immunität. Außerdem zeigen homozygote Nacktmäuse partielle Defekte in der Entwicklung der B-Zellen. Über andere endokrine und neurologische Defekte wurde ebenfalls berichtet (JACKSON LABORATORY 2000).

Der Gebrauch von Nacktmäusen hat die Anzahl der Thymektomien in der Versuchstierkunde drastisch reduziert (JACKSON LABORATORY 2000).

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Zielsetzung

Die Zielsetzung der vorliegenden Studie ist es, mit bereits bzw. in naher Zukunft klinisch zugelassenen MRT-Kontrastmitteln (Eisenoxiden) markierte hämatopoetische Vorläuferzellen in vivo in der Maus mit einem klinisch eingesetzten 1,5 Tesla Standard-Magnetresonanztomographen optisch darzustellen und ihre Migration und ihr Homing im Organismus über einen längeren Zeitraum nichtinvasiv zu verfolgen. Diese Erkenntnisse sollen mit einer zweiten Methode, dem Optical Imaging, und einem weiteren Kontrastmittel (Gadophrin) evaluiert werden. Die Methoden der Zellmarkierung sollen einfach anzuwenden sein, mit einfacher Inkubation bzw. über Standard-Transfektionsprotokolle erfolgen, eine effiziente Markierung der Zellen gewährleisten und die Differenzierungs- und Wachstumseigenschaften der Zellen möglichst wenig beeinträchtigen.

Der vorliegende Tierversuch wurde von der Regierung von Oberbayern gemäß Tierschutzgesetz i.d.F. vom 25.05.1998 (BGBl I S. 1105) genehmigt.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere werden insgesamt 58 weibliche Mäuse des Stammes Balb/c-AnNCrl mit einem durchschnittlichen Alter von 8 Wochen und einem durchschnittlichen Gewicht von 20 g eingesetzt (Charles River GmbH, Sulzfeld, Deutschland). Die Mäusehaltung findet unter sterilen Verhältnissen in einzelbelüfteten Käfigen in einem klimatisierten Raum bei 23 ° C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60 bis 70 % in Makrolon®-Käfigen Typ III (Polycarbonat) mit Gitterrostabdeckung in Gruppen von vier Tieren statt. Die Einstreu besteht aus entstaubter Weichholzfaser (Labortiereinstreu Fa. Altromin International GmbH, Lage-Lippe) und wird täglich gewechselt. Trinkwasser aus Flaschentränken und Futter (altromin 1324, Alleinfuttermittel für die Haltung von Ratte und Maus, Fa. Altromin) stehen den Tieren ad libitum zur Verfügung. In dem fensterlosen Raum wird der Tag-Nacht-Rhythmus über ein automatisches Beleuchtungsprogramm geregelt. Jeweils 12 Stunden Licht (Lichtintensität 60-100 Lux) und Dunkelheit wechseln sich ab, eine Dämmerungsphase fehlt.

Der Transport zum MRT erfolgt in den gewohnten Käfigen, die mit einem bakteriendichten Filter versehen werden.

3.2.2 Versuchsplan

3.2.2.1 Versuchsdurchführung

Den Tieren werden verschiedene Kontrastmittel (Endorem®, P7228) bzw. mit verschiedenen Kontrastmitteln (Endorem®, P7228, Gadophrin) markierte Zellen injiziert. Vor sowie 4 und 24 Stunden nach der Injektion findet die Untersuchung im MRT statt.

Jeweils 10 Mäusen werden mit Endorem und P7228 gelabelte Zellen injiziert, davon je 2 mit niedriger, 2 mit mittlerer und 6 mit hoher Zellzahl, jeweils 9 Mäuse erhalten Injektionen dieser Kontrastmittel mit NaCl verdünnt. Vor sowie vier und 24 Stunden nach der Injektion erfolgt die MRT-Untersuchung mit T2*-FFE und T2-TSE-Sequenzen. Zur Validierung der Ergebnisse werden 10 Mäusen mit Gadophrin gelabelte Zellen injiziert, ebenfalls 2 Mäuse erhalten eine niedrige, 2 eine mittlere und 6 Mäuse eine hohe Zellzahl. Diese Mäuse werden zusätzlich zur Untersuchung im MRT (T1-FFE-Sequenzen) auch mit der High Resolution Digital B/W CCD Kamera ORCA II ER (Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu, Japan) untersucht, ebenfalls nach vier und 24 Stunden und nochmals nach 48 Stunden. Im Anschluss an die dritte Untersuchung im MRT erfolgt die Euthanasie der Mäuse.

Histologische Untersuchungen erfolgen an Leber, Milz und Knochenmark des Femur.

Tab. 4 Gruppeneinteilung der Mäuse mit Zell- bzw. Kontrastmittelinjektion

Kontrastmittel + Zellen	Anzahl der Mäuse	Zellzahl
Endorem	n = 2	$5 * 10^6$
Endorem	n = 2	$2 * 10^7$
Endorem	n = 6	$3 * 10^7$
P7228	n = 2	$1 * 10^7$
P7228	n = 2	$2 * 10^7$
P7228	n = 6	$3 * 10^7$
Gadophrin	n = 2	$1 * 10^6$
Gadophrin	n = 2	$2 * 10^7$
Gadophrin	n = 6	$7 * 10^7$
Kontrastmittel	Anzahl der Mäuse	Dosierung
Endorem	n = 9	2 μ l
P7228	n = 9	2 μ l

Tab. 5 Versuchsdurchführung

Kontrastmittel	Mäuse	Unters. im MRT; prä	Kontrastmittel-injektion	Zell-injektion (KM-gelabelte Zellen)	Unters. im MRT; 4 h p. i.	Unters. im MRT; 24 h p. i.	Unters. in Dig.-Kam. prä, p. i. 4, 24, 48 h	Histologische Untersuchung
Endorem	n = 9	●	●		●	●		●
Endorem	n = 10	●		●	●	●		●
P7228	n = 9	●	●		●	●		●
P7228	n = 10	●		●	●	●		●
Gadophrin	n = 10	●		●	●	●	●	

3.2.2.2 Anästhesie

Die Tiere werden anästhetisiert und vor sowie vier und 24 Stunden nach der Zell- bzw. Kontrastmittelinjektion magnetresonanztomographisch untersucht.

Durch speziell angefertigte Liegefächer können vier Tiere gleichzeitig untersucht werden (Abb. 6). Diese Fächer bestehen aus Kunststoff und sind in vier Kompartimente unterteilt, wobei die oberen Liegeplätze abnehmbar sind, um an die darunterliegenden zu gelangen. Sie sind genau angepasst an die Handspule, in der die Mäuse MR-tomographisch untersucht werden.



Abb. 6: Kunststoff-Liegefächer zur Untersuchung im MRT

3.2.2.2.1 Injektionsnarkose

Zur Injektionsnarkose verwendet man eine voll antagonistisierbare Anästhesie. Diese besteht aus Medetomidin (1 mg/ml, Domitor®, Fa. Pfizer, New York, USA), Midazolam (5 mg/ml, Dormicum®, Fa. Roche Austria, Wien) und Fentanyl (0,05 mg/ml, Fentanyl® Janssen, Fa. Janssen-Cilag) im Gemisch als Anästhetikum und den Antagonisten Atipamezol (Antisedan® Pfizer, 5 mg/ml), Flumazenil (0,1 mg/ml, Anexate®, Fa. Roche Austria) und Naloxon (0,4 mg/ml, Narcanti®, Fa. Janssen-Cilag.). Die Dosierung ist den Tabellen 6 und 7 zu entnehmen.

Tab. 6 Dosierung Anästhetikum

Gewicht (g)	Medetomidin (µg)	Midazolam (µg)	Fentanyl (µg)	Domitor (ml)	Dormicum (ml)	Fentanyl (ml)	Mischung (ml)
16	8	0,08	0,8	0,007	0,014	0,014	0,035
18	9	0,09	0,9	0,008	0,016	0,016	0,04
20	10	0,1	1	0,009	0,018	0,018	0,045
22	11	0,11	1,1	0,01	0,02	0,02	0,05
24	12	0,12	1,2	0,011	0,022	0,022	0,055
26	13	0,13	1,3	0,012	0,024	0,024	0,06
28	14	0,14	1,4	0,013	0,026	0,026	0,065
30	15	0,15	1,5	0,014	0,028	0,028	0,07

Tab. 7 Dosierung Antagonist

Gewicht (g)	Atipamezol (µg)	Flumazenil (µg)	Naloxon (µg)	Antisedan (ml)	Anexate (ml)	Narcanti (ml)	Mischung (ml)
16	40	8	19,2	0,008	0,08	0,048	0,136
18	45	9	21,6	0,009	0,09	0,054	0,153
20	50	10	24	0,01	0,1	0,06	0,17
22	55	11	26,4	0,011	0,11	0,066	0,187
24	60	12	28,8	0,012	0,12	0,072	0,204
26	65	13	31,2	0,013	0,13	0,078	0,221
28	70	14	33,6	0,014	0,14	0,084	0,238
30	75	15	36	0,015	0,15	0,09	0,255

Nach intraperitonealer Injektion von 0,045 ml des Anästhetika-Gemisches (bei einem durchschnittlichen Gewicht der Mäuse von 20 g) in Kopftief- und Halbseitenlage paramedian in den dorsalen Quadranten des Unterbauches (PADDLEFORD und ERHARDT 1992) tritt die Bewusstlosigkeit nach ca. 15 Minuten ein. Die Atmung ist flach und gleichmäßig. Es treten keine Atemartefakte auf. 10 Minuten nach Antagonisierung erwachen die Tiere. Die dreimalige Anästhesie bleibt ohne erkennbare Nebenwirkungen.

3.2.3 Zellextraktion und Markieren der Zellen mit MR-Kontrastmitteln

Die bei der vorliegenden Studie verwendeten humanen Vorläuferzellen werden aus dem Nabelschnurblut gesunder Neugeborener gewonnen. Die Zellen werden 1:1 gelöst in Hank's balanced salt solution (HBSS, Fa. Gibco BRL) und über Ficoll Dichtegradient (1,077 g/cm³, Fa. Biochrom, Berlin) nach Zentrifugieren bei 1000 G über 20 Minuten die mononukleären Zellen isoliert.

Die Erythrozyten werden über Zugabe von 40 ml einer Erythrolyse-Lösung (10 mmol Hepes, Fa. Gibco BRL, 40 mmol K-EDTA, 145 mmol NH₄Cl, 5 mmol KHCO₃) eliminiert. Nach 5 Min. wird die verdünnte Hepes-Lösung („Standardlösung“, HBSS, 1 %Glucose, 10 mmol Hepes und 2% Fetalem Kälberserum, Fa. PAN Biosystems) zugegeben, um den Lyse-Vorgang zu stoppen, und die Zellen werden zweimal gewaschen. Die Hepes-Lösung dient auch als Transportmedium. Durch Filtration durch einen 30 µm Filcon-Spritzenfilter (Fa. BD-Immunocytometry Systems, Erembodegem, Belgien) werden Zelldetritus und mögliche Verunreinigungen, die ein Verklumpen der Zellen begünstigen, entfernt. Dann zählt man die Zellen mit einem Zellcounter CASY 1 TT von Schärfe System.

3.2.3.1 Endorem®

Die Zellsuspension wird 7 Min. bei 1500 RPM zentrifugiert, der Überstand abgesaugt. 500 µl Dulbeccos MEM-Medium pro beabsichtigtem Ansatz (6 Ansätze) gibt man auf die Zellen, durchmischt die Lösung und verteilt sie zu gleichen Teilen auf 6 Eppendorf-Röhrchen. Dann werden pro Ansatz 15 µl Endorem hinzugefügt. Die Eppendorf-Röhrchen füllt man bis zur 1,5 ml Marke mit Dulbeccos MEM auf. Das Gemisch inkubiert vier Stunden bei 37° C. Die Eppendorf-Röhrchen werden zusammenpipettiert, 7 Min. bei 1500 RPM zentrifugiert, der Überstand abgesaugt. Diesen Waschvorgang wiederholt man noch zwei mal. Das Waschen der Zellen erfolgt mit der oben beschriebenen Standardlösung. Die markierten Zellen werden auf ein Endvolumen von 300 µl mit der Standardlösung aufgefüllt und durch einem 30 µm Spritzenfilter gefiltert.

3.2.3.2 P7228

Zunächst inkubieren 4 Ansätze in Eppendorfröhrchen mit jeweils 100 µl Dulbeccos MEM-Medium mit 20 µl Lipofectin® und 100 µl Medium mit 10 µl P7228 eine halbe Stunde bei Raumtemperatur in der Sterilbox. Dann wird das Kontrastmittel auf das Lipofectin®Reagent pipettiert. Das Gemisch inkubiert wieder eine halbe Stunde. Die Zellsuspension, hämatopoetische Vorläuferzellen aus Nabelschurblut, wird zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Nach Zugabe von 800 µl Dulbeccos MEM-Medium gibt man das Kontrastmittel-Lipofectin-Gemisch auf die Zellen. Die Zellsuspension wird 4 Stunden bei 37 ° C im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgen Waschen und Filtern der Zellen wie bereits oben beschrieben.

3.2.3.3 Gadophrin

Es werden ebenfalls jeweils 4 Ansätze mit 100 µl Medium und 20 µl Lipofectin® bzw. 22,5 µl Gadophrin eine halbe Stunde inkubiert, dabei deckt man das Gadophrin mit Alufolie lichtgeschützt ab. Der weitere Vorgang der Zellmarkierung erfolgt wie oben bereits beschrieben. Der Unterschied zur Markierung der Zellen mit P7228 liegt darin, dass die Zellen mit Gadophrin-Lipofectin nur 2 Stunden inkubieren müssen.

3.2.3.4 Kolonie-Assay

Die mit Eisenoxiden markierten Zellen aus humanem Nabelschnurblut werden in einer Anzahl von 20 Tausend Zellen (davon 100 CD34+ Zellen) in 1,1 ml H4435 Medium (Fa. StemCell Technologies, Vancouver, Kanada) gegeben und inkubieren 14 Tage bei 37°C in 35 mm Zellkulturflaschen. Dann wird die Anzahl an Burst-forming erythroid (BFU-E), Granulozyt-erythroid-makrophage-megakaryozyt colony-forming (CFU-GEMM) und Granulozyt-makrophage colony-forming (CFU-GM) Vorläuferzellen ausgezählt.

3.2.3.5 Injektion

Für die intravenöse Injektion in die Maus wird ein Volumen von 300 µl verwendet. Unmittelbar vor der Injektion wird die Zellsuspension nochmals gefiltert.

Die Injektion erfolgt in die laterale Schwanzvene nach Kammeranästhesie mit Äther (PADDLEFORD und ERHARDT 1992).

Dafür wird die Maus in eine Plastikbox mit Äther-getränkten Tupfern gesetzt. Nach ca. 60 Sek. tritt die Bewusstlosigkeit ein und die Maus wird in Seitenlage fixiert. Durch Eintauchen des Schwanzes in 40 °C warmes Wasser dilatiert die Schwanzvene. Die Haut wird mit Cutasept® desinfiziert. Die Injektion der Zellsuspension erfolgt mit einer 30 Gauge Insulinspritze.

3.2.3.6 MR-Kontrastmittel

Die bei der Markierung der Zellen verwendete Dosierung der Kontrastmittel ist oben bereits angegeben (siehe 3.2.3.1 für Endorem, 3.2.3.2 für P7228, 3.2.3.3 für Gadophrin).

Für die Kontrolluntersuchungen werden die untersuchten Kontrastmittel als Bolus mit 300 µl 0,9 %iger NaCl-Lösung injiziert.

Beim Menschen beträgt die Dosierung für Endorem® gemäß den Empfehlungen des Herstellers 15 µmol Fe/kg KGW, das sind 0,075 ml Endorem®/kg. Bei einer Maus mit einem Körpergewicht von 20 g entspricht das 0,0015 ml, aufgerundet 2 µl.

Die vom Hersteller empfohlene Dosierung für P7228 beträgt 2,6 mg Fe/kg KGW. In einem ml P7228 sind 30 mg Fe enthalten, eine Maus von 20 g erhält 0,001732 ml, aufgerundet ebenfalls 2 µl.

3.2.4 MRT-Gerät und Pulssequenzen

Die Bilder werden mit einem Gyroscan ACS-NT Powertrak 6000 (Philips, The Best Netherlands) Ganzkörpertomographen mit einer Feldstärke von 1,5 Tesla erstellt und eine speziell angefertigte Handgelenk-Spule (Medical Advances, Milwaukee, U.S.A.) verwendet.

Die anästhesierten Mäuse werden in Bauchlage in Gruppen zu je zwei Mäusen im MRT untersucht. Sie werden auf den speziell angefertigten Kunststoff-Liegefächern am Schwanz mit Klebeband fixiert und in die Handgelenkspule geschoben.

Die Nativ-Untersuchungen mit den nachfolgend aufgeführten Sequenzen erfolgen vor der Kontrastmittelinjektion. Die Untersuchungen nach Kontrastmittel-Injektion bzw. nach Injektion der Kontrastmittel-markierten Zellen erfolgen vier sowie 24 Stunden post injektionem.

Bei den Untersuchungen der Mäuse vor und nach Injektion von Eisenoxid-Kontrastmittel umfassen die Sequenzen coronare T2-gewichtete Turbospinechosequenzen (T2-TSE) 3704/90/90° (Repetitionszeit TR/Echozeit TE/Flipwinkel α) mit einer Schichtdicke (TH) von 0,6 mm, 6 Aquisitionen (NSA), 32-36 Schichten (SL), einer Matrix von 512 x 512 Pixel und

Multi-Slice Scanmodus, sowie coronare T-2 gewichtete Fast field echo (T2*FFE) Gradientenechosequenzen 32/14/15° mit einer Schichtdicke von 0,4 mm, 3 Aquisitionen, 38-42 Schichten, Matrix 512 x 512 und 3 D-Scanmodus. Der Bildausschnitt (Field of View, FOV) beträgt bei beiden 100 x 80 mm.

Die Sequenzen für die Detektion des Gadophrin umfassen coronare T1-FFE-Sequenzen mit 27/9,2/40°, 3 NSA, Schichtdicke 0,4 mm, 30-40 Schichten, Matrix 400 x 512 und einem Bildausschnitt von 100 x 80 mm.

3.2.5 Optical Imager

Die Untersuchung im Optical Imager (ORCA-II-ER, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) erfolgt in Bauch- und in Rückenlage. Die Mäuse werden auf einer Unterlage aus schwarzer Pappe platziert. Dann werden sie jeweils 0,02 Sekunden bei normalem Licht in die richtige Position gebracht.

Dem Licht mit einer Wellenlänge von 499 nm, erzeugt durch spezielle Filter (Hamamatsu), werden sie jeweils 300, 500, 700 und 900 Millisekunden ausgesetzt. Die Bilder bei 700 Millisekunden werden farbig kontrastverstärkt.

3.2.6 Histologische Aufarbeitung

3.2.6.1 Präparation und Fixation der Gewebeproben

Am Versuchsende werden die anästhesierten Mäuse durch eine intracardiale Injektion von 0,5 ml Pentobarbital (Narcoren®, Fa. Merial GmbH, Hallbergmoos) euthanasiert. Femur, Leber und Milz werden von ventral entnommen. Die für die histologische bzw. die immunzytologische Aufarbeitung bestimmten Proben werden in 4 % iger Formalinlösung fixiert.

3.2.6.2 Histologie

Die Proben werden 24 Stunden in 4 %igem Formalin fixiert. Die Femura entkalkt man mit Ossafix® (3 % Formaldehyd, 2 % Zinkchlorid, 0,9 % NaCl). Anschließend erfolgt die Einbettung in Paraffin.

Die Organproben werden mit einem Mikrotom in 1,5 µm dicke Scheiben geschnitten, in einem Wasserbad (Aqua bidest, 40°C) gestreckt und auf Objektträger aufgezogen. Anschließend trocknet man die Proben bei 37°C 24 Stunden in einem Wärmeschrank, um ein sicheres Anhaften auf dem Objektträger zu gewährleisten.

3.2.6.2.1 Immunhistochemische Färbung

Die Immunhistochemische Färbung dient dem spezifischen Nachweis der humanen, mit Eisenoxid-Kontrastmitteln markierten Zellen. Hierfür verwendet man zwei unterschiedliche Antikörper:

- Primärantikörper Monoklonal Maus Antihuman gegen CD 31, Fa. Dako Cytomation GmbH, Hamburg, Verdünnung 1:30, und als brauner Farbstoff das Chromogen DAB (3,3 Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid), Fa. Dako (BULTE et al. 2001);
- Primärantikörper Monoklonal Maus IgG 1 gegen Dextran, DX-1, Fa. StemCell Technologies, Verdünnung 1:50, und als roter Farbstoff das Chromogen Fast Red TR (APAAP-Kit, mit Naphtol AS-MX-Phosphat und Levamisole) Fa. Dako.

Mit der CD 31-Färbung werden hämatopoetische Vorläuferzellen, die in Endothelzellen differenzieren, nachgewiesen. Mit der Dextran-Färbung wird die die Eisenoxid-Kontrastmittel umgebende Dextranhülle nachgewiesen (THOMAS et al. 1992).

Nach der Trocknung werden die Gewebeproben entparaffiniert. Hierfür inkubieren die Schnitte 2 x jeweils 3 Minuten bei Raumtemperatur in 100 % Xylol, dann jeweils 2 Minuten in Ethanol in absteigender Konzentration (100 %, 96 %, 70 %, 50 %) und werden anschließend mit Aqua dest. 2 Minuten gewaschen.

Um ein ausreichendes Signal zu erhalten, müssen die Antigene in den Schnitten demaskiert werden. Hierfür wird ein Schnellkochtopf verwendet, in dem die Objektträger in 2 Litern Citratpuffer bei 250 ° C für 7 Minuten erhitzt werden. Anschließend werden die Proben unter kaltem Wasser abgekühlt und gespült.

Danach trägt man den Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung in einer Menge von ca. 200µl pro Schnitt auf und die Probe inkubiert eine Stunde. Dann spült man die Probe 3 x mit TRIS-Puffer (0,05 M; pH 7,6). Daraufhin wird der Sekundärantikörper (APAAP, Kaninchenantiserum gegen Mausimmunglobuline; Brückenantikörper) aufgetragen und für

jeweils 30 Minuten inkubiert. Nach dem 3-maligen Spülen mit TRIS-Puffer wird der Immunkomplex (Alkalische Phosphatase-Maus anti-alkalische Phosphatase) aufgetragen und nochmals für 30 Minuten inkubiert. Den Farbstoff gibt man nach erneutem Spülen auf die Probe und inkubiert sie 9 Minuten. Daraufhin wird wieder mit TRIS-Puffer und Aqua dest. gespült und die Gegenfärbung (Hämatoxylin) für 10 Sekunden aufgetragen. Nach dem Abspülen unter warmem Leitungswasser für 1 bis 2 Minuten und dem Eintauchen in Ethanol (aufsteigende Reihe, je 2 Minuten 50 %, 70 %, 96 %, 2 x 100 %), erfolgt das Eindeckeln der Schnitte.

3.2.7 Auswertung der MR-Daten

Die MR-Daten werden über eine Messung der Signalintensität (SI) von Leber, Milz und vom Knochenmark des Femur innerhalb einer frei wählbaren Untersuchungsregion ROI (region of interest) ausgewertet.

Die Ergebnisse werden als SNR-Daten (signal-to-noise ratio, Signal-Rausch-Verhältnis) quantifiziert, um das Rauschen zu eliminieren (KAUFMANN et al. 1989, MURPHY et al. 1993, WOLFF und BALABAN 1997).

Das Signal-Rausch-Verhältnis wird berechnet, indem die Signalintensität durch das Rauschen dividiert wird (WOLFF und BALABAN 1997). Das Rauschen ist definiert als die Signalintensität der Artefakt-freien Luft des Hintergrundes, hier eine Stelle über der Maus innerhalb der speziell angefertigten Kunststoff-Liegefläche.

3.2.8 Statistische Berechnung und Dokumentation

Die quantitativen Werte für die Signalintensitäten von Knochenmark, Milz und Leber vor sowie nach Injektion von Endorem und P7228 und von mit Endorem, P7228 und Gadophrin markierten Zellen werden als SNR-Daten (Signal-to-noise ratio, Signal-Rausch Verhältnis) quantifiziert und als Mittelwerte mit Standardabweichungen aufgeführt. Die statistische Signifikanz von Unterschieden zwischen den Daten vor (T2*prä) und 24 Stunden nach Kontrastmittel- bzw. Zellinjektion (T2*24 h p.i.) werden mittels t-Test für gepaarte Stichproben analysiert. Das Signifikanzniveau wird für $p \leq 0,05$ festgelegt. Die SNR-Daten der hohen Zellzahl bei Gadophrin werden über die Pearson-Korrelation mit der Zellzahl korreliert.

Alle statistischen Berechnungen werden unter Verwendung eines „StatView“ 4.1-Computerprogramms (Fa. Abacus, Berkeley, U.S.A.) durchgeführt.

3.3 Ergebnisse

3.3.1.1 Kontrastmittelinjektion: Endorem und P7228

Die Signalintensitäten, quantifiziert als Signal-to-noise ratio (SNR, Signal-Rausch-Verhältnis) der Kontrastmittel Endorem und P7228 in den Organen Knochenmark, Leber und Milz werden einander gegenübergestellt. Sie sind aufgeführt als Mittelwerte mit Standardabweichung. Die SNR-Daten zeigen bei P7228 im Knochenmark einen deutlich stärkeren Signalintensitätsabfall nach 24 Stunden als bei Endorem (Abb.6-8, Tab. 8).

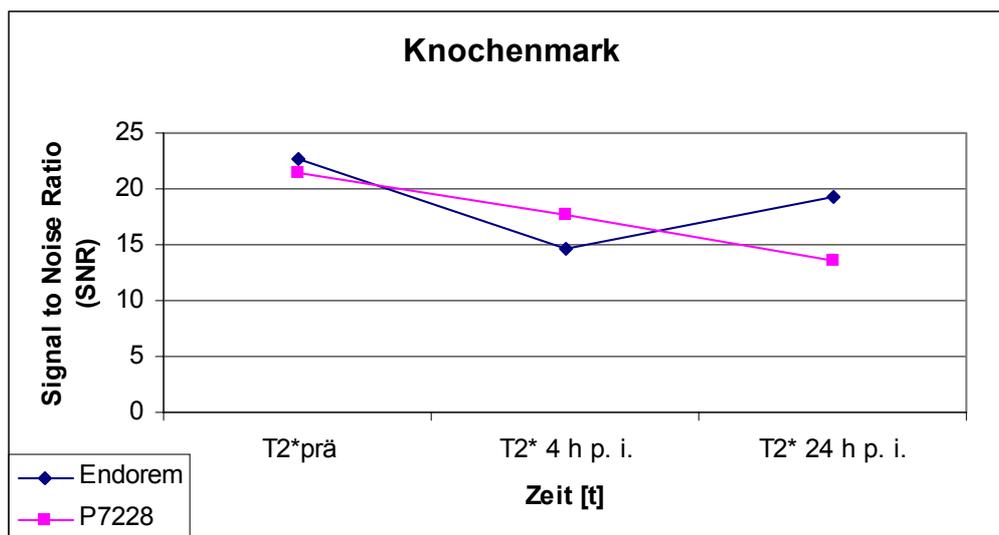


Abb. 6 SNR-Daten (Mittelwert aus n=9) vor und nach i.v. Injektion von Endorem und P7228, Knochenmark

Die Aufnahme von Endorem und P7228 in Milz und Leber zeigt kaum Unterschiede; die Kurvenverläufe der SNR-Daten sind nahezu identisch (Abb. 7 und 8).

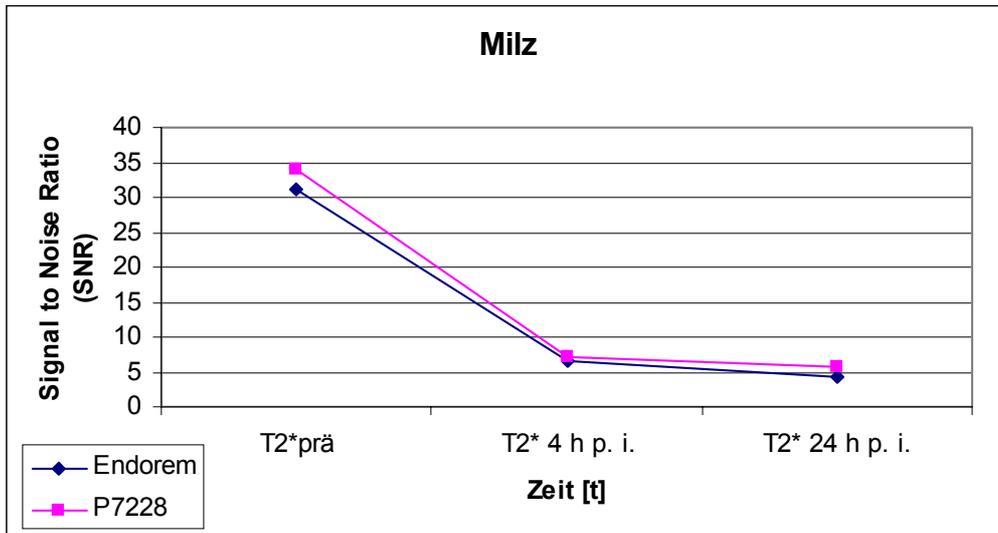


Abb. 7 SNR-Daten (Mittelwert aus n=9) vor und nach i.v. Injektion von Endorem und P7228, Milz

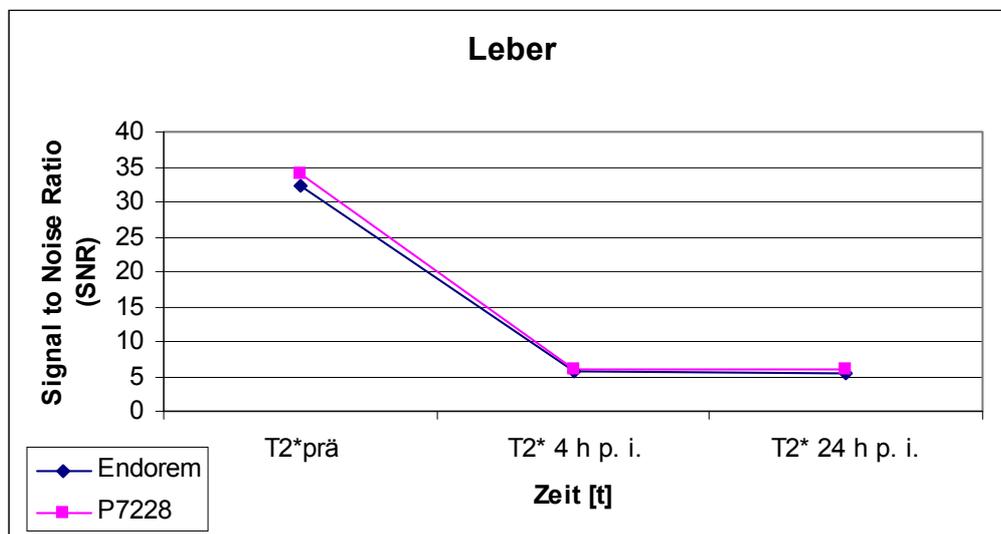


Abb. 8 SNR-Daten (Mittelwert aus n=9) vor und nach i.v. Injektion von Endorem und P7228, Leber

Tab. 8 SNR-Daten (jeweils Mittelwert aus n=9) vor und nach i.v. Injektion von Endorem und P7228 - Mittelwert m. Standardabweichung

T2*prä= SNR vor Kontrastmittel- bzw. Zellinjektion

T2*4 h p.i.= SNR vier Stunden nach Kontrastmittel- bzw. Zellinjektion

T2*24 h p.i.= SNR 24 Stunden nach Kontrastmittel- bzw. Zellinjektion

SNR= Signal to Noise Ratio, Signal-Rausch-Verhältnis

	T2*prä	Endorem i.v. 4 h	Endorem i.v. 24 h
Knochenmark	22,667 ± 4,630	14,632 ± 4,088	19,374 ± 5,688
Milz	31,173 ± 6,573	6,636 ± 2,639	4,410 ± 1,488
Leber	32,4 ± 3,554	5,58 ± 4,909	5,398 ± 4,744
	T2*prä	P7228 i.v. 4 h	P7228 i.v. 24 h
Knochenmark	21,411 ± 4,037	17,663 ± 2,946	13,498 ± 3,545
Milz	34,119 ± 7,243	7,020 ± 3,064	5,656 ± 2,780
Leber	34,07 ± 3,92	6,004 ± 2,479	5,883 ± 2,020

3.3.1.2 Zellinjektion der mit Endorem und P7228 markierten Zellen

Die Mäuse werden in Gruppen eingeteilt, eine Gruppe n=2 erhält eine intravenöse Injektion von markierten Zellen mit niedriger, n=2 mit mittlerer und n=6 mit hoher Zellzahl. Die Tabelle 9 zeigt eine Übersicht der Mittelwerte mit Standardabweichung der gemessenen SNR-Daten.

Tab. 9 MR-Signalintensitäten von Leber, Milz und Knochenmark, quantifiziert als Signal-Rausch-Verhältnis (Signal to noise ratio, SNR), t-Test für gepaarte Stichproben (Vergleich des SNR vor und nach Injektion des Kontrastmittels bzw. der markierten Zellen)

T2*prä= SNR vor Kontrastmittel- bzw. Zellinjektion, T2*4 h p.i.= SNR vier Stunden nach Kontrastmittel- bzw. Zellinjektion, T2*24 h p.i.= SNR 24 Stunden nach Kontrastmittel- bzw. Zellinjektion, SNR= Signal to Noise Ratio, Signal-Rausch-Verhältnis

SNR-Daten	Dosierung	Leber	Milz	Knochenmark
	vor Injektion	35,782 ± 12,114	31,444 ± 0,437	24,855 ± 5,060
mit Endorem	5 * 10 ⁶	19,72 ± 2,63 p= 0,2516	26,53 ± 6,07 p= 0,4338	20,08 ± 1,37 p= 0,4176
	vor Injektion	34,125 ± 5,204	30,941 ± 1,792	27,051 ± 2,052
markierte	2 * 10 ⁷	9,05 ± 2,67 p= 0,1391	14,08 ± 2,78 p= 0,0263	10,21 ± 3,64 p= 0,1603
	vor Injektion	35,746 ± 6,619	31,856 ± 10,186	26,598 ± 6,285
Zellen i.v.	3 * 10 ⁷	8,22 ± 6,81 p= 0,0001	11,71 ± 8,68 p= 0,0145	7,45 ± 5,28 p= 0,0012
	vor Injektion	32,4 ± 3,554	31,173 ± 6,573	22,667 ± 4,630
Kontrollen: Endorem i.v.	2 µl	5,39 ± 4,74 p< 0,0001	4,41 ± 1,49 p< 0,0001	19,37 ± 5,69 p= 0,2845
	vor Injektion	33,745 ± 2,477	29,881 ± 0,565	25,99 ± 6,49
mit P7228	1 * 10 ⁷	26,75 ± 7,67 p= 0,3079	22,70 ± 2,64 p= 0,1285	20,47 ± 11,49 p= 0,5201
	vor Injektion	32,454 ± 0,145	28,634 ± 3,645	28,033 ± 3,853
markierte	2 * 10 ⁷	19,82 ± 6,12 p= 0,2147	19,73 ± 4,82 p= 0,0591	18,59 ± 2,09 p= 0,2665
	vor Injektion	30,266 ± 3,272	28,657 ± 4,688	27,895 ± 7,860
Zellen i.v.	3 * 10 ⁷	16,87 ± 5,84 p= 0,0001	18,42 ± 5,82 p= 0,0158	11,54 ± 2,59 p= 0,0009
	vor Injektion	34,066 ± 3,921	34,119 ± 7,243	21,411 ± 4,037
Kontrollen: P7228 i.v.	2 µl	5,88 ± 2,02 p< 0,0001	5,56 ± 2,78 p< 0,0001	13,49 ± 3,55 p= 0,007

Endorem

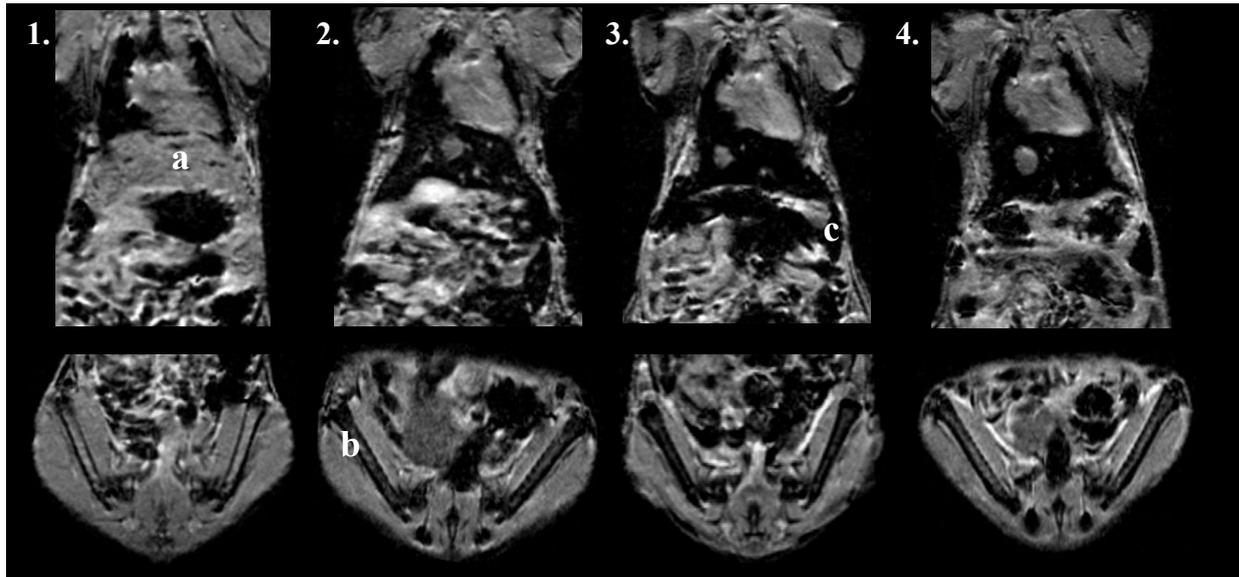


Abb. 9 MRT-Bilder nach Injektion von 30 Millionen mit Endorem markierten Zellen
a= Leber, b= Knochenmark Femur, c= Milz;
1. =Vor Kontrastmittelinjektion, 2. = nach 4 Stunden deutlicher Abfall der SI in Leber und Milz, 3. = nach 24 Stunden auch im Knochenmark des Femur, 4. = Kontrolle

P7228

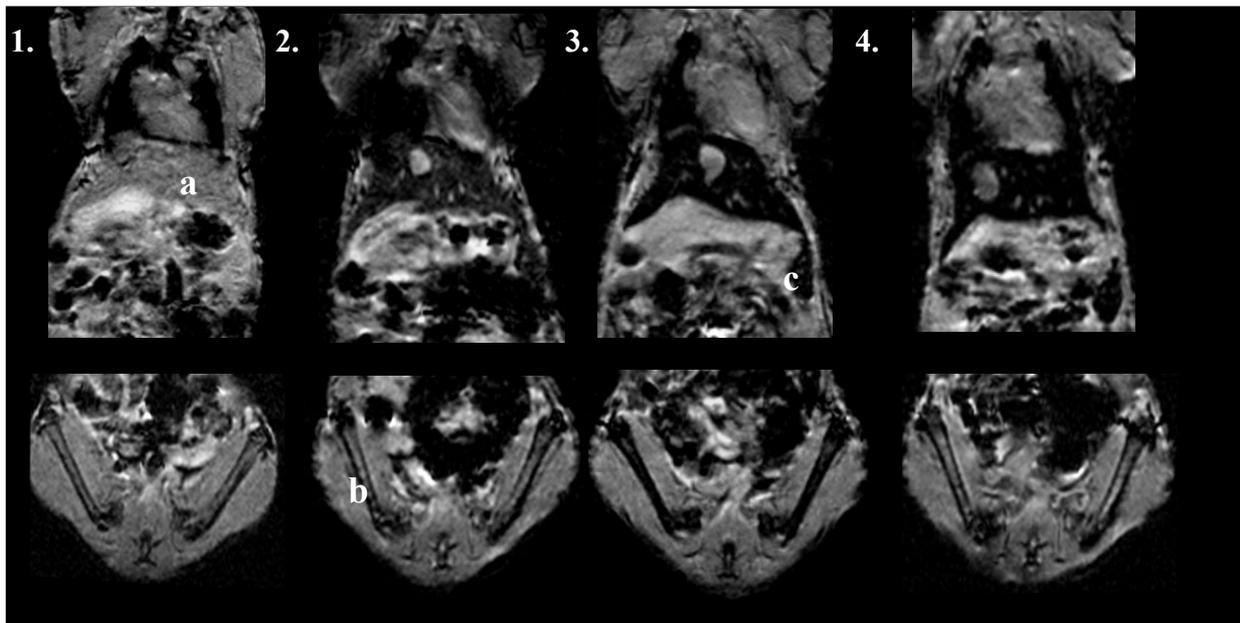


Abb. 10 MRT-Bilder nach Injektion von 30 Millionen mit P7228 markierten Zellen
a= Leber, b= Knochenmark Femur, c= Milz;
1. =Vor Kontrastmittelinjektion, 2. = nach 4 Stunden Abfall der SI in Leber und Milz, 3. = nach 24 Stunden deutlicher Abfall der SI im Knochenmark, 4. = Kontrolle

3.3.1.2.1 Knochenmark

Das Knochenmark zeigt nach Injektion von 20 Millionen mit Endorem markierten Zellen bereits einen deutlichen Abfall der SI nach vier Stunden, der sich nach 24 Stunden nochmals verstärkt ($p= 0,1603$). Bei Steigerung der Zellzahl auf 30 Millionen ist das Ergebnis noch deutlicher ($p= 0,0012$).

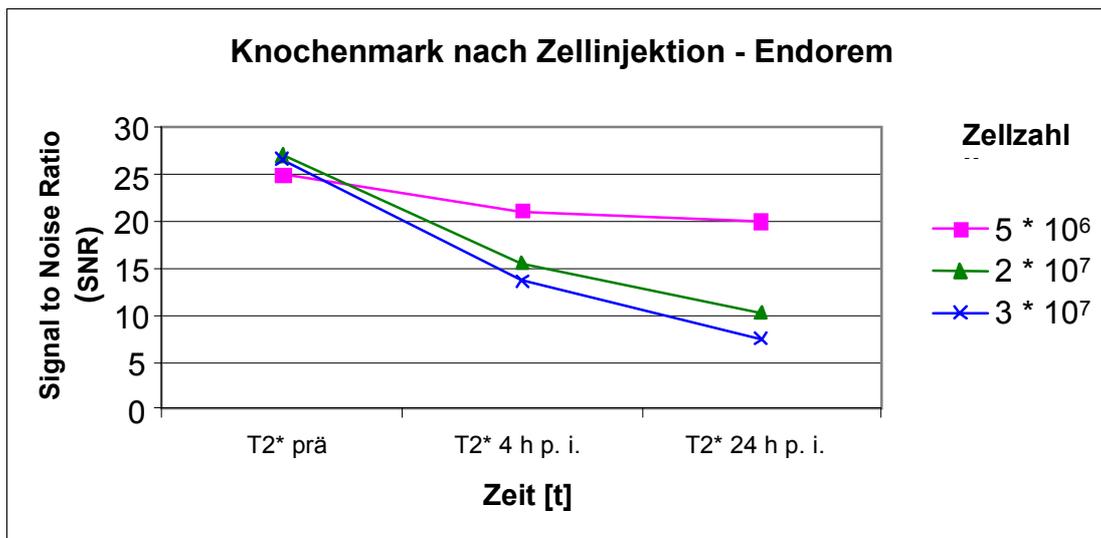


Abb. 11 SNR des Knochenmarkes nach Injektion von mit Endorem markierten Zellen

Mit P7228 markierte Zellen erzeugen im Knochenmark erst ab einer Zellzahl von 30 Millionen und erst nach 24 Stunden einen signifikanten Signalintensitätsabfall ($p=0,0009$).

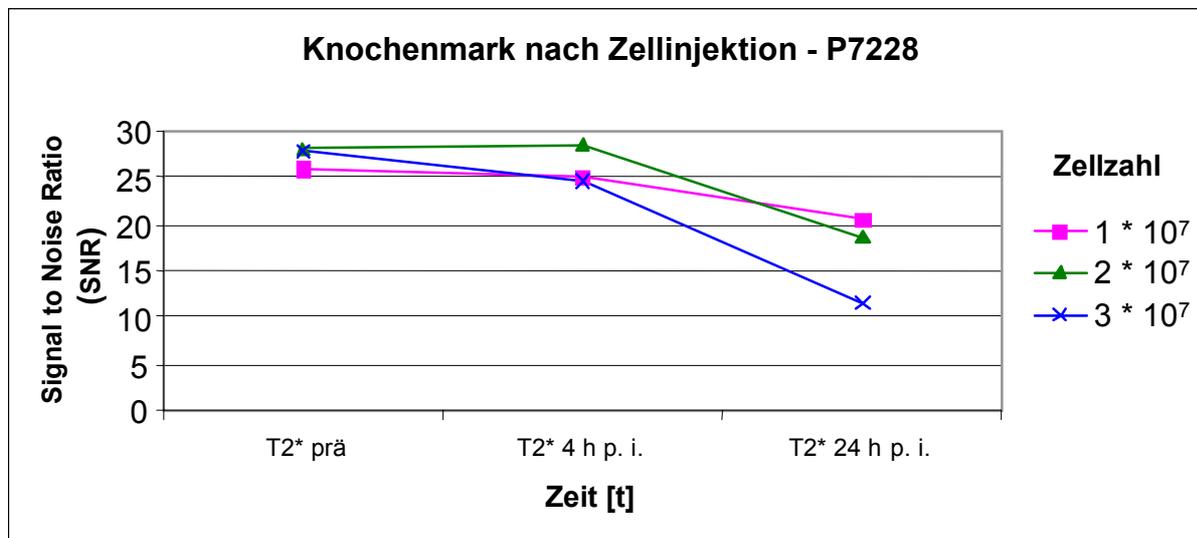


Abb. 12 SNR des Knochenmarkes nach Injektion von mit P7228 markierten Zellen

Tab. 10 SNR des Knochenmarkes nach Zellinjektion

T2*prä= SNR vor Kontrastmittel- bzw. Zellinjektion

T2*4 h p.i.= SNR vier Stunden nach Kontrastmittel- bzw. Zellinjektion

T2*24 h p.i.= SNR 24 Stunden nach Kontrastmittel- bzw. Zellinjektion

SNR= Signal to Noise Ratio, Signal-Rausch-Verhältnis

	Zellzahl	T2*prä	T2* 4 h p. i.	T2* 24 h p. i.
Endorem	5 * 10 ⁶	24,855 ± 5,060	21,052 ± 0,859	20,082 ± 0,137
	2 * 10 ⁷	27,051 ± 2,052	15,521 ± 5,950	10,212 ± 4,074
	3 * 10 ⁷	26,598 ± 6,285	13,675 ± 7,405	7,453 ± 5,282
P7228	1 * 10 ⁷	25,99 ± 6,487	25,157 ± 2,835	20,465 ± 11,49
	2 * 10 ⁷	28,033 ± 3,853	28,496 ± 9,552	18,595 ± 2,086
	3 * 10 ⁷	27,895 ± 7,860	24,635 ± 5,927	11,544 ± 2,56

3.3.1.2.2 Milz

In der Milz ist nach Injektion von mit Endorem markierten Zellen ein signifikanter Abfall der SI bereits nach vier Stunden zu sehen (Abb. 13, Tab. 11). Es wird eine Zellzahl von 20 Millionen benötigt; nach 24 Stunden verringert sich die SI nur noch wenig ($p [2 * 10^7] = 0,0263$, $p [3 * 10^7] = 0,0145$).

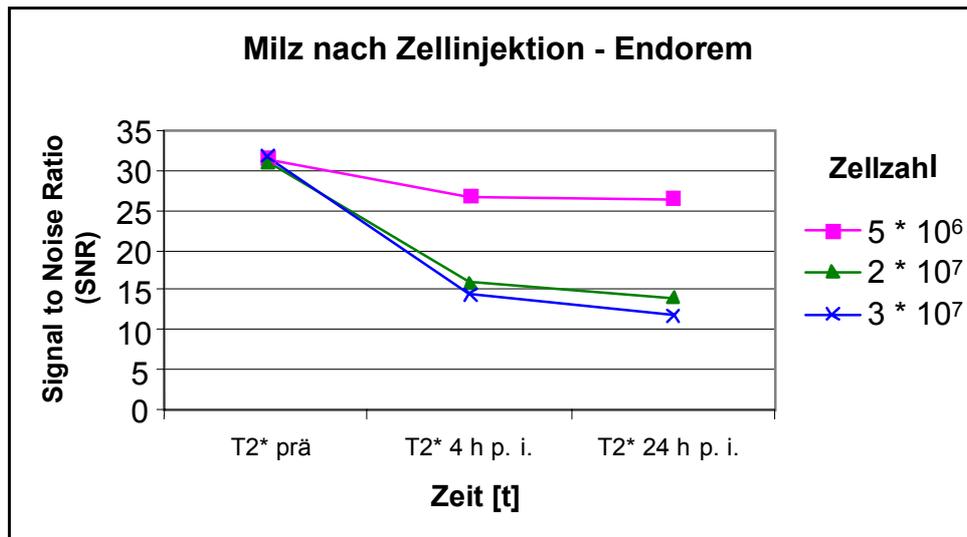


Abb. 13 SNR der Milz nach Injektion von mit Endorem markierten Zellen

Nach Injektion von P7228 zeigt sich erst nach 24 Stunden ein signifikanter Signalintensitätsabfall ab einer Zellzahl von 30 Millionen ($p = 0,0158$).

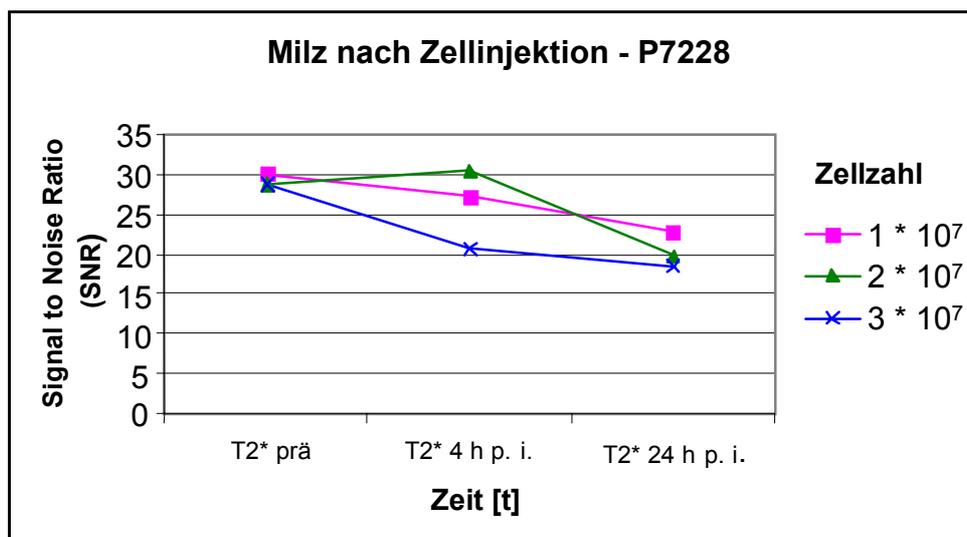


Abb. 14 SNR der Milz nach Injektion von mit P7228 markierten Zellen

Tab. 11 SNR der Milz nach Zellinjektion

T2*prä= SNR vor Kontrastmittel- bzw. Zellinjektion

T2*4 h p.i.= SNR vier Stunden nach Kontrastmittel- bzw. Zellinjektion

T2*24 h p.i.= SNR 24 Stunden nach Kontrastmittel- bzw. Zellinjektion

SNR= Signal to Noise Ratio, Signal-Rausch-Verhältnis

	Zellzahl	T2*prä	T2* 4 h p. i.	T2* 24 h p. i.
Endorem	$5 * 10^6$	31,444	26,841	26,529
		± 0,437	± 6,194	± 6,074
	$2 * 10^7$	30,941	16,028	14,083
		± 1,792	± 4,989	± 2,778
	$3 * 10^7$	31,865	14,581	11,708
		±10,186	± 10,069	± 8,677
P7228	$1 * 10^7$	29,881	27,304	22,702
		± 0,565	± 3,655	± 2,642
	$2 * 10^7$	28,634	30,584	19,726
		±3,645	± 7,273	± 4,818
	$3 * 10^7$	28,657	20,875	18,422
		± 4,688	± 5,611	± 5,828

3.3.1.2.3 Leber

Die mit Endorem markierten Zellen haben in der Leber den gleichen Effekt wie in der Milz, ein signifikanter Abfall der SI bereits nach vier Stunden (Abb. 15, Tab. 12).

Nach Injektion von 20 Millionen mit Endorem markierten Zellen ist ein Abfall der SI bereits nach vier Stunden zu sehen, der sich nach 24 Stunden kaum verstärkt ($p= 0,1391$). Die hohe Zellzahl verursacht einen deutlich signifikanten Signalintensitätsabfall ($p= 0,0001$).

Die niedrige Zellzahl erzeugt in der Milz einen noch geringeren Abfall der SI als in der Leber (p [Leber]= 0,2526, p [Milz]= 0,4338).

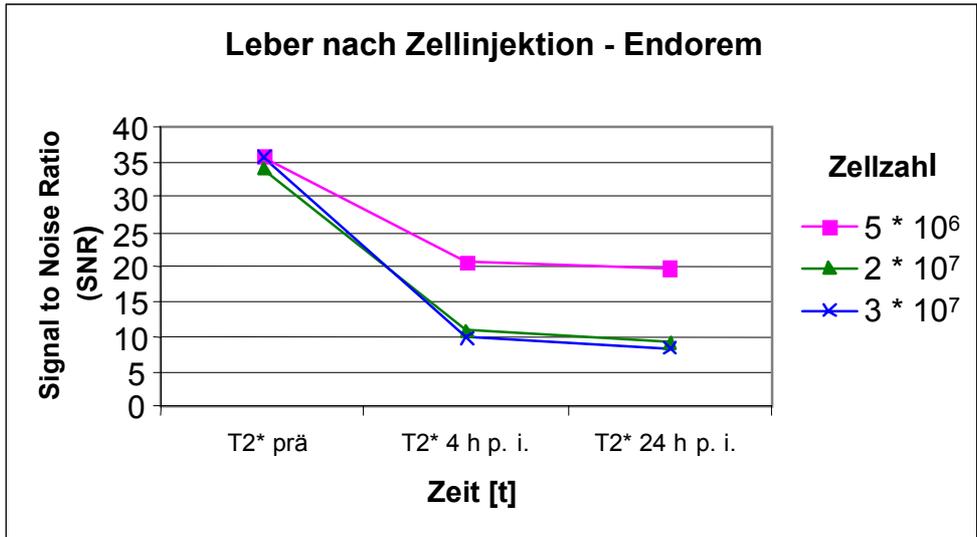


Abb. 15 SNR der Leber nach Injektion von mit Endorem markierten Zellen

Der Effekt durch P7228 ist schwächer, die SI der mittleren ($p=0,2174$) und hohen Zellzahl ($p=0,0001$) unterscheiden sich hier jedoch etwas mehr als bei Endorem (Abb. 16).

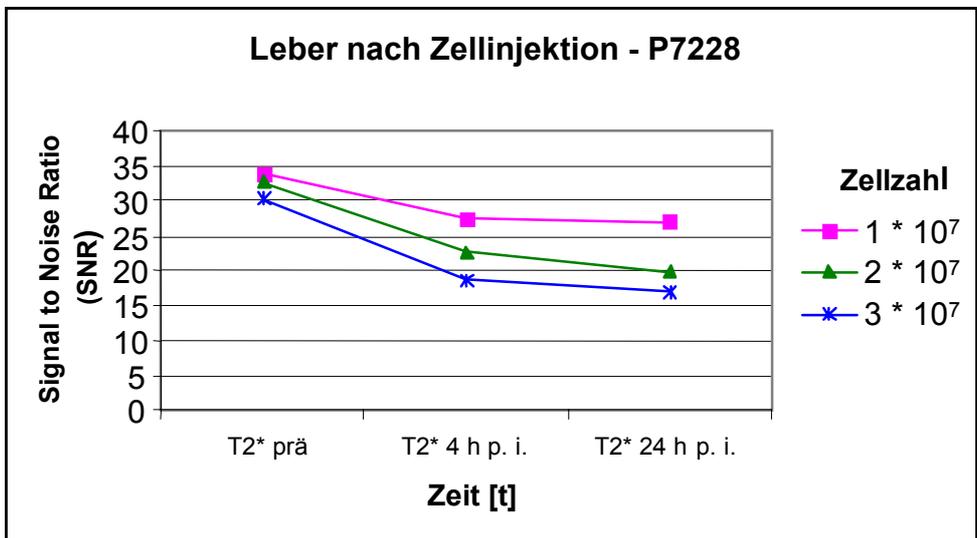


Abb. 16 SNR der Leber nach Injektion von mit P7228 markierten Zellen

Tab. 12 SNR der Leber nach Zellinjektion

T2*prä= SNR vor Kontrastmittel- bzw. Zellinjektion

T2*4 h p.i.= SNR vier Stunden nach Kontrastmittel- bzw. Zellinjektion

T2*24 h p.i.= SNR 24 Stunden nach Kontrastmittel- bzw. Zellinjektion

SNR= Signal to Noise Ratio, Signal-Rausch-Verhältnis

	Zellzahl	T2*prä	T2* 4 h p. i.	T2* 24 h p. i.
Endorem	$5 * 10^6$	35,782 ± 12,114	20,544 ± 2,541	19,716 ± 2,634
	$2 * 10^7$	34,125 ± 5,204	10,903 ± 3,292	9,051 ± 2,668
	$3 * 10^7$	35,746 ± 6,619	9,728 ± 7,716	8,217 ± 6,807
P7228	$1 * 10^7$	33,745 ± 2,477	27,424 ± 9,294	26,75 ± 7,674
	$2 * 10^7$	32,454 ± 0,145	22,495 ± 4,217	19,822 ± 6,117
	$3 * 10^7$	30,266 ± 3,272	18,635 ± 2,329	16,871 ± 5,838

3.3.1.2.4 Histologie

In den Zielorganen Knochenmark, Milz und Leber stellen sich mit Eisenoxiden markierte humane Vorläuferzellen nach Dextran-Färbung rot, nach CD31-Immunhistochemie braun dar (siehe 3.2.6.2.1). Anti-Dextran-Färbungen zeigen, dass die Organe der Maus die in humanen Zellen eingeschlossenen, von einer Dextran-Hülle umgebenen Eisenoxid-Kontrastmittel enthalten. Anti-CD31-Färbungen beweisen, dass humane Vorläuferzellen sich 24 Stunden nach der Zellinjektion in den Zielorganen der Maus verteilen. Kontrolluntersuchungen von Mäusen, die keine Zellinjektion erhalten, zeigen, dass zwischen den körpereigenen Zellen der Maus und den jeweiligen histologischen Nachweismethoden keine Kreuzreaktionen stattfinden. Es wird im Interstitium der Zielorgane kein freies Kontrastmittel gefunden.

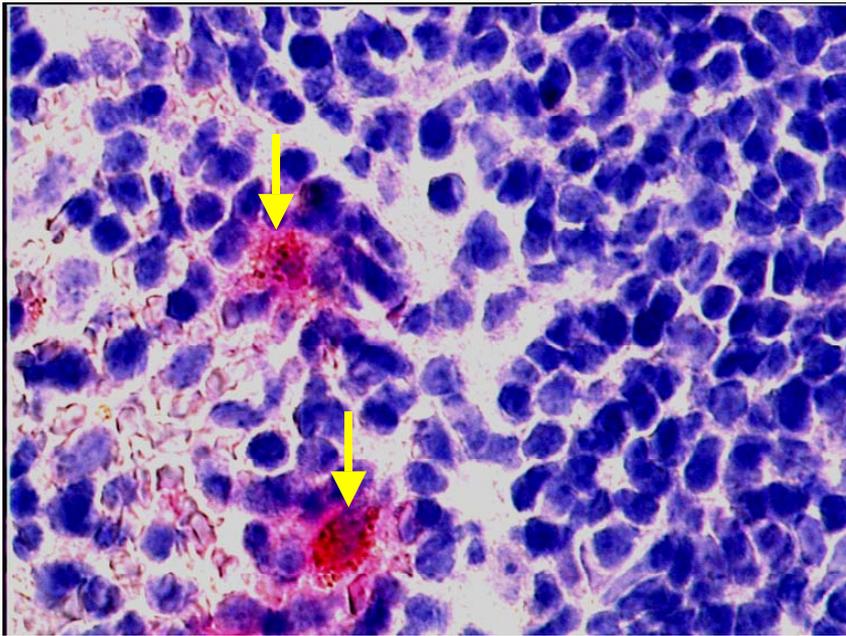


Abb. 17 Anti-Dextran-Färbung des Knochenmarkes 24 Stunden nach Injektion von mit Eisenoxid-Kontrastmitteln markierten humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen (Pfeile), Endvergrößerung 1:1200

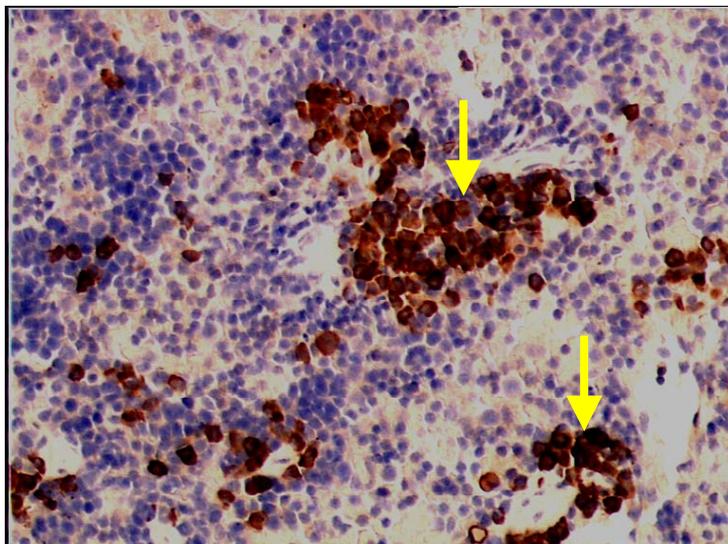


Abb. 18 Anti-CD31-Färbung der Milz 24 Stunden nach Injektion von mit Eisenoxid-Kontrastmitteln markierten humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen (Pfeile), Endvergrößerung 1:630

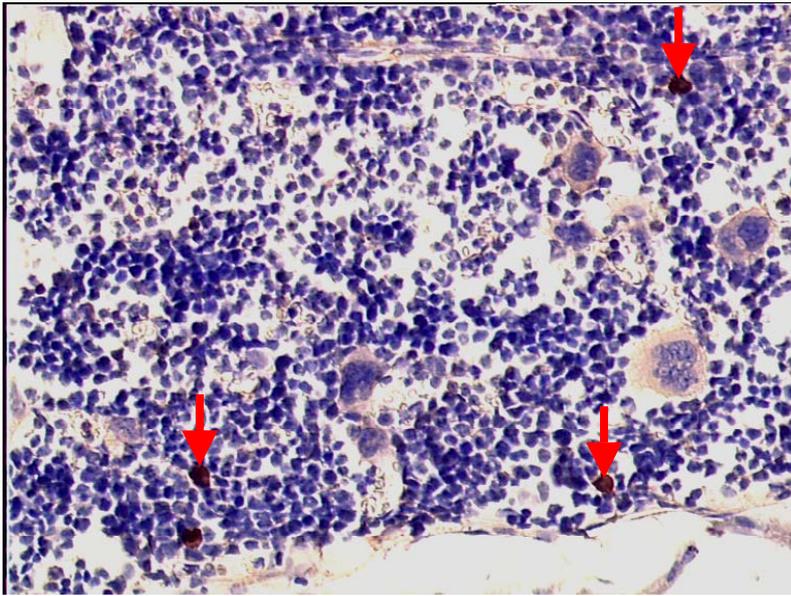


Abb. 19 Anti-CD31-Färbung des Knochenmarkes 24 Stunden nach Injektion von mit Eisenoxid-Kontrastmitteln markierten humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen (Pfeile), Endvergrößerung 1:630

3.3.1.2.5 Kolonie-Assay

Die Anzahl von Burst-forming erythroid units (BFU-E), Granulozyt-erythroid-makrophage-megakaryozyt- (CFU-GEMM) und Granulozyt-makrophage colony forming units (CFU-GM), dargestellt als Mittelwerte mit Standardabweichung, nach Kultur von 20.000 Zellen aus Nabelschnurblut (davon 100 CD-34+ Zellen) wird gezeigt. Die Methoden der Zellmarkierung beeinflussen die Wachstums- und Differenzierungseigenschaften der Zellen nicht (Tab. 13).

Tab. 13 Kolonie-Assay nicht markierter und Endorem- bzw. P7228-markierter humaner Vorläuferzellen

Zellen	BFU-E	CFU-GEMM	CFU-GM	Gesamt CFU
CD34+	2,8 ± 0,4	2,7 ± 0,5	18,0 ± 2,5	23,5 ± 3,3
Endorem®	4,3 ± 0,2	5,1 ± 2,0	17,7 ± 1,4	27,1 ± 3,4
P7228	6,5 ± 2,8	3,8 ± 0,2	19,9 ± 2,6	30,2 ± 4,1

3.3.1.3 Injektion von mit Gadophrin markierten Zellen

Die Mäuse, die eine Injektion von mit Gadophrin markierten Zellen erhalten, werden ebenfalls in drei Gruppen aufgeteilt, mit niedriger (1 Million Zellen), mittlerer (20 Millionen Zellen) und hoher Zellzahl (70 Millionen Zellen). Die Injektion niedriger und mittlerer Zellzahlen von 1 bis 20 Millionen verursacht auf dem MRT-Bild keine signifikante Steigerung der Signalintensität. Um einen signifikanten Anstieg der Signalintensität zu erzeugen, wird eine Zellzahl >30 Millionen benötigt.

Im Bereich der hohen Zellzahl bestehen erhebliche Unterschiede in der Menge an Zellen, die den einzelnen Mäusen verabreicht wurde, von 30 Millionen bis 170 Millionen Zellen. Die variierenden Zellzahlen lassen sich auch auf Ungenauigkeiten des Zellcounter Casy 1 TT (Schärfe System) zurückführen, der in einem Bereich von über 40 Millionen Zellen zu zählenden Zellen ungenau ist. Es besteht jedoch aus statistischer Sicht in diesem Bereich formal keine signifikante Korrelation zwischen Zellzahl und SNR-Daten (siehe Abb. 18-25). Aus diesem Grund wird ein Mittelwert von 70 Millionen Zellen zur Grundlage genommen.

3.3.1.3.1 Knochenmark

In der Tabelle 15 sind die SNR-Daten als Mittelwerte mit Standardabweichung nach Injektion von Gadophrin und Zellen, gemessen am Femur des Knochenmarkes, dargestellt. Der Signalintensitätsanstieg im Knochenmark ist 24 Stunden nach Injektion der hohen Zellzahl signifikant ($p=0,0192$). Die Abbildung 17 stellt diese Ergebnisse graphisch dar. In der Abbildung 18 werden die Einzelergebnisse in der Gruppe mit der Injektion der hohen Zellzahl, Mittelwert 70 Millionen Zellen, dargestellt.

Tab. 14 SNR des Knochenmarkes vor und nach Injektion von Gadophrin + Zellen

T2*prä= SNR vor Kontrastmittel- bzw. Zelinjektion, T2*4 h p.i.= SNR vier Stunden nach Kontrastmittel- bzw. Zelinjektion, T2*24 h p.i.= SNR 24 Stunden nach Kontrastmittel- bzw. Zelinjektion, SNR= Signal to Noise Ratio, Signal-Rausch-Verhältnis

Zellzahl	T1 prä	T1 4 h p. i.	T1 24 h p. i.
1 * 10 ⁶ p= 0,1136	41,003 ± 4,702	43,532 ± 3,318	45,857 ± 2,879
2 * 10 ⁷ p= 0,2880	42,269 ± 1,455	43,902 ± 2,739	51,183 ± 9,203
7 * 10 ⁷ p= 0,0192	46,323 ± 3,406	45,524 ± 5,175	54,571 ± 4,192

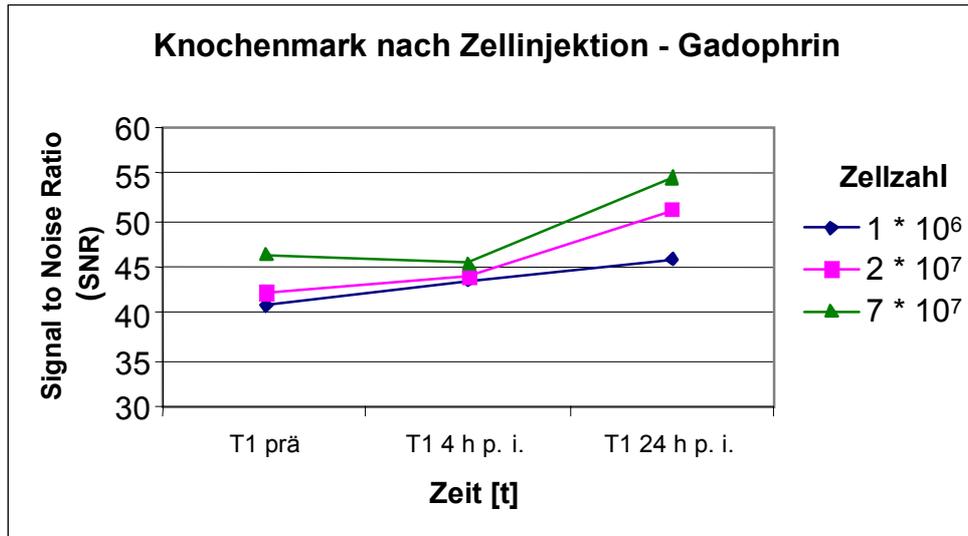


Abb. 17 SNR des Knochenmarkes nach Injektion von mit Gadophrin markierten Zellen

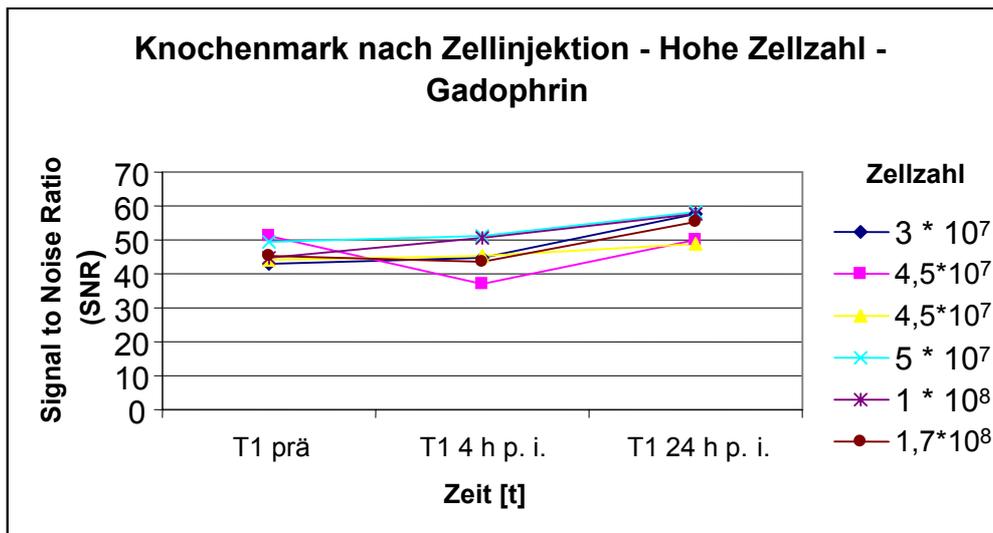


Abb. 18 Knochenmark: Übersicht über Einzelergebnisse bei hoher Zellzahl

Die Steigerung der SI nach 24 Stunden wird ermittelt, indem die SI vor Kontrastmittelinjektion von der SI nach Kontrastmittelinjektion abgezogen wird (SNR 24 h – SNR prä). Das Ergebnis (Delta SNR) wird den differierenden Zellzahlen gegenübergestellt (Abb. 19). Erhöhungen der Zellzahlen erzeugen keine signifikanten Erhöhungen der SNR-Daten. Im untersuchten Bereich von 30 bis 170 Millionen Zellen besteht keine signifikante Korrelation der Einzelwerte bei der hohen Zellzahl ($r^2=0,05$).

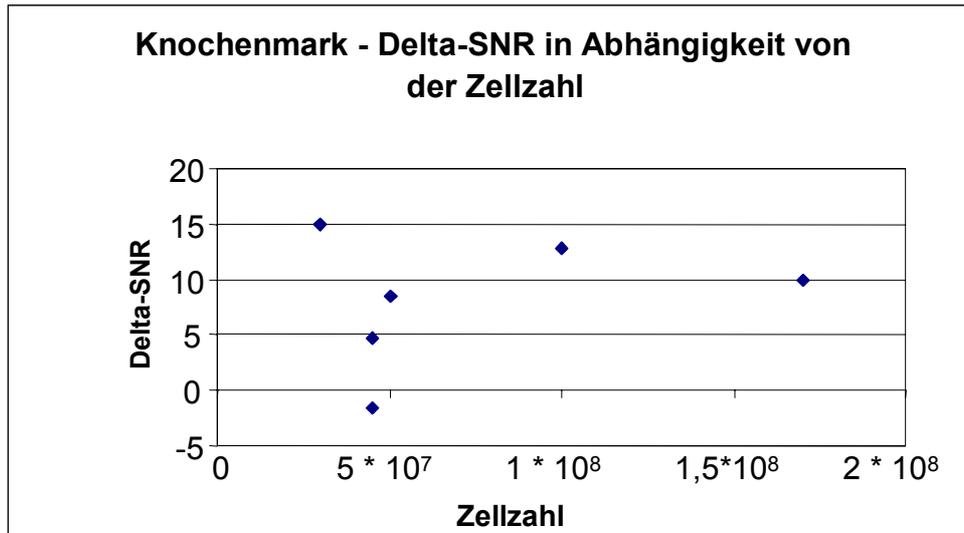


Abb. 19 Knochenmark: Korrelation der SNR-Daten mit der Zellzahl;
Delta-SNR= [SNR24 h – SNRprä]; Korrelationskoeffizient $r^2= 0,05$

3.3.1.3.2 Milz

Die Tabelle 15 zeigt die SNR-Daten, die in der Milz gemessen werden. In der Milz reicht für einen signifikanten Signalintensitätsanstieg nach 24 Stunden eine Konzentration von 20 Millionen mit Gadophrin markierten Zellen aus ($p= 0,0158$). Deutlich signifikant ist der Anstieg bei hoher Zellzahl nach 24 Stunden ($p= 0,0016$).

Im untersuchten Bereich von 30 bis 170 Millionen Zellen korrelieren die SNR-Daten nicht signifikant mit der Signalintensität ($r^2=0,05$), dargestellt in Abb. 22.

Tab. 15 SNR der Milz vor und nach Injektion von Gadophrin + Zellen

T2*prä= SNR vor Kontrastmittel- bzw. Zellinjektion, T2*4 h p.i.= SNR vier Stunden nach Kontrastmittel- bzw. Zellinjektion, T2*24 h p.i.= SNR 24 Stunden nach Kontrastmittel- bzw. Zellinjektion, SNR= Signal to Noise Ratio, Signal-Rausch-Verhältnis

Zellzahl	T1 prä	T1 4 h p. i.	T1 24 h p. i.
$1 \cdot 10^6$ $p= 0,0521$	51,089 $\pm 4,702$	53,803 $\pm 4,106$	55,829 $\pm 4,536$
$2 \cdot 10^7$ $p= 0,0158$	44,37 $\pm 0,383$	52,057 $\pm 1,215$	54,452 $\pm 4,462$
$7 \cdot 10^7$ $p= 0,0016$	50,04 $\pm 8,964$	54,865 $\pm 7,353$	59,414 $\pm 8,989$

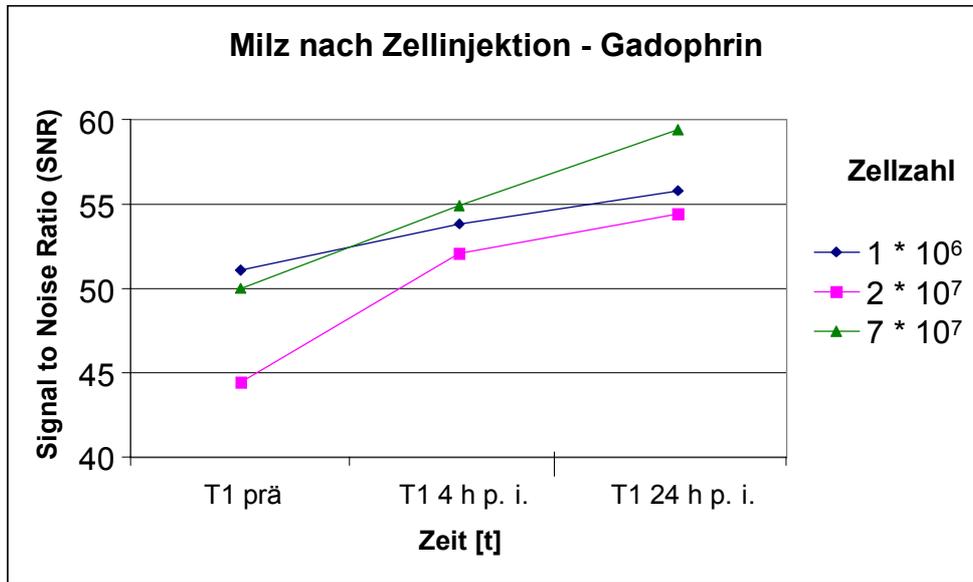


Abb. 20 SNR der Milz nach Injektion von mit Gadophrin markierten Zellen

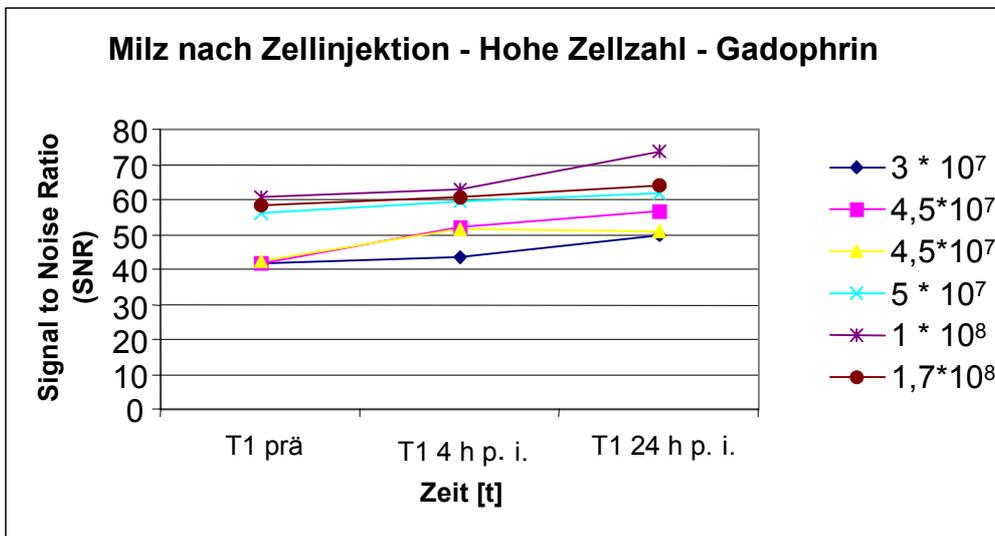


Abb. 21 Milz: Übersicht über Einzelergebnisse bei hoher Zellzahl

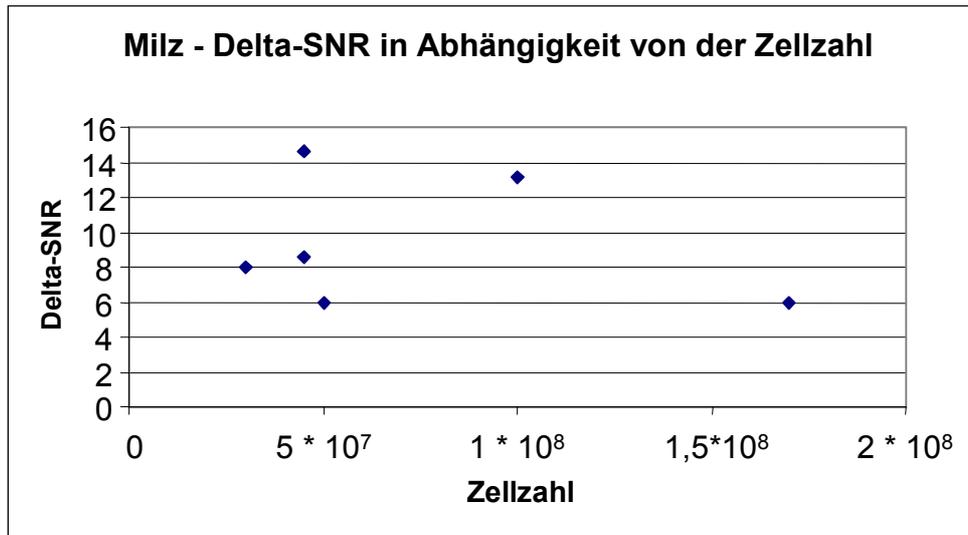


Abb. 22 Milz: Korrelation der SNR-Daten mit der Zellzahl;
Delta-SNR= [SNR24 h –SNR prä]; Korrelationskoeffizient $r^2= 0,05$

3.3.1.3.3 Leber

Der Anstieg der SI ist in der Leber bei hoher Zellzahl nach 24 Stunden deutlich signifikant ($p=0,0207$), wie die Abb. 23 zeigt. Es besteht hier ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang zwischen Zellzahl und Signalintensitätsanstieg ($r^2=0,09$), dargestellt in der Abb. 25.

Tab. 16 SNR der Leber vor und nach Injektion von Gadophrin + Zellen

T2*prä= SNR vor Kontrastmittel- bzw. Zelinjektion, T2*4 h p.i.= SNR vier Stunden nach Kontrastmittel- bzw. Zelinjektion, T2*24 h p.i.= SNR 24 Stunden nach Kontrastmittel- bzw. Zelinjektion, SNR= Signal to Noise Ratio, Signal-Rausch-Verhältnis

Zellzahl	T1 prä	T1 4 h p. i.	T1 24 h p. i.
$1 \cdot 10^6$ $p= 0,3002$	56,972 $\pm 5,758$	60,725 $\pm 6,309$	68,604 $\pm 2,631$
$2 \cdot 10^7$ $p=0,1208$	60,807 $\pm 14,903$	65,564 $\pm 16,060$	71,626 $\pm 18,103$
$7 \cdot 10^7$ $p= 0,0207$	58,975 $\pm 4,846$	70,708 $\pm 7,128$	77,382 $\pm 10,89$

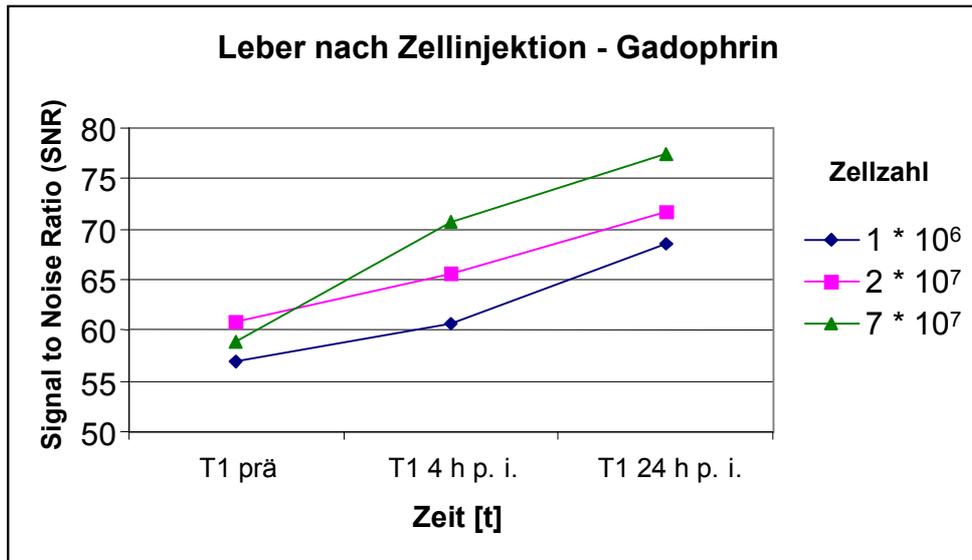


Abb. 23 SNR der Leber nach Injektion von mit Gadophrin markierten Zellen

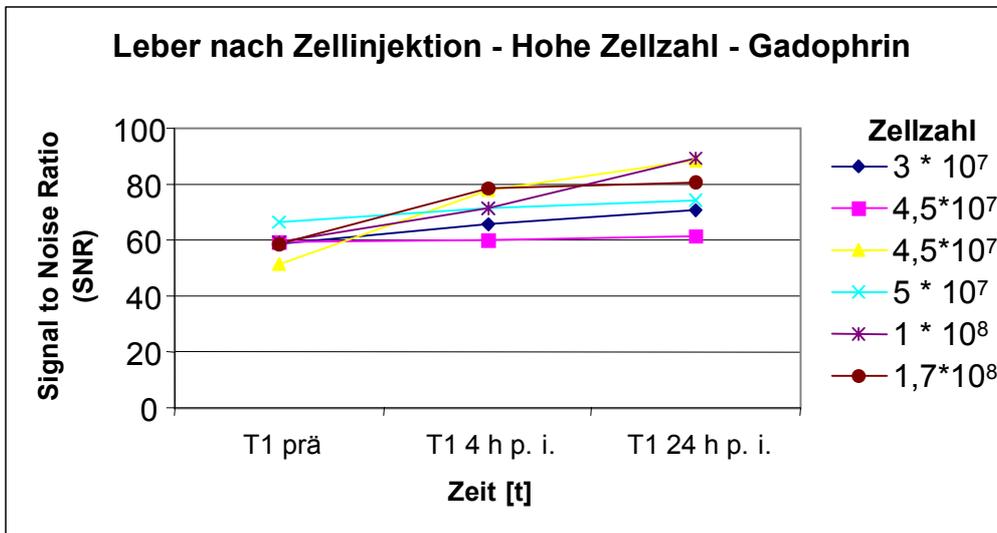


Abb. 24 Leber: Übersicht über Einzelergebnisse bei hoher Zellzahl

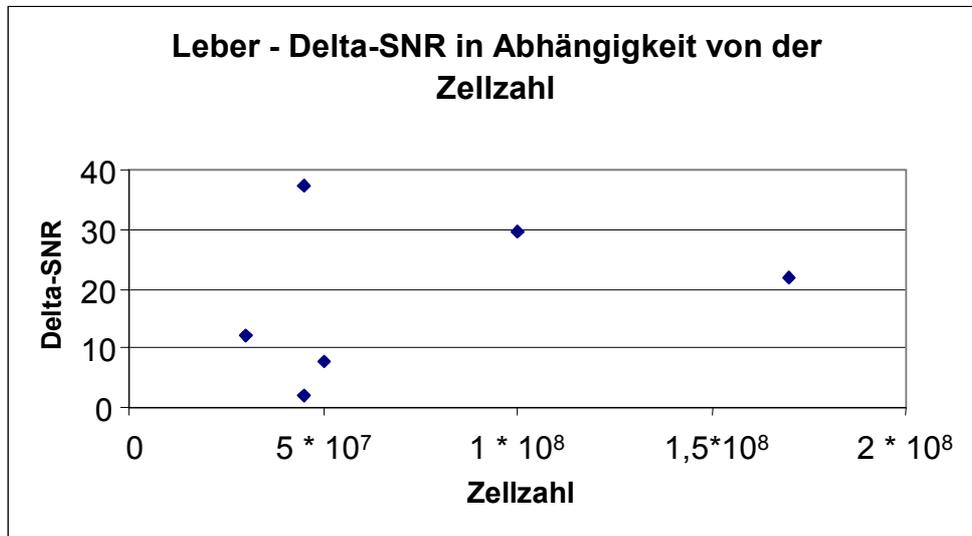
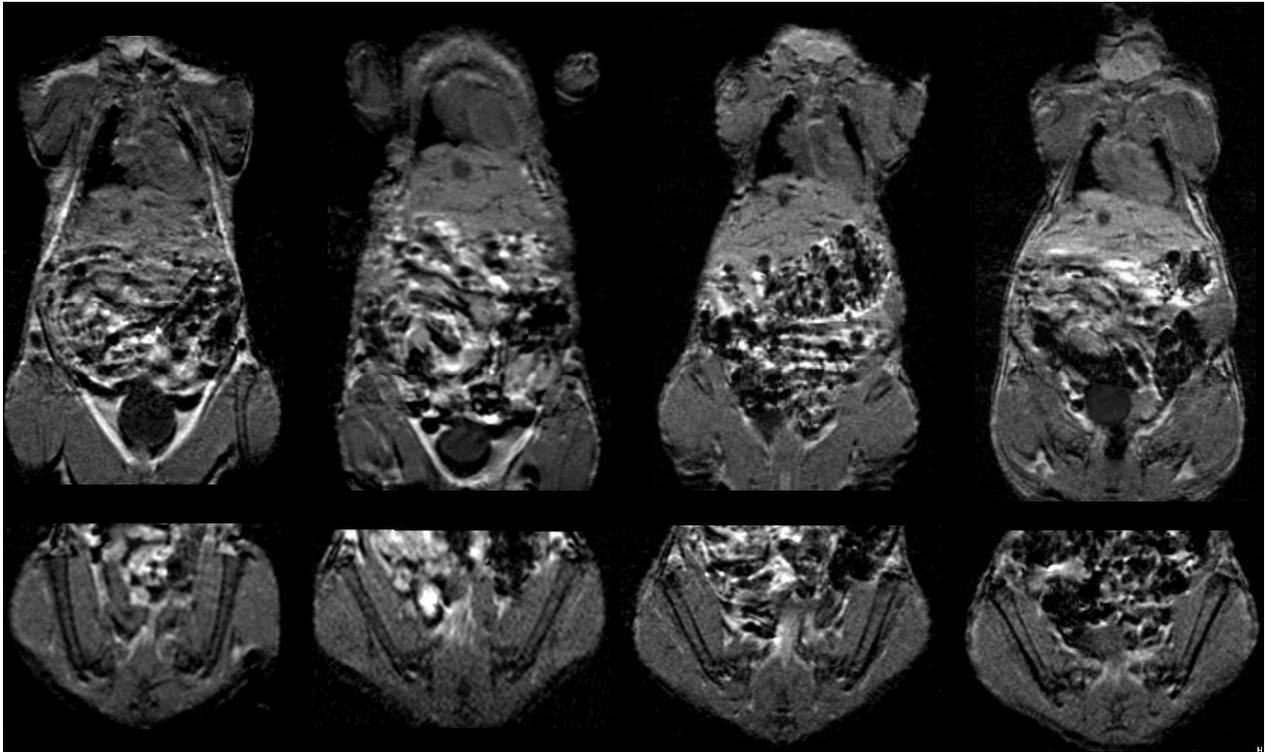


Abb. 25 Leber: Korrelation der SNR-Daten mit der Zellzahl; Delta-SNR= [SNR24 h – SNRprä]; Korrelationskoeffizient $r^2= 0,09$



a)

b)

c)

d)

Abb. 26 MRT-Bilder der Mäuse mit Injektion von mit Gadophrin markierten Zellen; a) Vor, b) eine, c) vier und d) 24 Stunden nach Zelinjektion; der Anstieg der SI ist in Leber und Milz nach 4 und deutlicher nach 24 Stunden erkennbar, nach 24 Stunden auch im Knochenmark

3.3.1.4. Ergebnisse des Optical Imaging

Mit dem Optical Imager kann die In-vivo-Verteilung des Gadophrin-2 ebenfalls dargestellt werden. Nach 1 Stunde befindet sich eine große Zellmenge in der Lunge, nach 4 Stunden kann man eine Umverteilung in Leber und Milz beobachten. Nach 24 Stunden sind viele Zellen im Knochenmark der Wirbelsäule erkennbar, nach 48 Stunden auch sehr deutlich in Humerus, Femur und in Leber und Milz.

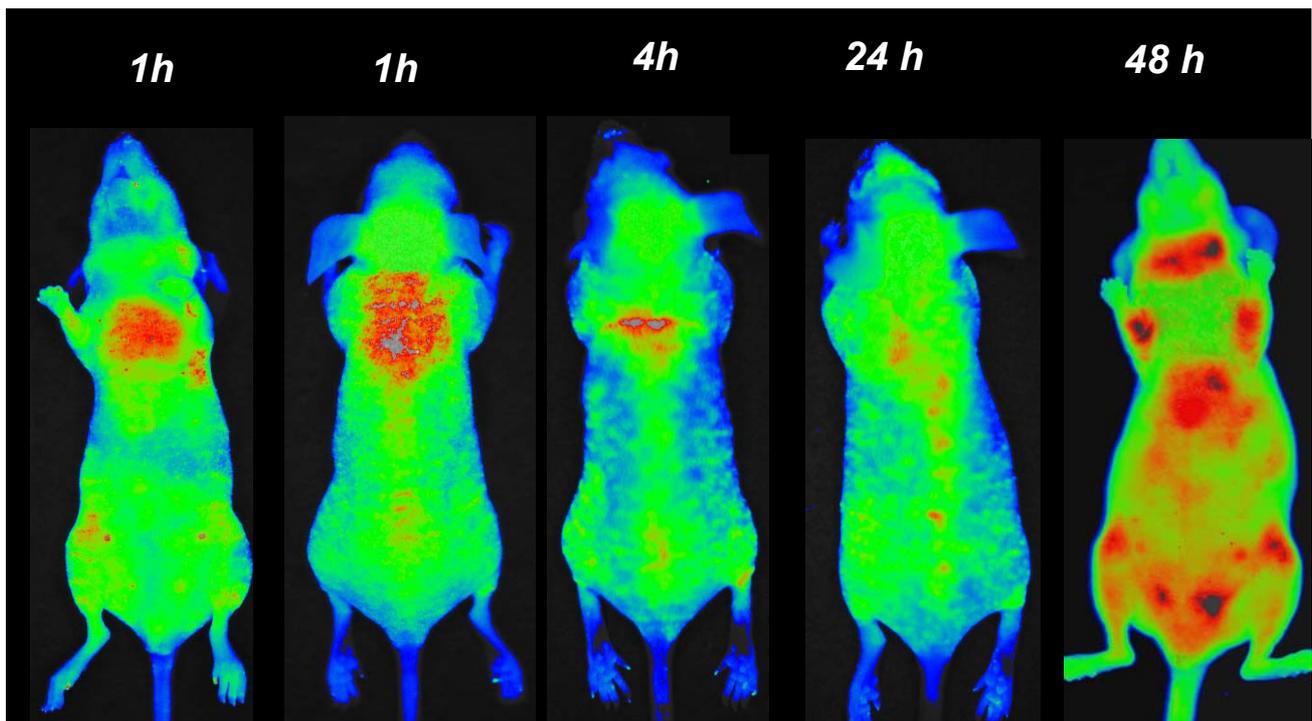


Abb. 27 Darstellung der In-vivo-Verteilung von Gadophrin im Optical Imager, in Bauch- und Rückenlage, 1, 4, 24 und 48 Stunden nach Zellinjektion

4 Diskussion

Neue Behandlungsmethoden in Onkologie, Kardiologie, Neurologie und Orthopädie basieren auf der Transplantation von Stammzellen. Um die Effektivität dieser Stammzelltransplantationen überwachen zu können, steigt der Bedarf an Techniken, die es ermöglichen, die Bioverteilung und das Homing der transplantierten Zellen nichtinvasiv und wiederholt in vivo im Organismus zu verfolgen. Bisher erfolgt dies über histologische Methoden, invasiv über Biopsate, und im Tierversuch nach dem Tod des Tieres.

Die Magnetresonanztomographie ist dafür ein geeignetes Verfahren, da sie eine hohe anatomische Auflösung bietet (minimale Schichtdicken von 100 μm und 25 bis 50 μm in plane) und die Möglichkeit besteht, den gesamten Körper dreidimensional darzustellen. Um mit der MRT visualisiert werden zu können, ist eine Markierung der Zellen mit MRT-Kontrastmitteln erforderlich.

Methoden der Zellmarkierung, die für den klinischen Gebrauch einsetzbar sind, sollten den folgenden Anforderungen genügen:

- es sollten für den klinischen Gebrauch zugelassene Standard-Kontrastmittel verwendet werden, die mit einfachen Methoden in die Zellen eingeschleust werden können,
- die Aufnahme der Kontrastmittel in die Zellen sollte hocheffizient sein, um auch eine geringe Anzahl von Zellen detektieren zu können
- die markierten Zellen sollten in einem Standard-MRT bereits bei einer Feldstärke von 1,5 Tesla aufzufinden sein, um eine klinische Anwendung zu ermöglichen
- das Markieren der Zellen sollte möglichst wenig zytotoxisch sein, die Wachstums- und Differenzierungseigenschaften der Zellen möglichst wenig beeinträchtigen und die Zelloberflächeneigenschaften nicht verändern
- Kontrastmittel und potentiell benötigte Transfektionsagentien sollten in vivo gut verträglich sein.

In der Vergangenheit gelang es, mit neuen, nicht FDA (Food and Drug Administration) zugelassenen paramagnetischen Substanzen, Magnetodendrimeren, Stammzellen zu markieren und diese in vivo mit der MRT mit Feldstärken $\leq 1,5$ Tesla nachzuweisen (BULTE et al. 2002).

Andere Methoden der Zellmarkierung, wie die Rezeptor vermittelte Endozytose (SHEN et al. 1993, BULTE et al. 1999, 2001) und Membran-Translokations-Signale, wie z.B. das virusvermittelte HIV-Tat-Peptid (BHORADE et al. 1999, BULTE et al. 1999) und andere Tat-Proteine (JOSEPHSON et al. 1999, LEWIN et al. 2000), ließen bisher nur einen Nachweis der

markierten Stammzellen in vitro zu. Mit zugelassenen Eisenoxiden, die mit standardisierten Transfektionsprotokollen, u.a. Lipofectamin, in die Zellen eingebracht wurden, gelang der Nachweis von markierten Stammzellen in vitro im MRT (FRANK et al. 2002).

Lymphozyten und Monozyten konnten mit klinisch zugelassenen Eisenoxiden über simple Inkubation markiert und in vitro mit der MRT visualisiert werden (SIPE et al. 1999). Neue große endosomal aufgenommene Eisenoxid-Kontrastmittel ermöglichen die Darstellung von einzelnen hämatopoetischen CD34+ Stammzellen und mesenchymalen Zellen mit der MRT bei 11,7 Tesla auf zellulärer Ebene (HINDS et al. 2003).

Viele der aktuellen Methoden erfordern MRT-Geräte mit einer Feldstärke von 4 bis 14 Tesla, die für die Untersuchungen am Menschen nicht zugelassen sind.

In der vorliegenden Studie verwendete man für die Zellmarkierung Ferumoxides (Endorem®), ein seit 1994 zugelassenes superparamagnetisches Eisenoxid-Kontrastmittel, das seit 1988 in zahlreichen Studien klinisch erforscht wurde, P7228 (beide Laboratoires Guerbet, Aulnay-sous-Bois), ein ultrakleines superparamagnetisches Eisenoxid-Kontrastmittel, das zur Zeit in klinischen Studien geprüft wird, und Gadophrin (Schering AG, Berlin), ein Digadolinium-Porphyrin-Komplex, das noch in präklinischen Studien untersucht wird.

Das Markieren der Zellen erfolgte über Inkubation der Zellen mit Endorem®, das durch Phagozytose in hämatopoetische Vorläuferzellen aufgenommen wird. P7228 und Gadophrin wurden über Lipofectin®, ein Transfektionsagens, in alle Zellen, einschließlich CD34+ Stammzellen, eingeschleust. Die Effizienz der zellulären Aufnahme lag in vorhergehenden Studien für Lipofectin bei $1,8 \pm 0,5$ mg Fe/1 Million Zellen (RUDELIUS et al. 2003). Die Markierung der Zellen mit Eisenoxid-Kontrastmitteln beeinflusst die Wachstums- und Differenzierungseigenschaften der Zellen nicht wesentlich (DALDRUP-LINK et al. 2003).

Die markierten Zellen wurden immundefizienten Mäusen injiziert und diese vor, 4 und 24 Stunden nach der Injektion im MRT untersucht. Als Kontrolle wurde einer repräsentativen Gruppe von Mäusen das reine Kontrastmittel injiziert. Die Untersuchung der Mäuse erfolgte in einer speziell angefertigten Spule in einem klinischen Standard-MRT bei 1,5 Tesla. Endorem und P7228 sind T2-Kontrastmittel und erzeugen auf T2-gewichteten Aufnahmen eine Abschwächung der Signalintensität (WEISSLEDER et al. 1990). Gadophrin ist ein T1-Kontrastmittel und führt zu einem Anstieg der Signalintensität auf T1-gewichteten Aufnahmen. Resultate waren ein signifikanter Abfall der Signalintensität nach Injektion von mit Endorem und P7228 markierten Zellen nach 4 Stunden in Milz und Leber, wobei bei P7228 eine höhere Zellzahl benötigt wurde, nach 24 Stunden auch im Knochenmark.

Bei beiden Eisenoxid-Kontrastmitteln war das Absinken der Signalintensität im Knochenmark nach der Zellinjektion stärker als nach Injektion des reinen Kontrastmittels. Der Grund liegt in der relativ geringen Aufnahme der reinen Kontrastmittel in das Knochenmark. Das ultrakleine superparamagnetische Eisenoxid-Kontrastmittel Sinerem™, und damit aufgrund seines identischen Aufbaues auch P7228, wird zu 5 % vom Knochenmark aufgenommen (SENETERRE et al. 1991). Endorem gelangt zu einem sehr geringen Anteil in das Knochenmark; 6 % werden von der Milz und 80 % von der Leber aufgenommen (WEISSLEDER 1994, VAN DE BERG 1999). Diese geringe Menge reicht jedoch bereits aus, um detektierbare Veränderungen zu erzeugen (SAINI et al. 1987, SENETERRE et al. 1991, BELLIN et al. 1994, VAN DE BERG et al. 1999). Die hämatopoetischen Vorläuferzellen transportieren das Kontrastmittel in einer höheren Konzentration in das Knochenmark. Der Abfall der SI war in der vorliegenden Studie bei Endorem stärker als bei P7228. Endorem lässt sich damit in einer niedrigeren Dosierung als P7228 bereits darstellen: die Anzahl der Zellen, die mindestens benötigt wurde, um detektierbare Veränderungen hervorzurufen, betrug bei Endorem 5 Millionen, bei P7228 10 Millionen Zellen. Signifikante Senkungen der Signalintensität in Leber, Milz und Knochenmark wurden bei beiden Kontrastmitteln ab 20 Millionen Zellen erreicht.

Gadophrin erzeugt nach Injektion einer Zellzahl von durchschnittlich 70 Millionen ebenfalls in Milz und Leber bereits nach vier Stunden einen Anstieg der Signalintensität, nach 24 Stunden auch im Knochenmark. Der stärkste Anstieg erfolgt in der Leber. Diese Ergebnisse konnten durch die Untersuchung im Optical Imager bestätigt werden.

Mit der vorliegenden Studie wurde erstmals das Homing von intravenös injizierten humanen Vorläuferzellen im Knochenmark *in vivo* mit einem 1,5 Tesla Scanner nachgewiesen, unter Verwendung *klinisch zugelassener* Eisenoxid-Kontrastmittel. Die angewandten Methoden der Zellmarkierung sind effizienter, schneller und leichter anzuwenden als in der Vergangenheit beschriebene Methoden (WEISSLEDER 1994, JOSEPHSON et al. 1999, LEWIN et al. 2000, BULTE et al. 2001). Alle erforderlichen Bestandteile für die Techniken der Zellmarkierung sind kommerziell erhältlich und die erforderliche Ausrüstung ist klinischer Standard, was die Methode universell anwendbar werden lässt. Eisenoxide sind für die Markierung von Zellen ideal geeignet, da Eisen physiologisch von sich teilenden Vorläufer-Zellen benötigt wird und die Zellen minimal beeinträchtigt werden, im Gegensatz zu radioaktiven Substanzen, die radiotoxische Wirkungen auf die Zellen ausüben (FAWWAZ et al. 1985). Vorhergehende Studien zeigen, dass die Markierung von Zellen mit Eisenoxiden die Zellfunktion nicht beeinträchtigt (LEWIN et al. 2000, BULTE et al. 2001, DALDRUP-LINK et al. 2003). Die

Ausscheidung der Eisenoxidkontrastmittel erfolgt über den physiologischen Eisenstoffwechsel über die Zelle selbst (WEISSLEDER et al. 1989, WEISSLEDER et al. 1990), im Gegensatz zu den MR-Kontrastmitteln auf Gadolinium-Basis, die über Wochen im Organismus verbleiben (RUDELIUS et al. 2003).

Die genutzten Methoden der Zellmarkierung mit Endorem oder P7228 haben auch in Bezug auf die Zielzellen Vor- und Nachteile. Endorem markiert nur CD 34- hämatopoetische Stammzellen, während die für das Anwachsen der Zellen im Knochenmark wichtigen CD34+ Zellen nicht beeinflusst werden. Die Verteilung von CD34- und CD34+ Zellen in vivo ist jedoch gleich (VAN HENNIK et al. 1999). Daher kann Endorem für Verteilungsstudien gleichermaßen genutzt werden. Außerdem ist Endorem klinisch zugelassen und liefert bessere Ergebnisse (siehe 3.3.1.2.) als P7228, das zur Zeit noch in klinischen Studien untersucht wird.

Die In-vivo-Verteilung intravenös injizierter humaner hämatopoetischer Vorläuferzellen in immundefizienten Balb/c Nacktmäusen konnte mit der MRT gut dargestellt werden. Sie korrelierte mit den Ergebnissen der Histologie. Die anatomische und zeitliche In-vivo-Verteilung der Zellen korrespondierte im Wesentlichen mit der in vorhergehenden Studien beschriebenen in NOD/SCID Mäusen (VAN HENNIK et al. 1999). Differenzen können durch die langsamere Bioverteilung humaner Zellen im Mausmodell im Gegensatz zu murinen Zellen im Mausmodell bedingt sein.

Die untersuchte Methode der Markierung von Zellen mit Eisenoxiden könnte in Zukunft eine nicht-invasive, repetitive Möglichkeit der Detektion von Zellen nach Stammzelltransplantationen mit der MRT eröffnen. Neue Stammzelltherapien, wie z.B. für neurologische Applikationen, könnten mit dieser diagnostischen Methode überwacht werden (BULTE et al. 2001). Die Zellmarkierung mit Gadophrin muss in weiteren Studien noch intensiver untersucht werden, da zum jetzigen Zeitpunkt nur eine sehr große Anzahl an Zellen mit der MRT dargestellt werden kann. Das Optical Imaging bietet einen Überblick über die generelle In-vivo-Verteilung aller transplantierten Zellen, mit größeren und kleineren Subpopulationen, die MRT zeigt die Anhäufung großer Zellmengen mit sehr guter, fast mikroskopischer, anatomischer Auflösung. In der vorliegenden Studie konnten die Aufnahmen des Optical Imaging die Ergebnisse der MRT im Bezug auf die Bioverteilung der Zellen bestätigen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass unmittelbar nach der Injektion die Zellen zunächst in der Lunge akkumulieren, sich dann in Leber und Milz umverteilen, um später in das Knochenmark zu gelangen.

Schlussfolgerung

Mit der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass mit Endorem und P7228 markierte, intravenös injizierte Zellen ab einer Zellzahl von 20 Millionen in der Maus in vivo mit einem 1,5 Tesla MRT-Gerät verfolgt werden können. Diese Menge an Zellen ist für die Mäuse gut verträglich. Gadophrin eignet sich aufgrund seiner Bifunktionalität gut, um die Ergebnisse der MRT zu bestätigen. Die Zellmigration in vivo konnte mit dem Optical Imager bewiesen werden. Mit Endorem steht ein bereits seit Jahren klinisch zugelassenes und seit Jahrzehnten in zahlreichen Studien untersuchtes, gut verträgliches Kontrastmittel zur Verfügung. Die Aufnahme des Kontrastmittels in die Zelle ist hocheffizient, eine Zellkonzentration von 5 Millionen liefert bereits MR-tomographisch detektierbare Veränderungen. Die Erhöhung der Konzentration auf 20 Millionen Zellen erzeugt eine signifikante Signalintensitätsabschwächung. Endorem ist nicht zytotoxisch und wird über den physiologischen Eisenstoffwechsel metabolisiert. Die Zellmarkierung mit Endorem genügt demnach allen Anforderungen, die an eine Methodik gestellt werden, um in Zukunft klinisch am Menschen angewendet werden zu können. Sie könnte wichtige Fragen im Bereich der (Stamm-)Zelltherapie beantworten.

5 Zusammenfassung

Nachweis Kontrastmittel-markierter humaner hämatopoetischer Vorläuferzellen im Mausmodell mit der Magnetresonanztomographie

Ziel der vorliegenden Studie war es, die In-vivo-Verteilung von mit Eisenoxid- MRT-Kontrastmitteln und Gadophrin markierten hämatopoetischen Vorläuferzellen in der Maus mit der MRT und dem Optical Imaging optisch darzustellen. Die Techniken der Zellmarkierung mit MR-Kontrastmitteln und ihre Detektion in vivo mittels unterschiedlicher Sequenzen wurden entwickelt und optimiert.

Humane hämatopoetische Vorläuferzellen wurden mit Ferumoxides (Endorem®), P7228 (Laboratoire Guerbet, Frankreich) markiert. Ferumoxides wurde während simpler Inkubation in die Zellen eingeschleust, P7228 mittels eines Transfektions-Agens, Lipofectin® (Fa. Invitrogen Corporation, Life Technologies, USA). Eine unterschiedliche Anzahl (5 Millionen bis 30 Millionen) markierter Zellen wurden jeweils in die Schwanzvene immundefizienter Balb/c Nu Nu Nacktmäuse (n=20) injiziert. Als Kontrolle dienten Mäuse, denen jeweils das reine Kontrastmittel injiziert wurde (n=9 für jedes Kontrastmittel). Zusätzlich wurden humane hämatopoetische Stammzellen mit dem bifunktionellen T1-Kontrastmittel, Gadophrin (Schering AG, Deutschland) über Lipofectin® markiert und n=10 Nacktmäusen intravenös verabreicht. Alle Mäuse wurden vor sowie vier und 24 Stunden nach der Injektion magnetresonanztomographisch untersucht. Die Mäuse, die mit Gadophrin markierte Zellen erhielten, wurden zusätzlich noch im Optical Imager untersucht. Die Signalintensitäten von Knochenmark, Milz und Leber wurden gemessen und als SNR-Daten (Signal to Noise Ratio) quantifiziert. Als Referenzmethode wurden diese Organe nach Abschluss der Imaging-Experimente histologisch mittels CD31- und Dextran-Färbemethodik untersucht, um die Kontrastmittel in den transplantierten Zellen aufzufinden.

Nach Injektion der mit Ferumoxides und P7228 markierten Zellen wurde ein signifikanter Abfall der Signalintensität nach 4 und 24 Stunden in Leber und Milz, im Knochenmark nach 24 Stunden ($p < 0,05$), gemessen. Die Zellzahl, die mindestens benötigt wurde, um detektierbare Veränderungen hervorzurufen, betrug bei Ferumoxides 5 Millionen, bei P7228 10 Millionen Zellen. Signifikante Senkungen der Signalintensität in Leber, Milz und Knochenmark wurden bei beiden Kontrastmitteln ab 20 Millionen Zellen erreicht. Der

Signalintensitätsabfall des Knochenmarkes war nach Injektion der Kontrastmittel markierten Zellen stärker als nach Injektion des reinen Kontrastmittels in klinischer Dosierung in der Kontrollgruppe. Die Verteilung der Eisenoxid-markierten Zellen in den Zielorganen wurde histologisch bewiesen.

Mit Gadophrin markierte Zellen erzeugen einen signifikanten Anstieg der Signalintensität von Leber, Milz und Knochenmark auf T1-gewichteten Bildern 24 Stunden post injectionem. Die Bioverteilung des Gadophrin konnte im Optical Imager verifiziert werden.

Die Bioverteilung von mit Eisenoxiden und Gadophrin markierten humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen im lebenden Organismus kann mit einem Standard-MRT-Gerät bei 1,5 Tesla und mit dem Optical Imaging verfolgt werden. Die angewandten Kontrastmittel, die bereits klinisch zugelassen sind bzw. zur Zeit noch klinisch erforscht werden und demnächst zugelassen werden, wie auch die angewandten Techniken der Zellmarkierung, sind für den baldigen klinischen Einsatz geeignet.

6 Summary

Detection of contrast-agent labeled human hematopoietic progenitor cells in vivo in mice using MRI

The objective of this study was to monitor the in vivo distribution of iron oxide and gadophrin labeled human hematopoietic progenitor cells in nude mice using MRI and Optical Imaging. Techniques for cell-labelling with MR contrast agents and subsequent in vivo depiction by imaging modalities were developed and optimized.

Human hematopoietic progenitor cells were labelled with Ferumoxides (Endorem®) and P7228 (Laboratoire Guerbet, France). Ferumoxides was internalized into the cells by simple incubation, while labeling with P7228 was achieved with adjunct of a transfection agent, Lipofectin® (Invitrogen Corporation, Life technologies, USA). Varying amounts of labeled cells (5 Million to 30 Million cells) were injected into the tail vein of immunodeficient Balb/c nude mice (n= 20). Control mice received injections of the pure contrast agents (n= 9 for each contrast agent). Additionally, human hematopoietic cells were labeled with the bifunctional T1 contrast agent, Gadophrin (Schering AG, Germany) and Lipofectin® and injected to n= 10 nude mice. All mice underwent MR imaging before as well as four and 24 hours following intravenous cell resp. contrast agent injection. Mice, that received the Gadophrin labeled cells were also examined by optical imaging at these time points. Signal intensities of bone marrow, spleen and liver were measured and quantified as SNR-data (Signal to Noise Ratio). As a standard of reference for in vivo cell distribution, organs were excised after completion of all imaging experiments and histologically examined with CD 31 stains and dextran stains, which depicted the contrast agents within the transplanted cells.

After injection of the Ferumoxides and P7228 labeled cells, a significant decline in signal intensity could be measured in liver and spleen at 4 and 24 h p.i., and also in the bone marrow at 24 h p.i. ($p < 0.05$). The minimal number of cells needed to achieve detectable changes in signal intensity was for Ferumoxides 5 Million, and 10 Million cells for P7228. Both iron oxide based contrast agents showed a significant decline in signal intensity of liver, spleen and bone marrow after injection of 20 Million cells. The bone marrow signal decline was stronger after injection of iron oxide labeled cells as compared to controls which received intravenous injections of the pure contrast agents at clinical doses. The distribution of the iron oxide labeled cells to the target organs liver, spleen and bone marrow was proven histologically.

Cells labeled with the bifunctional contrast agent gadophrin caused a significant increase in signal intensity of liver, spleen and bone marrow on T1-weighted MR images 24 h post injectionem. The biodistribution of Gadophrin could also be also verified by optical imaging.

The biodistribution of iron oxide and Gadophrin labeled human hematopoietic progenitor cells in vivo can be monitored with 1.5 Tesla Standard-MRI-Scanners and Optical Imaging. The applied contrast agents, which are already approved or are currently evaluated in clinical trials and soon to be approved, as well as the applied cell labeling techniques, are suited for clinical applications before long.

7 Literaturverzeichnis

Adams G B, Chabner K T, Foxal R B, Weibrecht K W, Rodrigues N P, Dombkowski D, Fallon R, Poznansky M C, Scadden D T. Heterologous cells cooperate to augment stem cell migration, homing and engraftment.

Blood 2003; 101: 45-51

Adonai N, Nguyen K N, Walsh J, Iyer M, Toyokuni T, Phelps M E, McCarthy T, McCarthy D W, Gambhir S S. Ex vivo cell labelling with ⁶⁴Cu-pyruvaldehyde-bis(N4-methyl-thiosemicarbazone) for imaging cell trafficking in mice with positron-emission tomography.

Proc Natl Acad Sci U.S.A. 2002; 99: 3030-3035

Aicher A, Brenner W, Zuhayra M, Badorff C, Massoudi S, Assmus B, Eckey T, Henze E, Zeiner A M, Dimmeler S. Assessment of the tissue distribution of transplanted human endothelial progenitor cells by radioactive labelling.

Circulation 2003; 107: 2134-2139

Allport J R, Weissleder R. In vivo imaging of gene and cell therapies.

Exp Hematol 2001; 29: 1237-1246

Barker J N, Wagner J E. Umbilical cord blood transplantation: current practice and future innovations.

Crit Rev Oncol Hematol 2003; 48: 35-43

Barkhausen J, Ebert W, Debatin J F, Weinmann H J. Imaging of myocardial infarction: Comparison of magnevist and gadophrin-3 in rabbits

J Am Coll Cardiol 2002; 39: 1392-1398

Bellin M F, Zaim S, Auberton E, Sarfati G, Duron J J, Khayat D, Grellet. Liver metastases: safety and efficacy of detection with superparamagnetic iron oxide in MR imaging.

Radiology 1994; 193: 657-663

Benderbous S, Bonnemain B. Superparamagnetic nanoparticles as blood-pool contrast agents.

Radiologie 1995; 35: 248-252

Bhorade R, Weissleder R, Nakakoshi T, Moore A, Tung C-H. Macrocyclic chelators with paramagnetic cations are internalized into mammalian cells via a HIV-Tat derived membrane translocation peptide.

Bioconjug Chemis 2000; 11: 301-305

Blocklet D, Tunjou M, Kiss R, Lambermont M, Velu T, Durian D, Goldmann M, Goldmann S. ¹¹¹In-oxine and ^{99m}Tc-HMPAO labelling of antigen-loaded dendritic cells: in vivo imaging and influence on motility and actin content.

Eur J Nucl Med Mol Imaging 2003; 30: 440-447

Brasch C, Weinmann C, Wesbey G. Contrast enhanced MR-imaging: animal studies using gadolinium-DTPA complex

Am J Roentg 1984; 142: 625-630

Brasch C. New directions in the development of MR imaging contrast media.
Radiology 1992; 183: 1-11

Broxmeyer H E, Srour E F, Hango G, Cooper S, Anderson S A, Bodir D M. High-efficiency recovery of functional hematopoietic progenitor and stem cells from human cord blood cryopreserved for 15 years.
Proc Natl Acad Sci; USA 2003; 100: 645-650

Bug G, Eichler H. Nabelschnurblut als alternative Stammzellquelle.
Zellbiologie 2003; 1: 12-14

Bulte J W, Zhang S, Van Gelderen P, Herynek V, Jordan E K, Duncan I D. Neurotransplantation of magnetically labeled oligodendrocyte progenitors: magnetic resonance tracking of cell migration and myelination.
Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1999; 96:15256-15261

Bulte J W M, Douglas T, Witwer B, Zhang S-C, Strable E, Lewis B K, Zywicke H, Miller B, Van Gelderen P, Moskowitz B M, Duncan I D, Frank J A. Magnetodendrimers allow endosomal labeling and in vivo tracking of stem cells.
Nature biotech 2001; 19: 1141-1147

Bulte J W M, Douglas T, Witwer B, Zhang S-C, Lewis B K, v Gelderen P, Zywicke H, Duncan I D, Frank J A. Monitoring stem cell therapy in vivo using magnetodendrimers as a new class of cellular MR contrast agents.
Acad Radiol 2002; 9: 332-335

Cashman J D, Eaves C J. High marrow seeding efficiency of human lymphomyeloid repopulating cells in irradiated NOD/SCID mice.
Blood 2000, 12: 3979-3980

Chen C A, Okayama H. Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA.
Biotechniques 1988; 6: 623-628

Cerny J, Dooner M S, Quesenberry P J. Cytokine treatment of hematopoietic stem/progenitor cells induces a homing defect in nonmyeloablated hosts.
Exp Hematol 2000; 28: 51 (Abstract)

Chambon C, Clement O, Le Blanche A, Schouman-Claeys E, Frija G. Superparamagnetic iron oxides as positive MR contrast agents: in vitro and in vivo evidence.
Magn Res Imaging 1993; 11: 509-519

Daldrup H, Link T, Blasius S, Strozyk A, Könemann S, Jürgens H, Rummeny E. Monitoring radiation induced changes in bone marrow histopathology with ultra-small superparamagnetic iron oxide (USPIO)-enhanced MRI.
J Magn Reson Imaging 1999; 9: 643-652

Daldrup-Link H, Rummeny E, Ihßen B, Silling-Engelhard H, Link T. Comparison of SPIO and USPIO for MRI of the Bone Marrow in Patients with Non-Hodgkins Lymphomas.
Radiology 2000; 217: 356

Daldrup-Link H E, Rudelius M, Oostendorp R A J, Piontek G, Heinzmann U, Rummeny E J, Schlegel J, Link T M. Targeting of hematopoietic progenitor and stem cells with MR contrast agents.

Radiology 2003; 228: 760-767

Earls J P, Bluemke D A. New MR imaging contrast agents.

Magn Res Imaging 1999; 7: 255-273

Fawwaz R A, Oluwole S, Wang TS, Kuromoto N, Iga C, Hardy M A, Alderson P O. Biodistribution of radiolabeled lymphocytes.

Radiology 1985; 155: 483-486

Frank J A, Zywicke H, Jordan E K, Mitchel J, Lewis B K, Miller B, Bryant H Jr, Bulte J W M. Magnetic intracellular labeling of mammalian cells by combining (FDA-approved) superparamagnetic iron oxide MR contrast agents and commonly used transfection agents.

Acad Radiol 2002; 9: 484-487

Gabrisch K, Zwart P. Krankheiten der Heimtiere.

Schlütersche, Hannover, 5. Auflage, 2001: 107

Guimaraes R, Clement O, Bittoun J, Carnot F, Frija G. MR lymphography with superparamagnetic iron nanoparticles in rats: pathologic basis for contrast enhancement.

Am J Roentg 1993; 162: 201-207

Hamamatsu photonics. Hamamatsu data sheet: High resolution digital B/W CCD camera ORCA II –ER.

www.hamamatsu.de/produkte/kameras 2003

Hardy J, Edinger M, Bachmann M H, Negrin R S, Fathman C G, Contag C H. Bioluminescence imaging of lymphocyte trafficking in vivo.

Exp Hematol 2001; 29: 1353-1360

Hermann H J. Nuklearmedizin.

Urban und Schwarzenberg, 4. Auflage; München, 1998

Hinds K A, Hill J M, Shapiro E M, Laukkanen M O, Silva A C, Combs C A, Varney T R, Balaban R S, Koretsky A P, Dunbar C E. Highly efficient endosomal labelling of progenitor and stem cells with large magnetic particles allows magnetic resonance imaging of single cells.

Blood 2003; 102: 867-872

Hofmann B, Bogdanov A Jr, Marecos E, Ebert W, Semmler W, Weissleder R: Mechanism of gadophrin-2 accumulation in tumor necrosis.

J Magn Reson Imaging 1999; 9: 336-341

Hou L, Cao H, Wang D, Wei G, Bai C, Zhang Y, Pei X. Induction of umbilical cord blood mesenchymal stem cells into neuron-like cells in vitro.

Int J Hematol 2003; 78: 256-261

Hübner M M, Staubli A B, Kustedjo K, Gray M H B, Shih J, Fraser S E, Jacobs R E, Meade T J. Fluorescently detectable magnetic resonance imaging agents.
Bioconj Chem 1998; 9:242-249

Jackson Laboratory. Jax Mice Product Specifications, 2000

Jetmore A, Plett P A, Tong X, Wolber F M, Breese R, Abonour R, Orschell-Traycoff C M, Srour E F. Homing efficiency, cell cycle kinetics, and survival of quiescent and cycling human CD34+ cells transplanted into conditioned NOD/SCID recipients.
Blood 2002, 99: 1585-1593

Jiang Y, Jahagirdar B N, Reinhardt R L, Schwartz R E, Kenne C D, Ortiz-Gonzalez X R, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low W C, Largaespada D A, Verfaillie C M. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow.
Nature 2002; 418: 41-49

Josephson L, Thung C H, Moore A, Weissleder R. High-efficiency intracellular magnetic labeling with novel superparamagnetic-tat peptide conjugates.
Bioconj Chem 1999; 10: 186-191

Josephson L, Kircher M, Mahmood U, Tang Y, Weissleder R. Near-infrared fluorescent nanoparticles as combined MR/optical imaging probes.
Bioconj Chem 2002; 13: 554-560

Jung C W. Surface properties of superparamagnetic iron oxide MR contrast agents: ferromoxides, ferromoxtran, ferromoxsil.
Magn Res Imaging 1995; 13: 675-691

Kauffmann G W, Moser E, Sauer R. Radiologie: Grundlagen der Radiodiagnostik, Radiotherapie und Nuklearmedizin
Urban und Schwarzenberg, München, 1. Auflage (1996): 153

Kaufman L, Kramer D M, Crooks L E, Ortendahl D A. Measuring signal-to-noise ratios in MR imaging.
Radiology 1989; 173: 265-267

Kempuraj D, Saito H, Kaneko A, Fukagawa K, Nakayama M, Toru H, Tomikawa M, Tachimoto H, Ebisawa M, Akasawa A, Miyagi T, Kimura H, Nakajima T, Tsuji K, Nakahata T. Characterization of mast cell-committed progenitors present in human umbilical cord blood.
Blood 1999; 93: 3338-3346

Kolb H-J, Holler E. Hematopoietic Transplantation: State of the art
Stem cells 1997, 15:151-158

Kollet O, Spiegel A, Peled A, Petit I, Byk T, HersHKoviz R, Guetta E, Barkai G, Nagler A, Lapidot T. Rapid and efficient homing of human CD34+ CD38^{-/low} CXCR4+ stem and progenitor cells to the bone marrow and spleen of NOD/SCID and NOD/SCID/B2m^{null} mice.
Blood 2001, 97: 3283-3291

Laboratoire Guerbet:Endorem®: Wissenschaftliche Informationen,
Stand 1995

Laboratoire Guerbet. Sinerem®: Investigator's Brochure,
Stand Mai 2001

Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman I L, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo.
Nat Med 2000; 6: 1229-1234

Lan J, Liu H, Chen Q, Yang C, Zhang Z. A nude mouse model for human umbilical cord blood transplantation.
Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi 2000, 8: 52-56

Laniado M, Chachuat A. Verträglichkeitsprofil von Endorem®.
Radiologe 1995; 35: 266-270

Lanzkron S M, Collector M I, Sharkis S J. Hematopoietic stem cell tracking in vivo: a comparison of short-term and long-term repopulating cells.
Blood 1999; 93: 1916-1921

Laubenberger T. Magnetresonanzverfahren. In: Laubenberger T: Technik der medizinischen Radiologie.
Deutscher Ärzteverlag, Köln: 374-388 (1990)

Lee O K, Kuo T K, Chen W M, Lee K D, Hsieh S L, Chen T H. Isolation of multi-potent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood.
Blood 2003; Oct 23 (epub ahead of print)

Levesque J P, Hendy J, Takamatsu Y, Simmons P J, Bendall L J. Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by GCS or cyclophosphamide.
J Clin Invest 2003; 111: 187-96

Lewin M, Carlesso N, Tung C H. Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells
Nature Biotechnol 2000; 18: 410-414

Liebich H G. Funktionelle Histologie.
Schattauer Stuttgart; 2. Auflage (1993): 133-135

Life Technologies. Gebrauchsinformation Lipofectin® Reagent,
Stand 2002

Lissner M, Seiderer M. Klinische Kernspintomographie.
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart: 2. Auflage (1990)

Mahmood U, Tung C H, Tang Y, Weissleder R. Feasibility of in vivo multichannel optical imaging of gene expression: experimental study in mice.
Radiology. 2002; 224: 446-451

- Malone R W, Felgner P L, Verma I M.** Cationic liposome-mediated RNA-transfection
Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 6077-6081
- Mergo P J, Helmberger T, Nicolas A I, Ros P R.** Ring enhancement in ultrasmall iron oxide MR imaging: a potential new sign for characterization of liver lesions.
Am J Roentgenol 1996; 166: 379-384
- Modo M, Cash D, Melledew K, Williams S, Fraser S, Meade T, Price J, Hodges H.** Tracking transplanted stem cell migration using bifunctional, contrast agent-enhanced, magnetic resonance imaging.
Magn Res Imaging 2002; 17: 803-811
- Moore S, Dawson K.** Red and yellow marrow in the femur: age related changes in appearance at MRI.
Radiology 1990; 175: 219-223
- Murphy B W, Carson P L, Ellis J H, Zhang Y T, Hyde R J, Chenevert T.** Signal-to-noise measures for magnetic resonance imagers.
Magn Res Imaging 1993; 11: 425-428
- Ni Y, Adzamli K, Miao Y, Cresens E, Yu J, Periasamy M P, Adams M D, Marchal G.** MRI contrast enhancement of necrosis by MP-2269 and gadophrin-2 in a rat model of liver infarction.
Invest Radiol 2001; 36: 97-103
- Oostendorp R A J, Ghaffari S, Eaves C J.** Kinetics of in vivo homing and recruitment into cycle of hematopoietic cells are organ-specific but CD44-independent.
Bone marr Transpl 2000; 26: 559-566
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine D M, Leri A, Anversa P.** Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice.
Acad Sci 2001a; 938: 221-229, discussion 229-230
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson S M, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine D M, Leri A, Anversa P.** Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium.
Nature 2001b; 410: 701-705
- Paddleford R R, Erhardt W.** Anästhesie bei Kleintieren.
Schattauer, Stuttgart, 1992; 376
- Papayannopoulou T.** Mechanisms of stem-/progenitor-cell mobilization: the anti-VLA-4 paradigm.
Sem in hematol 2000; 37, 11-18
- Petersein J, Saini S, Weissleder R.** Liver II: Iron oxide-based reticuloendothelial contrast agents for MR imaging.
MRI Clin N Am 1996; 4: 53-60

Philips R L, Ernst R E, Brunk B, Ivanova N, Mahan M A, Deanehan J K, Moore K A, Overton G C, Lemischka I R. The genetic program of hematopoietic stem cells.
Science 2000; 288, 1635-1640

Pislaru S V, Ni Y, Pislaru C, Bosmans H, Miao Y, Bogaert J, Dymarkowski S, Semmler W, Marchal G, Van de Werf F J. Noninvasive measurements of infarct size after thrombolysis with a necrosis-avid MRI contrast agent.
Circulation 1999; 99: 690-696

Pozzi-Mucelli R, Ricci C, Cova M. Magnetic resonance of the bone marrow.
Radiol Med (Torino) 1990; 80: 409-423

Quesenberry P J. Stroma-dependent hematolymphopoietic stem cells.
Curr top Microbiol Immunol 1992; 177, 151-166

Quesenberry P J, Stewart M F, Peters St, Nillson S, Ramshaw H, Rao S, Tiarks C, Zhong S, Frimberger A, Reilly J. Engraftment of hematopoietic stem cells in nonmyeloablated and myeloablated hosts.
Hematop stem cells 1997; 15: 167-170

Quesenberry P J, Stewart F M, Zhong S, Habibian H, McAuliffe C, Reilly J, Carlson J, Dooner M, Nilsson S, Peters S, Stein G, Stein J, Emmons R, Benoit B, Bertoncello I, Becker P. Lymphohematopoietic stem cell engraftment.
Ann N Y Acad Sci 1999; 872, 40-47

Reiser M., Semmler W. Magnetresonanztomographie;
Springer Verlag, Berlin, 2. Auflage (1997): 15, 108-109

Rudelius M, Daldrup-Link H E, Heinzmann U, Piontek G, Settles M, Link T M, Schlegel J. Highly efficient paramagnetic labelling of embryonic and neuronal stem cells.
Eur J Nucl Med Mol Imaging 2003; 30: 1038-1044

Rummeny E J, Reimer P, Heindel W. Ganzkörper-Tomographie.
Thieme, Stuttgart (2002), 476, 207-210, 295-296, 27-35

Saini S, Stark D, Hahn P, Wittenberg J, Bray T, Ferruci J: Ferrite particles: a superparamagnetic MR contrast agent for the reticuloendothelial system.
Radiology 1987; 162: 211-216

Schering AG. Data Sheet: Gadophrin-2, *Stand 1997*

Schicha H, Schober O. Nuklearmedizin.
Schattauer, Stuttgart; 3. Auflage (1997): 295-296

Schmidt R F, Thews G. Physiologie des Menschen.
Springer-Verlag Berlin-Heidelberg; 26. Auflage (1995): 417

Seneterre E, Weissleder R, Jaramillo D, Reimer P, Lee A, Brady T, Wittenberg J. Bone marrow: ultrasmall superparamagnetic iron oxide for MR imaging.
Radiology 1991; 179: 529-533

Shen T, Weissleder R, Papisov M, Bogdanov A, Brady T J. Monocrystalline iron-oxide nanocompounds (MION): physicochemical properties.
Magn Res Med 1993; 29: 599-604

Sipe J C, Filippi M, Martino G, Furlan R, Rocca M A, Rovaris M, Bergami A, Zyroff J, Scotti G, Comi G. Method for intracellular magnetic labeling of human mononuclear cells using approved iron contrast agents.
Magn Reson Imaging 1999; 17: 1521-1523

Small WC, Nelson RC, Bernadino ME. Dual contrast enhancement of both T₁- and T₂-weighted sequences using ultrasmall superparamagnetic iron oxide.
J Magn Reson Imaging 1993; 11: 645-654

Smith S, Williams C, Davies J, Edwards R. Bone marrow disorders: characterisation with quantitative MR imaging.
Radiology 1989; 172: 805-810

Spangrude G J. Mouse hematopoietic stem cells.
Blood 1991; 78: 1395-1402

Spangrude G J. Characteristics of the hematopoietic stem cell compartment in adult mice.
Int J Cell Clon 1992; 10: 277-285

Spangrude G J. Biological and chemical aspects of hematopoietic stem cells.
Ann Rev Med; 45: 93-104

Tavassoli M, Yoffey J M. Bone marrow structure and function.
Alan R. Liss, Inc., New York 1985: 31-45, 174-176

Thomas T E, Abraham S J, Otter A J, Blackmore E W, Lansdorp P M. High gradient magnetic separation of cells on the basis of expression levels of cell surface antigens.
J Immunol Meth 1992; 154: 245-252

Thurn P, Bücheler E, Lackner K J, Thelen M. Einführung in die radiologische Diagnostik.
Thieme, Stuttgart, 10. Auflage (1998), 25-28, 43-48

Toma C, Pittenger M F, Cahill K S, Byrne B J, Kessler P D. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart.
Circulation 2002; 105: 93-98

Van de Berg B, Lecouvet F, Kanku J, Jamert J, Van Beers B, Maldague B, Maighem J. Ferrumoxides-enhanced quantitative magnetic resonance imaging of the normal and abnormal bone marrow: preliminary assessment.
J Magn Reson Imaging 1999; 9 : 322-328

Van Hennik P B, De Koning A E, Ploemacher R E. Seeding efficiency of primitive human hematopoietic cells in nonobese diabetic/severe combined immune deficiency mice: implications for stem cell frequency assessment.
Blood 1999; 94: 3055-3061

Vogl T J, Hammerstingl R, Pegios W, Hamm B, Eibl-Eibesfeldt A, Woessmer B, Lissner J, Felix R. Wertigkeit des leberspezifischen Kontrastmittels AMI-25 für die Detektion und Differentialdiagnose lebereigener Tumoren versus Metastasen.

RöFo Fortschr Geb Röntgenstr Neuen Bildgeb Verfahr 1994; 160: 319-328

Vogl TJ, Hammerstingl R, Schwarz W, Mack MG, Müller PK, Pegios W, Keck H, Eibl-Eibesfeldt A, Hoelzl J, Woessmer B, Bergman C, Felix R. Superparamagnetic iron oxide-enhanced versus gadolinium-enhanced MR imaging for differential diagnosis of focal liver lesions.

Radiology 1996; 198: 881-887

Vogl T, Helmberger H, Hamm B. Verbesserte Tumordiagnostik durch organspezifische Kontrastmittel in der MRT.

RöFo Fortschr Geb Röntgenstr Neuen Bildgeb Verf 1999, 171 (Beilage)

Weissleder R, Elizondo G, Stark DD, Hahn PF, Marfil J, Gonzalez JF, Saini S, Todd LE, Ferrucci JT. The diagnosis of splenic lymphoma by MR imaging: value of superparamagnetic iron oxide.

Am J Roentgenol 1989; 152: 175-180

Weissleder R, Elizondo G, Wittenberg J, Rabito C, Bengele H, Josephson L. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: Characterisation of a new class of contrast agents for MR imaging.

Radiology 1990; 175: 489-493

Weissleder R. Liver MR imaging with iron oxides: toward consensus and clinical practice.

Radiology 1994; 193: 593-595

Weissleder R, Cheng H C, Bogdandova A, Bogdanov A Jr. Magnetically labeled cells can be detected by MR imaging.

J Magn Reson Imaging 1997; 7: 258-263

Wolff S, Balaban R. Assessing contrast on MR images.

Radiology 1997; 202: 25-29

www.m-ww.de; medicine worldwide/Stammzellen Stand 2003

www.MI-central.org; learn about: Flourescence/Optical Imaging

Stand 2003

Yahata T, Ando K, Sato T, Miyatake H, Nakamura Y, Muguruma Y, Kato S, Hotta T. A highly sensitive strategy for SCID-repopulating cell assay by direct injection of primitive human hematopoietic cells into NOD/SCID mice bone marrow.

Blood 2003; 101: 2905-2913

Yeh T C, Zhang W, Ildstad S T, Ho C. Intracellular labeling of T-cells with superparamagnetic contrast agents.

Magn Reson Imaging 1993; 30: 617-625

8 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Präzession eines Atomkerns mit magnetischem Moment um die Achse eines äußeren Magnetfelds
- Abb. 2: Kristallstruktur von Endorem®
- Abb. 3: Gadophrin-2
- Abb. 4: Systemkonfiguration Digital B/W CCD Kamera
- Abb. 5: Knochenmark: Elemente der effektiven blutbildenden Systeme
- Abb. 6: Kunststoffform zur Untersuchung im MRT
- Abb. 7: SNR-Daten (Mittelwert aus n= 9) vor und nach i.v.-Injektion von Endorem und P7228, Knochenmark
- Abb. 8: SNR-Daten (Mittelwert aus n= 9) vor und nach i.v.-Injektion von Endorem und P7228, Milz
- Abb. 9: SNR-Daten (Mittelwert aus n= 9) vor und nach i.v.-Injektion von Endorem und P7228, Leber
- Abb. 10: Endorem: $3 \cdot 10^7$ Zellen a= Leber, b= Knochenmark Femur, c= Milz
- Abb. 11: P7228: $3 \cdot 10^7$ Zellen a= Leber, b= Knochenmark Femur, c= Milz
- Abb. 12: SNR des Knochenmarkes nach Injektion von mit Endorem markierten Zellen
- Abb. 13: SNR des Knochenmarkes nach Injektion von mit P7228 markierten Zellen
- Abb. 14: SNR der Milz nach Injektion von mit Endorem markierten Zellen
- Abb. 15: SNR der Milz nach Injektion von mit P7228 markierten Zellen
- Abb. 16: SNR der Leber nach Injektion von mit Endorem markierten Zellen
- Abb. 17: Anti-Dextran-Färbung 24 Stunden nach Injektion von mit Eisenoxid-Kontrastmitteln markierten humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen
- Abb. 18: Anti-CD31-Färbung der Milz 24 Stunden nach Injektion von mit Eisenoxid-Kontrastmitteln markierten humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen
- Abb. 19: Anti-CD31-Färbung der Leber 24 Stunden nach Injektion von mit Eisenoxid-Kontrastmitteln markierten humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen
- Abb. 20: SNR der Leber nach Injektion von mit P7228 markierten Zellen
- Abb. 21: SNR des Knochenmarkes nach Injektion von mit Gadophrin markierten Zellen
- Abb. 22: Knochenmark: Übersicht über Einzelergebnisse bei hoher Zellzahl
- Abb. 23: Knochenmark: Korrelation der SNR-Daten mit der Zellzahl
- Abb. 24: SNR der Milz nach Injektion von mit Gadophrin markierten Zellen
- Abb. 25: Milz: Übersicht über Einzelergebnisse bei hoher Zellzahl

- Abb. 26: Milz: Korrelation der SNR-Daten mit der Zellzahl
- Abb. 27: SNR der Leber nach Injektion von mit Gadophrin markierten Zellen
- Abb. 28: Leber: Übersicht über Einzelergebnisse bei hoher Zellzahl
- Abb. 29: Leber: Korrelation der SNR-Daten mit der Zellzahl
- Abb. 30: Injektion von Zellen und Gadophrin: Prä, nach 1, 4 und 24 Stunden
- Abb. 31: Darstellung der in vivo Verteilung von Gadophrin im Optical imager

9 Tabellenverzeichnis

- Tab. 1: Magnetisches Moment und Anzahl ungepaarter Elektronen von Metallionen
- Tab. 2: Zusammensetzung und physikalische Eigenschaften von Endorem® a) pro Ampulle (8ml) und b) pro 100 ml
- Tab. 3: Nebenwirkungen von Sinerem™
- Tab. 4: Gruppeneinteilung der Mäuse mit Zell- bzw. Kontrastmittelinjektion
- Tab. 5: Versuchsdurchführung
- Tab. 6: Dosierung Anästhetikum
- Tab. 7: Dosierung Antagonist
- Tab. 8: SNR-Daten (jeweils Mittelwert aus n= 9) vor und nach i.v. Injektion von Endorem und P7228
- Tab. 9: MR-Signalintensitäten von Leber, Milz und Knochenmark, quantifiziert als Signal-Rausch-Verhältnis (Signal to Noise Ratio, SNR)
- Tab. 10: SNR des Knochenmarkes nach Zellinjektion
- Tab. 11: SNR der Milz nach Zellinjektion
- Tab. 12: SNR der Leber nach Zellinjektion
- Tab. 13: Kolonie-Assay nicht markierter und Endorem- bzw. P7228-markierter humaner Vorläuferzellen
- Tab. 14: SNR des Knochenmarkes vor und nach Injektion von Gadophrin und Zellen
- Tab. 15: SNR der Milz vor und nach Injektion von Gadophrin und Zellen
- Tab. 16: SNR der Leber vor und nach Injektion von Gadophrin und Zellen

10 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APAAP	Alkalische Phosphatase Anti Alkalische Phosphatase
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
CCD-Chip	Charge Coupled Device Chip
CFU	Colony forming unit
cm	Zentimeter
DAB	Diaminobenzidin
d. h.	das heißt
Fa.	Firma
G	Gramm
Gd-DTPA	Gadolinium-Diethylen-Triamin-Pentaacetic-Säure-Komplex
h	Stunde
HBSS	Hank´s balanced salt solution
HLA	Humanes Leukozytenantigen
i.v.	intravenös
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
Min.	Minute
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
ml	Milliliter
mOsm	Milliosmol
MRT	Magnetresonanztomographie
ms	Millisekunden
mmol	Millimol
µmol	Mikromol
n	Anzahl
p	Signifikanz
PET	Positron Emission Tomography
RES	Reticulo-endotheliales System

R1, R2	Relaxivität eines Kontrastmittels (mmol s) ⁻¹
Sek.	Sekunde
SI	Signalintensität
SNR	Signal to Noise Ratio
SPIO	Superparamagnetische Eisenoxidkontrastmittel
Tab.	Tabelle
T1, T2*	Spinrelaxationszeiten
TE	Echozeit
TR	Repetitionszeit
u.a.	unter anderem
USPIO	ultrakleine superparamagnetische Eisenoxidkontrastmittel
u. v. m.	und vieles mehr
z.B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

11 Lebenslauf

Name: Obermann
Vorname: Sandra
Geburtsdatum: 23.03.1973
Geburtsort: Göttingen
Eltern: Dr. Hugo Obermann
Heidelore Obermann
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch
Schulbildung: 1979-1983 Grundschule Dormagen-Mitte
1983-1992 Leibniz-Gymnasium Dormagen
1992 Abitur
Studium: 1994-2000 Studium der Veterinärmedizin an der Universität Leipzig
Februar 2000 Approbation als Tierärztin
Berufliche Tätigkeiten: 2000-2001 Wiss. Mitarbeit in der Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie
der RWTH Aachen und Praxisvertretungen in der Kleintierpraxis
2002 Doktorandin im Institut für Röntgendiagnostik
Mitarbeit einmal wöchentlich und bei Notfällen in einer Kleintier-
praxis
seit April 2003 Assistentin in einer Kleintierpraxis

12 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. vet. W. Schmahl danke ich für die Übernahme der Arbeit an die tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München sowie die äußerst konstruktive Beratung

Herrn Prof. Dr. med. vet. W. Erhardt möchte ich danken für die freundliche Betreuung

Frau Dr. med. H. E. Daldrup-Link danke ich für die Betreuung und die Überlassung des Themas

Herrn Dr. R. A. J. Oostendorp danke ich für die Bereitstellung der Zellen und die freundliche Betreuung

Frau Dr. med. M. Rudelius danke ich für die histologischen Untersuchungen

Frau R. Busch danke ich für die Lösung statistischer Fragen

Meinem Vater für die fachliche und meiner Mutter für die moralische Unterstützung vielen Dank

Herrn A. Feith vielen Dank für die organisatorische Unterstützung