Aus dem Institut für Diagnostische Radiologie und Neuroradiologie

(Direktor Univ.-Prof. Dr. med. Norbert Hosten)

der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Entwicklung einer Methode zur magnetischen Markierung von Thrombozyten mit Eisenoxidpartikeln

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin

(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2012

vorgelegt von:

Mark-Christopher Spoerl

geb. am: 15. Mai 1985

in: Radebeul

Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reiner Biffar
1. Gutachter:	Prof. Dr. med. Norbert Hosten
2. Gutachter:	Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Speck
Tag der Disputation:	10.06.2013
Ort, Raum:	Universitätsmedizin Greifswald, Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Seminarraum P01.37/38

Inhaltsverzeichnis

EINLEITUNG 5

MATERIAL UND METHODEN 7

PARTIKELCHARAKTERISIERUNG, FRAKTIONIERUNG UND FUNKTIONALISIERUNG 7

VOREXPERIMENT MIT LEUKOZYTEN 9

THROMBOZYTEN-PRÄPARATION UND DETEKTION DER INTERNALISIERTEN PARTIKEL 10

QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER ZELLULÄREN EISENMENGE 10

FLUORESZENZMIKROSKOPIE 11

DURCHFLUSSZYTOMETRIE 12

TRANSMISSIONSELEKTRONENMIKROSKOPIE 12

THROMBOZYTEN-FUNKTIONSTESTUNG 13

MR-BILDGEBUNG 13

ERGEBNISSE 16

PARTIKELCHARAKTERISIERUNG UND FRAKTIONIERUNG 16

VOREXPERIMENT MIT LEUKOZYTEN 17

FLUORESZENZMARKIERUNG UND MNP-BELADUNG 17

EISENGEHALTSBESTIMMUNG DURCH ATOMABSORPTIONSSPEKTROSKOPIE 20

THROMBOZYTEN-FUNKTIONSTESTUNG 21

MR-BILDGEBUNG 22

DISKUSSION 26

ZUSAMMENFASSUNG 30

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 31

LITERATURVERZEICHNIS 33

ABBILDUNGSVERZEICHNIS 38

TABELLENVERZEICHNIS 39

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG 40

DANKSAGUNG 41

Einleitung

Thrombozyten spielen eine wichtige Rolle bei der Hämostase, der arteriellen Verschlusskrankheit, Herzerkrankungen, Entzündungsprozessen und Krebserkrankungen [1]. Zusätzlich stellen Thrombozytenkonzentrate eine unterstützende Maßnahme bei Zellaplasie während Chemotherapie und bei starken Blutungen aufgrund Traumata oder Operationen dar [2].

Die Markierung von Thrombozyten mittels radioaktiven Nukleiden (111In und/oder 51Cr [3]) wird seit mehreren Dekaden zu diagnostischen Zwecken bei Syndromen mit gesteigertem Thrombozytenumsatz genutzt, wie z.B. bei idiopathischer thrombozytopenischer Purpura [4, 5]. Radioaktive Markierung von Thrombozyten ist außerdem unverzichtbar in der Transfusionsmedizin für die Beurteilung des Einflusses der unterschiedlichen Präparationsverfahren für Thrombozytenkonzentrate auf die Überlebensfähigkeit der Zellen [6]. Jedoch ist die Nutzung radioaktiver Tracer bei Probandenstudien oder Forschungsstudien nicht mehr akzeptiert. Um die mit ihrem Einsatz verbundene Strahlenexposition zu vermeiden, wurden nicht-radioaktive Markierungsmethoden wie Biotinylierung von Thrombozyten vorgeschlagen [7]. Dieser Vorgang aktiviert jedoch die Thrombozyten [8] und die Sensitivität der Methode ist niedrig. Andere Methoden basieren auf der Abgrenzung durch DNA-Polymorphismus [9] oder HLA-Phäntoypen [10] bei Patienten-eigenen Thrombozyten und transfundierten Thrombozyten. Diese erfordern eine Inkompatibilität zwischen Empfänger und Spender mit dem Risiko für Alloimmunisation oder durch Transfusion übertragene Krankheiten. Dementsprechend sind sie für Studienzwecke, speziell mit gesunden Probanden, aus ethischen Gründen ungeeignet.

Die Markierung mit Eisenoxidpartikeln könnte eine neue Option für die nicht-radioaktive Markierung von Thrombozyten darstellen. Diese Partikel werden als Kontrastmittel in der Magnetresonanz-Bildgebung verwendet, vertrieben als Carboxydextran-bekoppelte Eisenoxid-Nanopartikel (Resovist, Bayer Schering AG, Berlin, Deutschland). Zellen können freie magnetische Nanopartikel (MNPs) durch Endozytose aufnehmen. Dies geschieht unter Nutzung von Transfektion (mittels Lipiden, Polyamiden oder kationischen Peptiden), Koppelung mit Funktionalisationsstoffen für Zellanheftung (Transferrin [11, 12] , Folatrezeptor [13], her2/neu-Tyrosinkinase-Rezeptor [14]) oder mittels Koppelung mit magnetisch markierten spezifischen Antikörpern an die Zielzelle [15-17]. Eine weitere Strategie ist die Herstellung multimodaler Partikel wie mit Fluorochromen verbundenen MNPs zur noninvasiven Darstellung mittels MR-Bildgebung und zur Detektion der fluoreszierender Farbstoffe durch hochsensitive optische Fluoreszenzbildgebung [18].

Zusätzlich könnte die magnetische Markierung von Thrombozyten die einzigartige Option der Visualisierung der markierten Zellen in vivo mittels MRT eröffnen. In einer Publikation von von zur Mühlen et al wurden Thrombozyten mit an Antikörper konjugierte Eisenoxid-Mikro- und Nanopartikel gebunden. Die benutzten Antikörper waren gegen den aktivierten Glykoprotein-IIb/IIIa-Komplex auf der Thrombozytenoberfläche gerichtet. Dies ermöglichte die MR-Bildgebung von induzierten Thromben und artherosklerotischen Plaques in Tiermodellen [19-21]. Jedoch ist die Nutzung von markierten Antikörpern an Menschen problematisch.

Die hier vorgelegte Arbeit erbringt mittels In-vitro-Studien einen Nachweis für die Markierung von humanen Thrombozyten mit Carboxydextran-beschichteten Eisenoxid-Nanopartikeln (Resovist) mit für Überlebensstudien und Visualisation mittels MR-Bildgebung suffizienten Zellkonzentrationen von Eisen.

Material und Methoden

Partikelcharakterisierung, Fraktionierung und Funktionalisierung

Es wurden kommerziell erhältliche und für die klinische Anwendung zugelassene Carboxydextran-bekoppelte Eisenoxid-Nanopartikel (Resovist, Bayer Schering AG, Berlin, Deutschland) verwendet. Diese setzen sich zusammen aus ferrimagnetischen Kernen und einer Hülle aus Carboxydextran. Die Nanopartikel liegen suspendiert in Wasser vor und formen eine stabile dunkelbraune Dispersion, bezeichnet als Ferrofluid, mit einer Konzentration von 0,5 M Eisen.

Die MRT-Experimente wurden hauptsächlich mit unveränderter Resovist-Suspension und deren Dilutionen durchgeführt. Um den Einfluss der Partikelgröße auf das MR-Signal zu analysieren, wurde ein Experiment mit verschiedenen Größenfraktionen der MNPs verwirklicht. Für diese Zwecke wurde die Resovist-Suspension in 4 diskrete Fraktionen mittels inhomogener magnetischer Felder in einer magnetischen Separationssäule (MACS LS, Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Deutschland) in einem regulierbaren elektromagnetischen Feld (B-E 10V, Bruker, Karlsruhe, Deutschland) aufgeteilt. Die Partikel verbleiben abhängig vom spezifischen magnetischen Moment (Partikel-Kernvolumen) in der Separationssäule. Bei niedriger magnetischer Feldstärke trifft dies nur auf die größeren Partikel zu *(Abbildung 1).*

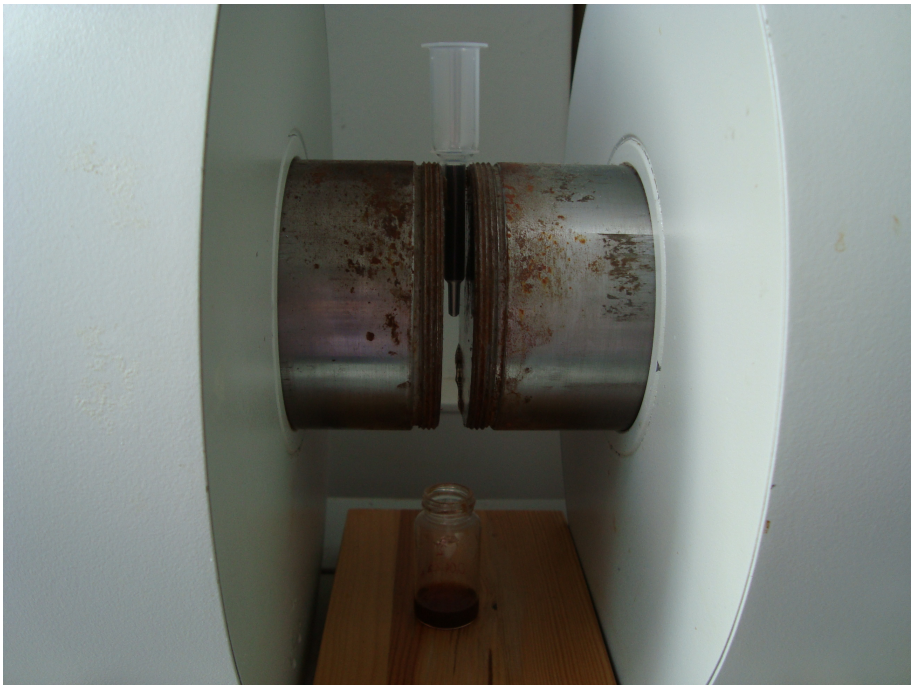


***Abbildung 1**: MACS LS Separationssäule in Magnetfeld, unten aufgefangene Resovist-Fraktion*

Nach der Separation wurde der durchschnittliche hydrodynamische Durchmesser der Partikelfraktionen mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS), auch als Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) bezeichnet, bestimmt.

Für weitere Experimente wurden zwei Chargen von Resovist-Partikeln mit zwei verschiedenen Fluoreszenzmarkern markiert [22]: Albumin-Fluorescein-Isothiozyanat (FITC-Alb, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) und Albumin-Texas Red (Texas Red-Alb, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri). Zur Aktivierung der Carboxydextranhülle wurden Resovist-Partikel in Citratpuffer (pH 5) und Natriumperiodat resuspendiert und für 40 Minuten bei 4°C inkubiert. Die aktivierten Partikel wurden vom Überschuss mittels Gelfiltration mit einer PD-10 Säule (Sephadex, GE Healthcare, München, Deutschland) getrennt. Anschließend wurden die Partikel mit den Fluoreszentmarkern 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Die Reaktion wurde mittels Zugabe von Borandimethylamin (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) gestoppt. Nach 2 Stunden bei 4°C wurde Ethanolamin-HCl (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) zugegeben, gefolgt von einer Inkubation bei 4°C über Nacht. Zum Schluss wurden

die markierten Resovist-Partikel mittels MACS LS-Säule (Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Deutschland) magnetisch separiert und in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) suspendiert.

Vorexperiment mit Leukozyten

Zur Erprobung der Methode wurden Vorexperimente mit Leukozyten durchgeführt. Ausgangsmaterial war hirudinisiertes Vollblut von gesunden Probanden. Mittels Zentrifugation und Waschung mit phosphatgepufferter Salzlösung wurde das Blutplasma vom Vollblut abgetrennt und verworfen. Die Zellsuspension wurde mit unkonjugierten Resovist-Partikeln inkubiert (10 mM Eisen; 30 Minuten; 37°C). Überschüssige MNPs wurden mittels Zentrifugation und Waschung mit PBS abgetrennt. Anschliessend wurden die Erythrozyten mit BD Pharm Lyse (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey) lysiert.

Die Anfärbung der unkonjugierten MNPs erfolgte mittels Berliner-Blau-Färbung: zuerst Fixerung eines Tropfens der Zellsuspension mit 1 Tropfen Formaldeyhdlösung auf einem Objekträger, danach Zugabe von 1 Tropfen Kaliumhexacyanidoferrat, abschliessend Detektion der Leukozyten mit MNPs unter dem Lichtmikroskop (Carl Zeiss, Jena, Deutschland).

Thrombozyten-Präparation und Detektion der internalisierten Partikel

Hirudinisiertes Vollblut von gesunden Probanden wurde zentrifugiert (120 g; 20-24°C; 20 Minuten) und Thrombozyten-reiches Plasma in einer Sepharose CL-2B Flüssigchromatographiesäule (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) gelfiltriert. Die gelfiltrierten Thrombozyten wurden mit phosphatgepufferter Salzlösung (pH 7,4) resuspendiert zu Fraktionen von 100.000-250.000 Thrombozyten/µL (Sysmex UX-21 N, Sysmex Deutschland, Norderstedt, Deutschland) und mit unkonjugierten oder Fluoreszenzgelabelten Resovist-Partikeln inkubiert (10 mM Eisen; 30 Minuten; 37°C). Nach Zugabe von Adenincitrat-Dextrose A (ACD-A, Baxter, Unterschleißheim, Deutschland;111 µL/mL gelfiltrierter Thrombozyten), Apyrase (Grad IV; Sigma-Aldrich; 1,000 U/mL) und 1,000 U/mL Hirudin wurden die Thrombozyten gereinigt (650 g; 7 Minuten; 20–24°C), um überschüssige Partikel zu eliminieren, und in Tyrodes Puffer (pH 7.2; beinhaltet 60 µM bovines Serum Albumin (BSA), 5.6 mM Glukose, 5 µM Calciumchlorid und 5 µM Magnesiumchlorid) resuspendiert und vor weiterer Nutzung für 45 Minuten bei 37°C ruhig gestellt.

Quantitative Bestimmung der zellulären Eisenmenge

Für die Quantifizierung des zellulären Eisens wurde die Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) herangezogen. Gelfiltrierte Thrombozyten wurden mit unkonjugierten Resovistpartikeln (Eisenkonzentration 10mM) oder mit PBS (Blindprobe) 30 Minuten bei 37°C inkubiert, anschließend zweimal mit PBS gewaschen, gezählt und durch Pankreatin und Natriumlaurylsulfat 30 Minuten bei

37°C zur Degradation von Zell- und Proteinstrukturen aufgeschlossen. Um Eisenkomplexe und Salze aufzuschließen, wurden die Proben mit Salpetersäure und Wasserstoffperoxid erhitzt. Der zelluläre Eisengehalt wurde mit einer Eisenkalibrationskurve an einem Solaar 898QZ Atomabsorptionsspektroskop (Unicam Chromatography, Kassel, Deutschland) bestimmt.

Fluoreszenzmikroskopie

Gelfiltrierte Thrombozyten wurden mit Texas Red-Alb markierten Resovist-Partikeln (Eisenkonzentration 10 mM) oder PBS inkubiert (30 Minuten; 37°C) und anschließend auf ein Kollagen-beschichtetes Deckgläschen (BD Biosciences Europe, Heidelberg, Deutschland) mittels Sedimentation (30 Minuten bei 20–24°C) aufgetragen. Anschließend wurden die Thrombozyten mit PBS gewaschen und mit ethanolischer Oregon Green 488 DHPE Lösung (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) inkubiert, um die Zellmembran anzufärben. Die Zellen wurden mit 1%iger Formaldehydlösung in PBS fixiert und in Mowiol (Sigma-Aldrich Biochemie, Hamburg, Deutschland) eingebettet. Doppelfluoreszenz-Bilder wurden mittels Keyence BZ-8000 Fluoreszenzmikroskop und dem BZ-Image analyzer 2.5 (Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland) erstellt. Thrombozyten mit grün angefärbter Membran ohne rot angefärbte Resovistpartikel stellten die Blindprobe dar.

Durchflusszytometrie

FITC-Alb markierte Resovist-Partikel (Eisenkonzentration 10mM) wurden mit gelfiltrierten Thrombozyten inkubiert (30 Minuten; 37°C). CD42a Phycoerythrin Antikörper (BD Biosciences Europe) wurden für Thrombozyten-Gating in einem Cytomics FC 500 Durchflusszytometer (Beckman Coulter, Fullerton, California) mit einem blauen Argonlaser mit einer Exzitation bei 488 nm für orange Fluoreszenz (FL2) zugegeben. Für die Fluoreszenzlöschung (Quenching) zur Bestimmung des Ausmaßes des Partikel-Besatzes der äußeren Zellmembran wurde Trypan-Blau verwendet [23, 24]. Reine unmarkierte Thrombozyten dienten als Blindprobe.

Transmissionselektronenmikroskopie

Gelfiltrierte Thrombozyten wurden mit PBS gereinigt und mit unkonjugierten Resovistpartikeln (Eisengehalt 10 mM) oder PBS inkubiert (30 Minuten; 37°C) und nacheinander mit 0,1%igem und 3%igem Glutaraldehyd in White`s Salzlösung bei 20-24°C für 60 Minuten und anschließend über Nacht fixiert. Die Postfixation wurde mit 1%iger Osmiumtetroxidlösung in White`s Salzlösung 60 Minuten durchgeführt, gefolgt von Immersion der Probe in 0,5%igem Uranylacetat. Nach stufenweiser Dehydrierung in Azeton wurde das Material in Agar eingebettet. Die Proben wurden mit einem Ultramikrotom (Reichert Ultracut, Leica UK Ltd, London, United Kingdom) geschnitten, mit Uranylacetat und Bleicitrat angefärbt und mit einem EM 906 Transmissionselektronenmikroskop (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) bei 80 kV analysiert.

Thrombozyten-Funktionstestung

Gelfiltrierte Thrombozyten wurden mit Resovist-Partikeln (Eisengehalt 10 mM) oder PBS inkubiert (30 Minuten, 37°C) und bezüglich ihrer Aktivierungseigenschaften analysiert. Dazu wurden Thrombinreceptor agonist peptide 6 (TRAP-6; Sigma-Aldrich) oder Kollagen (Nycomed, Konstanz, Deutschland) als Induktor für die Licht-Transmissions-Aggregometrie (LTA) oder Durchflusszytometrieanalyse genutzt.

Die Licht-Transmissions-Aggregometrie wurde mit einem 4-Kanal-Aggregometer (Labitec, Ahrensburg, Deutschland) durchgeführt. Die Thrombozytenaggregation wurde mittels Turbidimetrie gemessen, induziert durch die Zugabe von 1 µg/mL Kollagen oder 20µmol/L TRAP6.

Durchflusszytometrie wurde zur Bestimmung des Anteils der Thrombozyten mit Zellmembran-gebundenen CD62P (P-Selektin) als Marker für Thrombozytenaktivierung durchgeführt. 20 µmol/L TRAP-6 dienten zur Induktion der Thrombozytenaktivierung.

MR-Bildgebung

Ein 7 Tesla Kleintier-MRT (ClinScan S-line 7 T, Bruker BioSpin, Karlsruhe, Deutschland) mit Siemens Syngo Arbeitsstation (Siemens Medical Solutions, Erlangen, Deutschland) wurde für die Bilderfassung benutzt *(Abbildung 2).*

***Abbildung 2**: 7 Tesla Kleintier-MRT (ClinsScan S-line 7T, Bruker Biospin)*

Für hohe Auflösung und hohen Kontrast der Bilder der MNPs wurde ein T2*-gewichtetes Protokoll für zweidimensionale Bilderfassung, ein Flipwinkel von 180° und eine FoV von 40x40 mm eingesetzt.

Die Repetitionszeit (TR) ist die Zeit zwischen zwei Exzitationspulsen und bestimmt die longitudinale Relaxation T1. Die Echozeit (TE) ist das Intervall zwischen der Anwendung des Exzitationspulses und der Erfassung des MR-Signals und bestimmt die horizontale Relaxation T2. Resovist als magnetisches Kontrastmittel, welches besonders stark in T2*-gewichteten Bildern zur Geltung kommt, benötigt lange TE zur Betonung der T2-Komponente und lange TR um den Effekt von T1 zu eliminieren.

Mit unseren Experimenten evaluierten wir, welche TE- und TR-Zeiten den besten Kontrast für Resovist generieren. Magnetisch markierte Thrombozyten oder Resovist-Testlösungen wurden in 8-Kammer-Kulturplatten (BD Biosciences, San Jose, California) auf einer phasengesteuerten 1H Rattengehirn-Spule mit einer Spulenkonfiguration von 2*2 (Bruker BioSpin) platziert *(Abbildung 3).*

***Abbildung 3**: 8-Kammer-Kulturplatte zur Platzierung auf der MRT-Spule*

Der Kontrast von mit Resovist markierten Thrombozyten mit unterschiedlicher Zellzahl wurde mit dem Kontrast unmarkierter Thrombozyten in vitro verglichen, um die minimale Konzentration von markierten Zellen zu bestimmen, die noch eine MR-Bildgebung ermöglicht. Weiterhin wurde die kleinste und die größte Resovist-Partikelfraktion mit vergleichbarer Konzentration von 0,5 mM Eisen zum Vergleich des MR-Signals unterschiedlicher Partikelgrößen herangezogen. Koronale Aufnahmen von spezifischen Lösungen innerhalb der Kammern der Kulturplatten wurden mit Siemens Syngo Software mittels zirkulären regions-of-interest (ROIs) von 2.000 Pixeln bezüglich Signalintensität ausgewertet. Die Signalintensität des Artefaktes (SI1), die Signalintensität des Mediums (SI2) und die Standardabweichung des Hintergrundrauschens (SD) wurden bestimmt. Das contrast-to-noise-ration (CNR) wurde bestimmt mittels der Gleichung

$$CNR = \frac{(SI_1 - SI_2)}{SD} \qquad (1)$$

Ergebnisse

Partikelcharakterisierung und Fraktionierung

Resovist wurde fraktioniert mit magnetischen Feldstärken durch Stromstärken im Bereich von 0,0 A bis 1,0 A *(Tabelle 1).* Die Tabelle zeigt die durch PCS bestimmten mittleren hydrodynamischen Durchmesser der Resovistfraktionen. Im Vergleich dazu wurde der durchschnittliche hydrodynamische Durchmesser von 60,8 nm für die unfraktionierte Resovist-Suspension mittels PCS ermittelt.

Fraktionierungs-Stromstärke [A]	Mittlerer hydrodynamischer Durchmesser [nm]; PCS
0,0	92,3
0,0311	64,7
0,25	45,5
1,0	26,9

***Tabelle 1**: Bestimmung des mittleren hydrodynamischen Durchmessers der Resovistfraktionen*

Vorexperiment mit Leukozyten

Mittels Berliner-Blau-Färbung konnte durch Lichtmikroskopie qualitativ eine Beladung der Leukozyten mit MNPs nach Inkubation bewiesen werden *(Abbildung 4).*

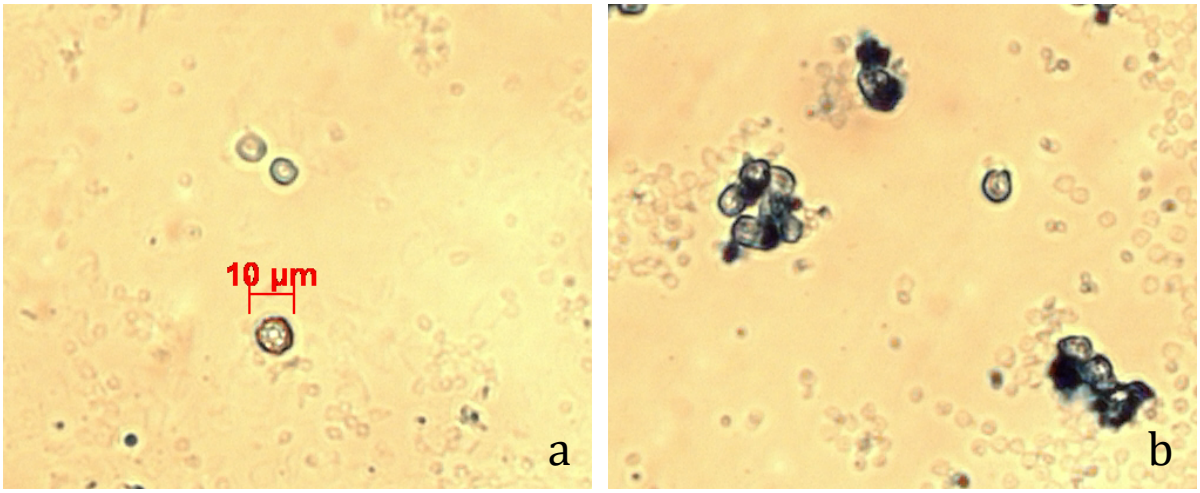


Abbildung 4*: Lichtmikroskopische Aufnahme von ungelabelten (a) und MNP-gelabelten Leukozyten (b) nach Berliner-Blau-Färbung. Im Vergleich deutliche Blaufärbung der gelabelten Leukozyten rechts gegenüber den ungelabelten links.*

Fluoreszenzmarkierung und MNP-Beladung

FITC-Alb-markierte MNPs hefteten sich sehr effizient an Thrombozyten, was in mehr als 98% markierte Zellen bei der Bestimmung mittels Durchflusszytometrie resultierte *(Abbildung 5).*

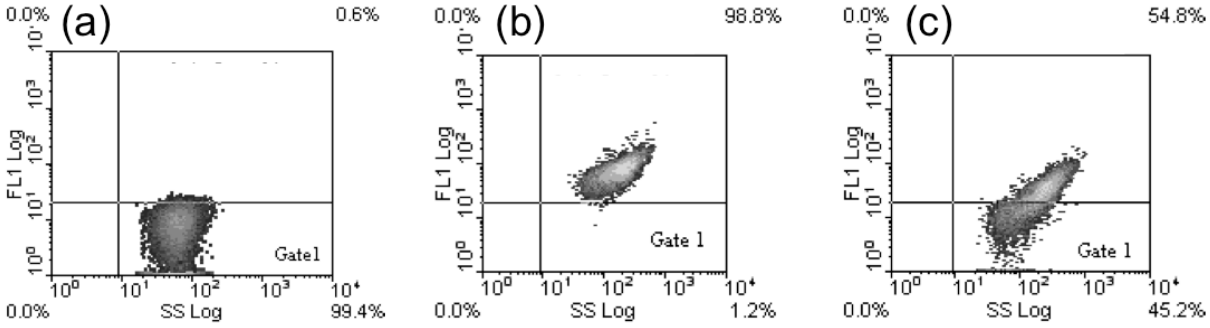


***Abbildung 5**: Durchflusszytometrie-Scatter-Graph von ungelabelten (a), gelabelten (b) und mit Trypan-Blau gequenchten gelabelten Thrombozyten (c). Der obere rechte Quadrant charakterisiert das Gate für fluoreszierende Thrombozyten. Nur 0,6% der ungelabelten Thrombozyten zeigen eine Fluoreszenz, im Vergleich zu 98,8% der gelabelten. Nach Quenching zeigen nur noch 54,8% der Zellen ein Fluoreszenzsignal.*

Das Signal nahm bis auf 54,8% bei Zugabe von Trypan-Blau ab, was anzeigt, dass etwa die Hälfte der Partikel durch die Zellen internalisiert wurde *(Abbildung 5c).* Das Trypan-Blau interagiert mit dem FITC und führt dabei zu einer Fluoreszensauslöschung. Da der Farbstoff lebende Zellen nicht penetrieren kann, neutralisiert er ausschließlich das Signal von FITC welches sich auf der äußeren Zellmembran befindet.

Durch Fluoreszenzmikroskopie (FM) und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurde die Lokalisation der Resovist-Partikel innerhalb der Thrombozyten und auf der äußeren Zellmembran bestätigt *(Abbildung 6; Abbildung 7).*

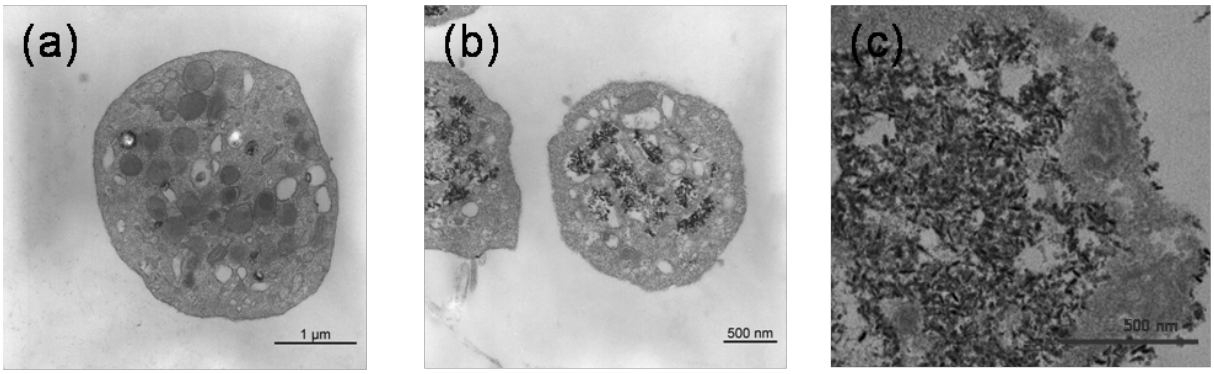


***Abbildung 6**: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Thrombozyten; (a) ungelabelter Thrombozyt, (b) MNP-gelabelter Thrombozyt, (c) Nahaufnahme der MNP-beladenen Zellmembran eines gelabelten Thrombozyten. Die Resovistpartikel stellen sich als kleine Komma-förmige Strukturen auf der Zellmembran und im Zellinneren dar.*

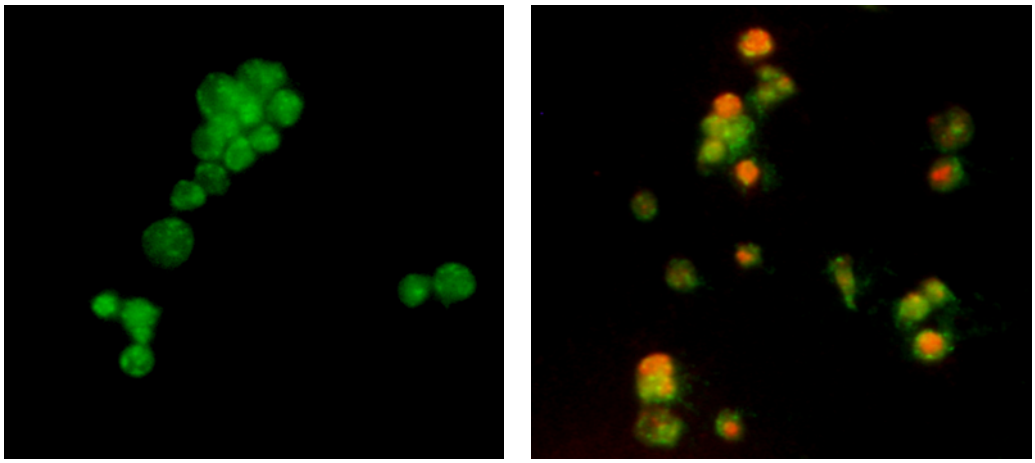


***Abbildung 7**: Fluoreszenzmikropskopie von ungelabelten und MNP-gelabelten Thrombozyten, die Zellmembran ist mittels Oregon Green 488 DHPE grün markiert, MNP sind mittels Texas-Red rot markiert. Im Vergleich der ungelabelten (links) mit den gelabelten (rechts), lassen sich die MNP nachweisen.*

Eisengehaltsbestimmung durch Atomabsorptionsspektroskopie

Die Bestimmung des Eisengehaltes ermittelte Werte von 0,019 ± 0,001 pg Eisen pro Zelle bei den unmarkierten Thrombozyten im Vergleich zu 1,805 ± 0,089 pg Eisen pro Zelle bei den Resovist-markierten Thrombozyten *(Abbildung 8).*

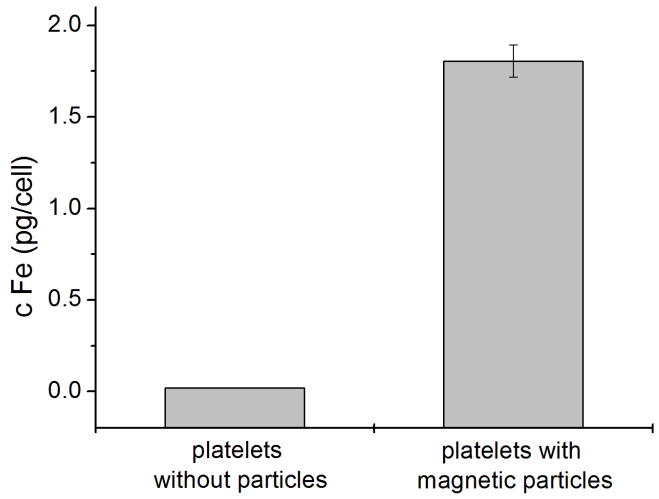


***Abbildung 8**: Eisengehaltsbestimmung mittels AAS von ungelabelten und MNP-gelabelten Thrombozyten. Im Vergleich enthalten unmarkierte Thrombozyten 0,019 pg Eisen pro µL gegenüber 1,805 pg Eisen pro µL in markierten Thrombozyten.*

Die Sensitivität dieser Methode zur Eisengehaltsbestimmung via AAS liegt bei 2,8 pg Eisen/µL, was den Nachweis von mindestens 2 magnetisch markierten Thrombozyten pro µL erlaubt.

Thrombozyten-Funktionstestung

Die Funktion der Thrombozyten wurde analysiert mittels Zugabe von Kollagen und TRAP-6 als Induktoren bei Aggregometrie- und Durchflusszytometrieanalysen.

Die Auswertung der Expression des Aktivierungsmarkers CD62P bei der Durchflusszytometrie zeigte eine Expression von 10 % bei unmarkierten Kontroll-Thrombozyten, Resovist-markierte Thrombozyten zeigten eine CD62P Expression von 50% der Zellen. Die Zugabe von TRAP-6 resultierte in einer CD62P Expression nahezu aller unmarkierten und markierten Thrombozyten.

Die Ergebnisse der Aggregometrie zeigten verminderte Aktivierungsfähigkeit der mit Resovist markierten Thrombozyten im Vergleich zu unmarkierten Thrombozyten bei Verwendung von TRAP-6 als Induktor. Die Zugabe von Kollagen resultierte in vergleichbarer Aktivierung von markierten und unmarkierten Thrombozyten.

MR-Bildgebung

Die Fraktionen mit einem mittleren hydrodynamischen Durchmesser von 26,9 nm und 92,3 nm wurden ausgewählt, um kleine und große MNPs zu repräsentieren. Die Eisenkonzentration wurde angepasst, sodass für beide Fraktionen eine Konzentration von 0,5 mM vorlag *(Abbildung 9).*

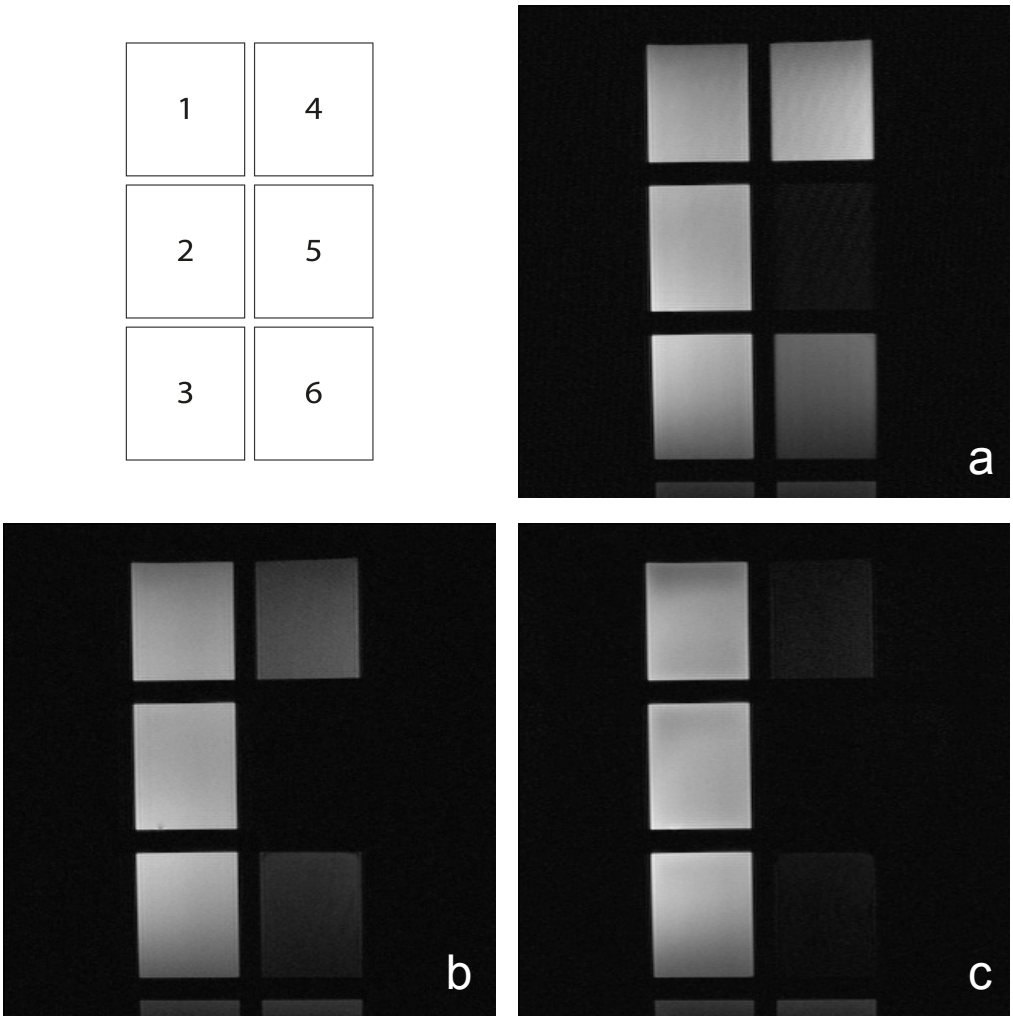


Abbildung 9*: MRT-Bilder von Resovist-Fraktionen. Schema: 1-3 Wasser; 4 26,9 nm Resovist-Fraktion; 5 leer; 6 92,3 nm Resovist-Fraktion. a) TE 14 ms, TR 2.000 ms; b) TE 88 ms, TR 2.000 ms; c) TE 202 ms, TR 2.000 ms. Mit steigender TE verstärkt sich der Kontrast zwischen Wasser und Partikelsuspension. Größere Partikel (92,3 nm) ergeben stärkeren Kontrast als kleinere Partikel (26,9 nm).*

Die CNR Analyse ergab einen höheren Kontrast für die größeren Partikel im Vergleich zu den kleineren Partikeln, sowohl bei TR und TE Abstufungen. Erhöhung des TE führt zu einer Annäherung des CNR beider Partikelgrößen *(Abbildung 10).* Der beste Kontrast für Resovist wird erreicht bei Werten von 1.000 ms bis 1.500 ms für TR und gößer als 150 ms für TE.

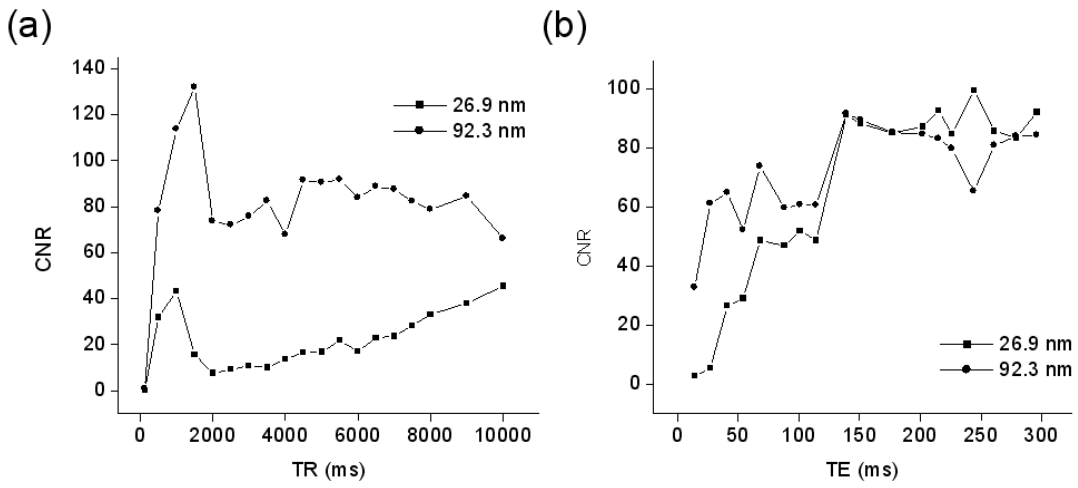


Abbildung 10*: CNR-Analyse von 26,9 nm und 92,3 nm Resovistfraktionen; a) CNR in Abhängigkeit von TR, b) CNR in Abhängigkeit von TE; das CNR-Optimum liegt bei einer TR von 1000 ms und TE im Bereich von größer 150 ms.*

Die Ergebnisse der Aufnahmen von markierten Thrombozyten zeigt *Abbildung 11*.

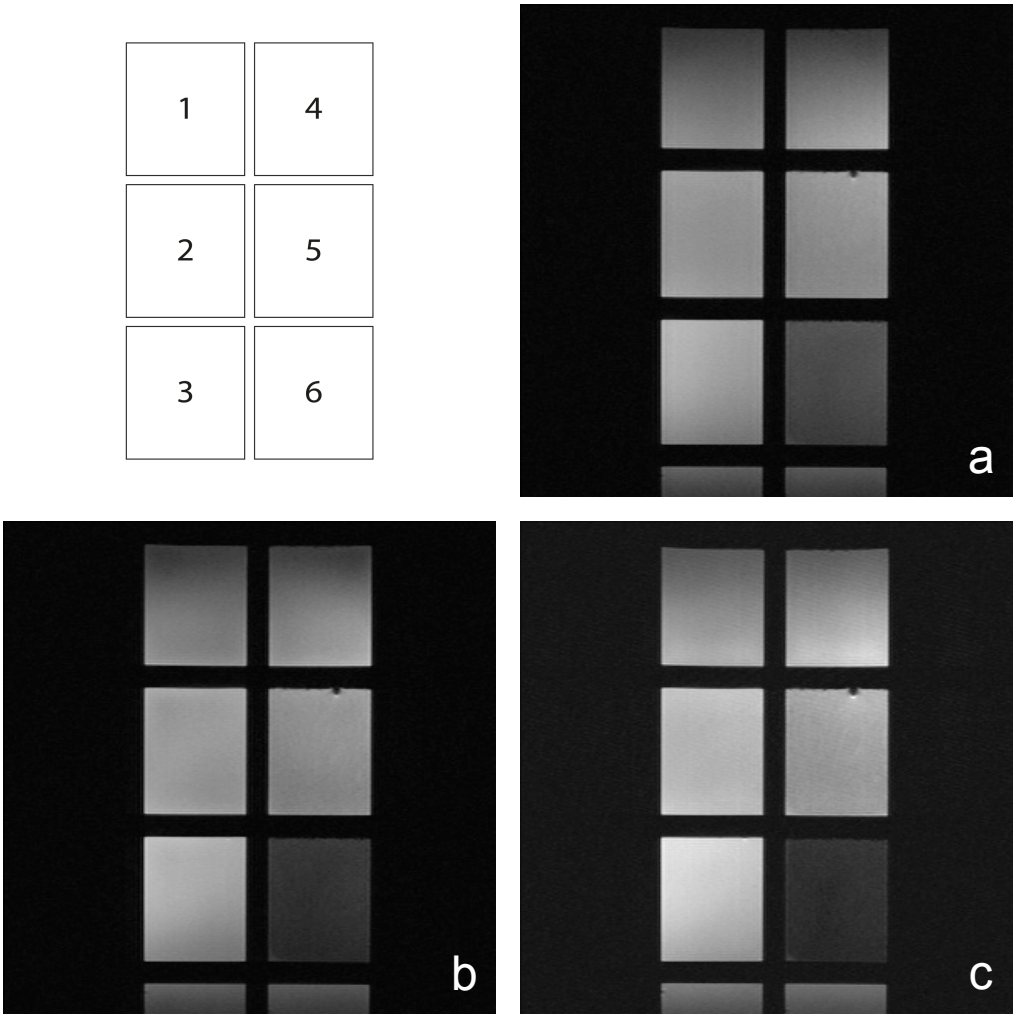


Abbildung 11*: MRT-Bilder von Thrombozyten. Schema: 1 ungelabelte Trc 1.130/µL; 2 ungelabelte Trc 11.300/µL; 3 ungelabelte Trc 113.000/µL; 4 gelabelte Trc 1.130/µL; 5 gelabelte Trc 11.300/µL; 6 gelabelte Trc 113.000/µL. a) TE 101 ms, TR 2.000 ms; b) TE 202 ms, TR 2.000 ms; c) TE 296 ms, TR 2.000 ms*

Das CNR für die entsprechenden Zellzahlen von 1.130, 11.300, 113.000 magnetisch markierten Thrombozyten pro µL zeigt *Abbildung 12*. Das ermittelte CNR war wie erwartet abhängig von der Zellzahl in der entsprechenden Probe, je höher die Zellzahl markierter Thrombozyten desto besser der Kontrast.

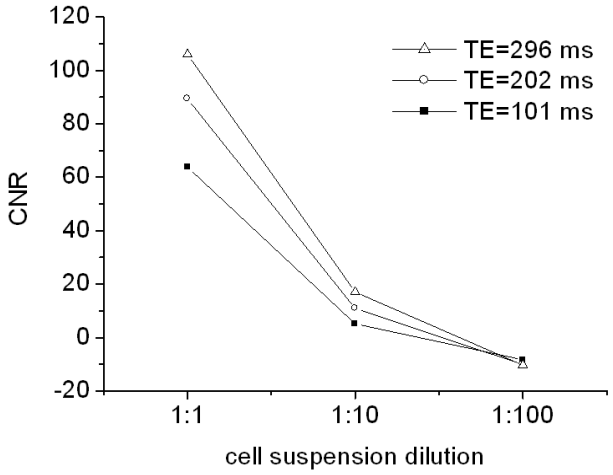


***Abbildung 12**: CNR-Analyse von Thrombozytensuspensionen. Zellsuspension 1:1 entspricht 113.000 Thrombozyten/µL; TR 1.500 ms. Es zeigt sich ein Abfall des CNR bei größerer Verdünnung der Zellsuspensionen.*

Diskussion

In der vorgelegten Arbeit konnte gezeigt werden, dass magnetische Markierung von Thrombozyten ohne Verbindungselemente wie spezifische Antikörper-Antigen- oder Rezeptor-Protein-Interaktionen für das MR-Tracking machbar ist. Als markierender Stoff wurde das von FDA und EMA zugelassene Resovist, welches sich aus superparamagnetischen Eisenoxid-Partikeln mit einer Carboxydextran-Hülle zusammensetzt. Die Markierung war für eine Detektion von 2 Thrombozyten/µl mittels AAS fähig. Dieses würde Studien zum Zellüberleben von Thrombozyten mit einer mehr als 10-fach höheren Sensitivität im Vergleich zu radioaktiver Markierung zulassen. Derzeitiges radioaktives Labelling erreicht eine Sensitivität von 1 Zelle in 10 µL, siehe Mendis et al mit 51Cr-markierten Monozyten [25].

Die markierten Thrombozyten lassen sich mit der MR-Bildgebung visualisieren, was neue Perspektiven für Überlebensstudien von Thrombozyten mit menschlichen Probanden und Patienten eröffnet. Dies könnte sich als wertvolles Instrument für diagnostische und therapeutische Interventionen erweisen bei Patienten mit durch Thrombozyten vermittelten hyperkoagulativen Erkrankungen wie koronarer Herzerkrankung, Apoplex oder Blutungserkrankungen mit Thrombozytopenie. Im Gegensatz zu anderen MR Kontrastmitteln wie Gadoliniumverbindungen bestehen superparamagnetische Eisenoxid-Partikel aus biologisch abbaubarem Eisen, welches biokompatibel ist und dementsprechend durch Zellen abgebaut werden kann. Die genutzten Resovist-Partikel können mittels Lichtmikroskopie und Eisenfärbung oder via Elektronenmikroskopie detektiert werden. Dies erlaubt die Qualitätskontrolle des Markierungsprozesses vor der medizinischen Anwendung. Es ist am wahrscheinlichsten, dass die internalisierten Resovist-Partikel im offenen

kanalikulären System angereichert werden. Es ist nicht auszuschliessen, dass Partikel ebenfalls innerhalb der Alpha-Granulas gespeichert werden.

Frühere Publikationen belegen, dass Thrombozyten in der Lage sind, Partikel wie Latexpartikel mit Partikelgrößen im Bereich von Nano- bis Mikrometer [26], kolloidales Gold [27] oder Bakterien [28] zu internalisieren. Unlängst erreichte eine Forschungsgruppe Oldenburg et al die Markierung von rehydrierten lyophilisierten Thrombozyten (RL platelets) mit MNPs in Feridex für die Bildgebung mittels magnetomotorischer optischer Koheränztomographie mit Gewebephantomen in vitro und in Schweinearterien ex vivo. Dies könnte die Weiterentwicklung von RL Thrombozyten zum Thrombozytenersatz bedeuten. Im Gegensatz zur Markierung von RL Thrombozyten mit Feridex, welche einen Eisengehalt von 0,048 pg/Thrombozyt nach der Inkubation über Nacht erreichte [29], hat unsere Arbeit eine Resovist-Partikel-Sättigung innerhalb von 30 Minuten mit einem Eisengehalt von rund 2 pg Eisen pro Zelle erreicht. Dies könnte mit dem größeren Eisenoxid-Kern von Resovist zusammenhängen, sodass das Verhältnis von Eisenoxid-Kern und Hüllmaterial gegenüber dem von Feridex überlegen ist und in erhöhter Eisenaufnahme seitens der Thrombozyten resultiert. Sowohl relativ kurze Markierungszeit als auch das starke Signal stellen einen wesentlichen Vorteil für die Weiterentwicklung der Methode für die Nutzung in vivo dar. Ein weiterer Vorteil der Eisenoxid-Partikel ist die höchste Signalveränderung pro Metalleinheit [30]. Die Partikel verursachen einen Signalverlust in T2*-gewichteter MR durch Suszeptibilitätsunterschiede zu angrenzendem Material. Es sind verschiedene Größenintervalle der Eisenoxid-Partikel in Gebrauch: very small iron oxide particles (VSOP) mit Durchmesser kleiner 10 nm, ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles (USPIO) zwischen 10 und 40 nm, und small superparamagnetic iron oxide particles (SPIO) mit Durchmessern von 50 bis 150 nm [31]. Das beste Signal zeigte

sich bei Anwendung der größten Partikelfraktion der originalen Resovist-Suspension (Abbildung 6). Dieses Ergebnis wird durch andere Arbeitsgruppen bestätigt, welche Unterschiede zwischen der Bildgebung von Eisenoxid-Nano- und Mikropartikeln [21, 32] oder USPIOs und SPIOs [33], analysierten. Als mögliche Begründung dieser Eigenschaft werden das magnetische Moment und die erhöhte Suszeptibilität in individuellen Zellen durch größere Partikel angesehen, welche potentiell die Einzelzell-Bildgebung oder, wie im Falle von Thrombozyten, die Darstellung von nur wenigen Zellen ermöglichen könnte. Jedoch muss der Vorteil des erhöhten Signals dem Aufwand der Subfraktionierung einer für medizinische Zwecke fertig nutzbaren Partikelsuspension gegenüber gestellt werden.

Für eine optimale Visualizierung mittels MR ist sowohl das CNR von Bedeutung als auch die tolerierbare Untersuchungszeit für das Individuum. Dementsprechend sollte eine optimale Einstellung von TE zwischen 200 bis 300 ms und TR im Bereich von 1.500 bis 2.000 ms getroffen werden.

Kritisch für die Nutzbarkeit von MNPs als Markierstoffe ist der Einfluss auf die Thrombozytenfunktion. Die Analyse mittels Durchflusszytometrie zeigte initial eine Expression von CD62P von annähernd der Hälfte der applizierten Thrombozyten durch magnetische Markierung im Vergleich zu 10% bei unmarkierten Thrombozyten, was bedeutet, dass etwa 50% der markierten Thrombozyten weiterhin intakt sind. Jedoch erreichte die Zugabe von TRAP-6 eine annähernd vollständige Aktivierung der Thrombozyten bei beiden Fällen. Aufgrund der hohen Sensitivität der AAS sollten im Falle von 50% funktionsfähigen Thrombozyten Überlebensstudien durchführbar sein. In vielen Studien zeigte sich, dass der Anteil der CD62P Expression in Thrombozytenkonzentraten für therapeutische Zwecke im zugelassenen Zeitrahmen der Lagerung im Bereich von 35 bis 50% lag [34, 35]. In Bezug drauf, erscheint das Ausmaß der CD62P Expression nach Markierung

akzeptabel. Die Thrombozytenaggregometrie zeigte, dass die Markierung mit MNPs keinen Einfluss auf die Thrombozytenaktivierung durch Kollagen hatte. Funktionsfähige Thrombozyten stellen die Grundvoraussetzung für Studien dar, die Thrombozytenfunktionen in vivo bewerten. Kollagen induziert eine Thrombozytenaktivierung mittels Glykoprotein-VI-vermittelten Signalweg, während TRAP-6 Thrombozyten über die Gq-vermittelte Bahn aktiviert [36]. Dies könnte als Erklärung für die erfassten Unterschiede der Thrombozytenaggregation zwischen Kollagen und TRAP-6 dienen.

Obwohl unsere Ergebnisse aussichtsreich erscheinen, gibt es einige wichtige Aspekte, welche weiterhin abgeklärt werden müssen, bevor Resovist-markierte Thrombozyten für in vivo Zwecke genutzt werden können. Ein ausschlaggebender Punkt ist die potentielle Immunogenität der markierten Thrombozyten. Dies ist speziell für die auf der äußeren Zellmembran haftenden Partikel relevant, welche in direkten Kontakt mit immunkompetenten Zellen in vivo kommen würden. Die Partikelhüllen bestehen aus Dextran, welches eine Möglichkeit der Entfernung der außen anhaftenden Partikel mittels enzymatischer Aufspaltung durch Dextranase liefern könnte. Jedoch stellt die Entfernung des Enzyms vor der Transfusion der markierten Thrombozyten eine Schwierigkeit dar. Ein zweiter Ansatz wäre die Anwendung von Oberflächenmaskierung mittels Polyethylenglycol (PEG). Aufgrund der negativen Ladung ihrer Hülle, interagieren MNPs mit Plasmaproteinen und werden aufgrund folgender Aggregation schnell aus dem Plasma entfernt. Diese Aggregation könnte durch die von Chertok et al vorgestellte Oberflächenmaskierung mit PEG verhindert werden [37].

Wenn für diese Aspekte eine Lösung gefunden wird, könnten magnetisch markierte Thrombozyten ein interessantes diagnostisches Instrument darstellen.

Zusammenfassung

Thrombozyten können mittels Präparation mit superparamagnetischen Nanopartikeln markiert werden, welche für die Nutzung am Menschen zugelassen sind. Ohne Zugabe weiterer Chemikalien ist die erreichte Konzentration von gespeicherten Resovist-Partikeln in den Thrombozyten sowohl suffizient für Überlebensstudien als auch für Signaldetektion mittels MR.

Magnetisch markierte Thrombozyten können zu einem wichtigen diagnostischen Instrument für Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen, Blutungserkrankungen oder Thrombozytopenie werden. Weiterhin können sie nützlich für die Erfassung des Einflusses von unterschiedlichen Präparationsmethoden auf das Thrombozytenüberleben in der Transfusionsmedizin sein.

Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
ACD-A	Adenincitrat-Dextrose A
BSA	Bovines Serumalbumin
CD62P	P-Selektin
CNR	engl. Contrast to Noise Ratio; Kontrast-Rausch-Verhältnis
DLS	Dynamische Lichtstreuung
EMA	engl. European Medicines Agency
FDA	engl. Food and Drug Administration (USA)
FITC	Fluorescein-Isothiozyanat
FM	Fluoreszenzmikroskopie
FoV	engl. Field of View; Sichtfeld
LTA	Licht-Transmissions-Aggregometrie
MNP	Magnetische Nanopartikel
MR	Magnetresonanz
MRT	Magnetresonanztomographie
PBS	engl. Phosphate Buffered Saline; phosphatgepufferte Salzlösung
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
PEG	Polyethylenglycol
ROI	engl. Region of Interest
SPIO	engl. small superparamagnetic iron oxide particles
T1	Longitudinale Relaxationszeit
T2	Transversale Relaxationszeit
T2*	Effektive transversale Relaxationszeit

TE	engl. Time to Echo; Echozeit
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TR	engl. Time to Repeat; Repetitionszeit
TRAP-6	engl. Thrombinreceptor agonist peptide 6
Trc	engl. Thrombocyte
USPIO	engl. ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles
VSOP	engl. very small iron oxide particles

Literaturverzeichnis

1. Michelson, A.D., *Platelet Function Testing in Cardiovascular Diseases.* Circulation, 2004. **110**(19): p. e489-e493.
2. Stroncek, D.F. and P. Rebulla, *Platelet transfusions.* The Lancet, 2007. **370**(9585): p. 427-438.
3. Taylor, H.L., P. Whitley, and A. Heaton, *A historical perspective on platelet radiolabelling techniques.* Transfusion, 2006. **46**(s3): p. 53S-58S.
4. Semple, J.W., *Immune pathophysiology of autoimmune thrombocytopenic purpura.* Blood Rev, 2002. **16**(1): p. 9-12.
5. Greinacher, A. and T.E. Warkentin, *Recognition, treatment, and prevention of heparin-induced thrombocytopenia: review and update.* Thromb Res, 2006. **118**(2): p. 165-176.
6. Vassallo, R.R. and S. Murphy, *A critical comparison of platelet preparation methods.* Curr. Opin. Hematol., 2006. **13**(5): p. 323-330.
7. Heilmann, E. et al., - *Biotinylated platelets: a new approach to the measurement of platelet life span.* 1993. **- 85**(- 4): p. - 735.
8. van der Meer, P.F., B. Tomson, and A. Brand, *In vivo tracking of transfused platelets for recovery and survival studies: An appraisal of labelling methods.* Transfusion and Apheresis Science, 2010. **42**(1): p. 53-61.
9. Warner, J.B. et al., *Use of sequence variation in three highly variable regions of the mitochondrial DNA for the discrimination of allogeneic platelets.* Transfusion, 2006. **46**(4): p. 554-561.

10. Hughes, D.L. et al., *Tracking and characterisation of transfused platelets by two colour, whole blood flow cytometry.* Br J Haematol, 2005. **130**(5): p. 791-794.

11. Kresse, M. et al., *Targeting of ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO) particles to tumor cells in vivo by using transferrin receptor pathways.* Magn. Reson. Med., 1998. **40**(2): p. 236-242.

12. Weissleder, R. et al., *In vivo magnetic resonance imaging of transgene expression.* Nat Med, 2000. **6**(3): p. 351-355.

13. Wang, Z.J. et al., *MR imaging of ovarian tumors using folate-receptor-targeted contrast agents.* Pediatr Radiol, 2008. **38**(5): p. 529-537.

14. Chen, T.-J. et al., *Targeted Herceptin–dextran iron oxide nanoparticles for noninvasive imaging of HER2/neu receptors using MRI.* J Biol Inorg Chem, 2009. **14**(2): p. 253-260.

15. Weissleder, R. et al., *Antimyosin-labeled monocrystalline iron oxide allows detection of myocardial infarct: MR antibody imaging.* Radiology, 1992. **182**(2): p. 381-385.

16. Tiefenauer, L.X. et al., *In vivo evaluation of magnetite nanoparticles for use as a tumor contrast agent in MRI.* Magnetic resonance imaging, 1996. **14**(4): p. 391-402.

17. Serda, R.E. et al., *Targeting and cellular trafficking of magnetic nanoparticles for prostate cancer imaging.* Molecular imaging, 2007. **6**(4): p. 277-288.

18. Partlow, K.C. et al., *19F magnetic resonance imaging for stem/progenitor cell tracking with multiple unique perfluorocarbon nanobeacons.* FASEB J, 2007. **21**(8): p. 1647-1654.

19. Von Zur Muhlen, C. et al., *Functionalized magnetic resonance contrast agent selectively binds to glycoprotein IIb/IIIa on activated human platelets under flow conditions and is detectable at clinically relevant field strengths.* Molecular imaging, 2008. **7**(2): p. 59-67.

20. McAteer, M.A. et al., *Magnetic Resonance Imaging of Endothelial Adhesion Molecules in Mouse Atherosclerosis Using Dual-Targeted Microparticles of Iron Oxide.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **28**(1): p. 77-83.

21. Von Zur Muhlen, C. et al., *Visualization of Activated Platelets by Targeted Magnetic Resonance Imaging Utilizing Conformation-Specific Antibodies against Glycoprotein IIb/IIIa.* J Vasc Res, 2009. **46**(1): p. 6-14.

22. Aurich, K. et al., *Magneto-optical relaxation measurements for the characterization of biomolecular interactions.* J. Phys.: Condens. Matter, 2006. **18**(38): p. S2847-S2863.

23. Sahlin, S., J. Hed, and I. Rundquist, *Differentiation between attached and ingested immune complexes by a fluorescence quenching cytofluorometric assay.* J Immunol Methods, 1983. **60**(1-2): p. 115-124.

24. Nuutila, J. and E.-M. Lilius, *Flow cytometric quantitative determination of ingestion by phagocytes needs the distinguishing of overlapping populations of binding and ingesting cells.* Cytometry, 2005. **65A**(2): p. 93-102.

25. Mendis, D. et al., *Cell biotinylation provides a sensitive and effective detection technique for cellular adhesion assays: comparison with existing methods.* J Immunol Methods, 2001. **253**(1-2): p. 57-68.

26. White, J.G. and C.C. Clawson, *Effects of large latex particle uptake of the surface connected canalicular system of blood platelets: a freeze-fracture and cytochemical study.* Ultrastruct Pathol, 1981. **2**(3): p. 277-287.

27. White, J.G. and G. Escolar, *The blood platelet open canalicular system: a two-way street.* European journal of cell biology, 1991. **56**(2): p. 233-242.

28. White, J.G., *Platelets are covercytes, not phagocytes: Uptake of bacteria involves channels of the open canalicular system.* Platelets, 2005. **16**(2): p. 121-131.

29. Oldenburg, A.L. et al., *Magnetic and Contrast Properties of Labeled Platelets for Magnetomotive Optical Coherence Tomography.* Biophysj, 2010. **99**(7): p. 2374-2383.

30. Bulte, J.W.M. and D.L. Kraitchman, *Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging.* NMR Biomed., 2004. **17**(7): p. 484-499.

31. Shapiro, E.M. et al., *MRI detection of single particles for cellular imaging.* Proc Natl Acad Sci USA, 2004. **101**(30): p. 10901-10906.

32. Hinds, K.A., *Highly efficient endosomal labeling of progenitor and stem cells with large magnetic particles allows magnetic resonance imaging of single cells.* Blood, 2003. **102**(3): p. 867-872.

33. Oude Engberink, R.D. et al., *Comparison of SPIO and USPIO for in vitro labelling of human monocytes: MR detection and cell function.* Radiology, 2007. **243**(2): p. 467-474.

34. Ahmed, A.S., O. Leheta, and S. Younes, *In vitro assessment of platelet storage lesion in leucoreduced random donor platelet concentrates.* Blood Transfus, 2010. **8**(1): p. 28-35.

35. Skripchenko, A., et al., *Platelet products prepared by different methods of sedimentation undergo platelet activation differently during storage.* Transfusion, 2008. **48**(7): p. 1469-1477.

36. Li, Z. et al., *Signalling During Platelet Adhesion and Activation.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(12): p. 2341-2349.

37. Chertok, B. et al., *Substantiating in vivo magnetic brain tumor targeting of cationic iron oxide nanocarriers via adsorptive surface masking.* Biomaterials, 2009. **30**(35): p. 6780-6787.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: MACS LS Separationssäule in Magnetfeld, unten aufgefangene Resovist-Fraktion 8
Abbildung 2: 7 Tesla Kleintier-MRT (ClinsScan S-line 7T, Bruker Biospin) 14
Abbildung 3: 8-Kammer-Kulturplatte zur Platzierung auf der MRT-Spule 15
Abbildung 4: Lichtmikroskopische Aufnahme von ungelabelten (a) und MNP-gelabelten Leukozyten (b) nach Berliner-Blau-Färbung. Im Vergleich deutliche Blaufärbung der gelabelten Leukozyten rechts gegenüber den ungelabelten links. 17
Abbildung 5: Durchflusszytometrie-Scatter-Graph von ungelabelten (a), gelabelten (b) und mit Trypan-Blau gequenchten gelabelten Thrombozyten (c). Der obere rechte Quadrant charakterisiert das Gate für fluoreszierende Thrombozyten. Nur 0,6% der ungelabelten Thrombozyten zeigen eine Fluoreszenz, im Vergleich zu 98,8% der gelabelten. Nach Quenching zeigen nur noch 54,8% der Zellen ein Fluoreszenzsignal. 18
Abbildung 6: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Thrombozyten; (a) ungelabelter Thrombozyt, (b) MNP-gelabelter Thrombozyt, (c) Nahaufnahme der MNP-beladenen Zellmembran eines gelabelten Thrombozyten. Die Resovistpartikel stellen sich als kleine Komma-förmige Strukturen auf der Zellmembran und im Zellinneren dar. 19
Abbildung 7: Fluoreszenzmikropskopie von ungelabelten und MNP-gelabelten Thrombozyten, die Zellmembran ist mittels Oregon Green 488 DHPE grün markiert, MNP sind mittels Texas-Red rot markiert. Im Vergleich der ungelabelten (links) mit den gelabelten (rechts), lassen sich die MNP nachweisen. 19
Abbildung 8: Eisengehaltsbestimmung mittels AAS von ungelabelten und MNP-gelabelten Thrombozyten. Im Vergleich enthalten unmarkierte Thrombozyten 0,019 pg Eisen pro µL gegenüber 1,805 pg Eisen pro µL in markierten Thrombozyten. 20

Abbildung 9: MRT-Bilder von Resovist-Fraktionen. Schema: 1-3 Wasser; 4 26,9 nm Resovist-Fraktion; 5 leer; 6 92,3 nm Resovist-Fraktion. a) TE 14 ms, TR 2.000 ms; b) TE 88 ms, TR 2.000 ms; c) TE 202 ms, TR 2.000 ms. Mit steigender TE verstärkt sich der Kontrast zwischen Wasser und Partikelsuspension. Größere Partikel (92,3 nm) ergeben stärkeren Kontrast als kleinere Partikel (26,9 nm). ..22

Abbildung 10: CNR-Analyse von 26,9 nm und 92,3 nm Resovistfraktionen; a) CNR in Abhängigkeit von TR, b) CNR in Abhängigkeit von TE; das CNR-Optimum liegt bei einer TR von 1000 ms und TE im Bereich von größer 150 ms. 23

Abbildung 11: MRT-Bilder von Thrombozyten. Schema: 1 ungelabelte Trc 1.130/µL; 2 ungelabelte Trc 11.300/µL; 3 ungelabelte Trc 113.000/µL; 4 gelabelte Trc 1.130/µL; 5 gelabelte Trc 11.300/µL; 6 gelabelte Trc 113.000/µL. a) TE 101 ms, TR 2.000 ms; b) TE 202 ms, TR 2.000 ms; c) TE 296 ms, TR 2.000 ms 24

Abbildung 12: CNR-Analyse von Thrombozytensuspensionen. Zellsuspension 1:1 entspricht 113.000 Thrombozyten/µL; TR 1.500 ms. Es zeigt sich ein Abfall des CNR bei größerer Verdünnung der Zellsuspensionen. 25

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bestimmung des mittleren hydrodynamischen Durchmessers der Resovistfraktionen 16

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass keine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades vorliegt.

Datum: Mark-Christopher Spoerl

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen meinen Dank aussprechen, die mich beim Erstellen dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Norbert Hosten, Herrn Professor Dr. Werner Weitschies und Frau Dr. Konstanze Aurich für die Überlassung des Themas und die weitreichende Unterstützung beim Umsetzen dieser Arbeit.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Andreas Greinacher, Frau Birgit Fürll, Frau Dr. Rabea Sietmann und Herrn Stefan Hadlich. Ohne die regelmäßige Zusammenarbeit zwischen dem Institut für Diagnostische Radiologie und Neuroradiologie, dem Institut für Pharmazie, dem Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin und dem Institut für Mikrobiologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald wäre die Durchführung dieses Projektes nicht möglich gewesen.

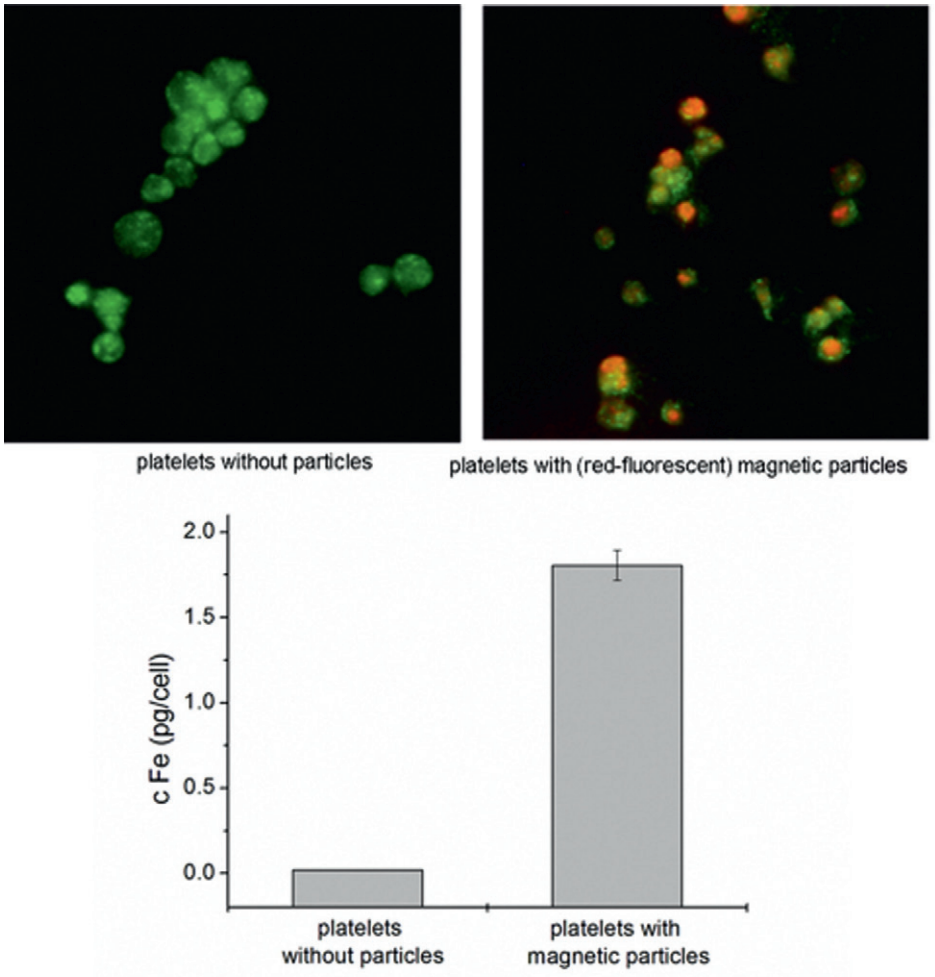
Ich danke meiner Mutter und meinen Großeltern mir das Studium der Humanmedizin ermöglicht zu haben und für die moralische Unterstützung während der gesamten teils anstrengenden Studienjahre.

ELSEVIER

July 2012

nanomedicine

Nanotechnology, Biology, and Medicine



K. Aurich, M.-C. Spoerl, B. Fürll, R. Sietmann, A. Greinacher, N. Hosten, W. Weitschies, page 537.

POTENTIAL CLINICAL RELEVANCE

Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine
8 (2012) 537 – 544

Feature Article

nanomedicine
Nanotechnology, Biology, and Medicine

nanomedjournal.com

Development of a method for magnetic labeling of platelets

Konstanze Aurich, PhD[a,*,1], Mark-Christopher Spoerl[b,1], Birgitt Fürll[a], Rabea Sietmann, PhD[c], Andreas Greinacher, MD[a], Norbert Hosten, MD[b], Werner Weitschies, PhD[d]

[a]*Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin, Universitätsmedizin Greifswald, Germany*
[b]*Institut für Diagnostische Radiologie, Universitätsmedizin Greifswald, Germany*
[c]*Institut für Mikrobiologie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Germany*
[d]*Institut für Pharmazie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Germany*

Received 14 March 2011; accepted 13 September 2011

Abstract

Platelets play a dominant role in the pathogenesis of bleeding disorders and cardiovascular pathology (e.g., myocardial infarction). Nonradioactive labeling of platelets may offer several clinical applications, ranging from survival studies of transfused platelet concentrates to studies on the pathogenesis of stroke. We used ferucarbotran superparamagnetic nanoparticles (NPs) for cell labeling. Platelets incorporated these NPs by endocytosis (without linkers or binding agents). Flow cytometry using FITC-conjugated magnetic NPs showed ex vivo labeling of about 98% of platelets; NPs were predominantly located inside the platelet granules as confirmed by fluorescence microscopy and transmission electron microscopy. Iron concentrations of 2 pg per platelet were reached as determined by atomic absorption spectroscopy. This will enable sensitive ex vivo determination of transfused labeled platelets, allowing survival studies. In vitro, labeled platelets gave a clear signal by 7 Tesla magnetic resonance tomography. Magnetic labeling of platelets may offer a new tool for diagnosis and research in transfusion medicine and cardiovascular medicine.

From the Clinical Editor: In this study a platelet labeling method is discussed and described for in vivo and ex vivo applications, using a binder or linker free fluorescent superparamagnetic iron nanoparticle system. Magnetic labeling of platelets may offer a new tool for diagnosis and research in transfusion medicine and cardiovascular medicine.
© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Key words: Platelet labeling; Superparamagnetic iron oxide nanoparticles; Cell tracking; Magnetic resonance imaging

Platelets play an important role in hemostasis, arterial cardiovascular disease,[1] inflammation, and cancer. In addition, platelet concentrates are a basic supportive treatment in cell aplasia during chemotherapy and in severe bleeding due to trauma or surgery.[2]

Labeling of platelets by radioactive tracers (^{111}In and/or ^{51}Cr)[3] has been used for decades for diagnostic purposes in disorders with enhanced platelet turnover such as autoimmune thrombocytopenia.[4,5] Radioactive labeling of platelets is also indispensable for the assessment of the impact of different preparation methods of platelet concentrates on cell survival in transfusion medicine.[6] However, the use of radioactive tracers is no longer acceptable for volunteer studies or research studies in humans, at least in Germany. To circumvent the issues of radioactive burden, nonradioactive labeling such as biotinylation of platelets have been proposed.[7] However, biotinylation activates platelets (so-called labeling injury),[8] and the sensitivity of the method is rather low. Other methods, which are based on the discrimination of transfused platelets based on DNA polymorphism[9] or different HLA phenotypes[10] between the patient's own platelets and the transfused platelets, require the appropriate "incompatible" setting between platelet donor and recipient. This bears the risk of alloimmunization and the risk of transfusion-transmitted diseases, which makes this approach not suitable for study purposes, especially in healthy volunteers.

Magnetic labeling with iron oxide particles may provide a new option for nonradioactive labeling of platelets. These particles are currently used as contrast agents for magnetic resonance imaging (MRI), e.g., ferucarbotran particles (Resovist, Bayer Schering AG, Berlin, Germany). Cells can incorporate bare magnetic nanoparticles (MNPs) via endocytosis optionally supported by transfection agents (e.g., lipids, polyamides,

There are no disclosures or any conflict of interests.

*Corresponding author: Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin, Sauerbruchstrasse, Greifswald, Germany.
E-mail address: aurich@uni-greifswald.de (K. Aurich).

[1] Both authors contributed equally to this work.

1549-9634/$ – see front matter © 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.nano.2011.09.008

cationic peptides), or diverse functionalization agents for cell targeting, e.g., coupling to transferring,[11,12] folate receptor,[13] the her2/neu-tyrosinkinase-receptor,[14] or they are bound to their target cell using magnetically labeled specific antibodies.[15-17] Another functionalization strategy is the production of multimodal particles, i.e., MNPs linked to fluorochromes for both noninvasive MR imaging and detection of fluorescence dyes by high-sensitivity fluorescence optical imaging.[18]

Magnetic labeling of platelets might also offer the unique option to visualize the labeled cells in vivo by MRI analysis. Von zur Muhlen et al targeted platelets with antibody-conjugated iron oxide micro- and nanoparticles (NPs). They used a single chain antibody against the activated glycoprotein IIb/IIIa complex on the platelet surface. This allowed MRI of induced thrombi and atherosclerotic plaques in animal models.[19-21] However, the use of labeled antibodies is problematic in humans.

Here we demonstrate by in vitro studies, as a proof of principle, labeling of human platelets with carboxydextran-coated iron oxide NPs (Resovist) at cell iron concentrations sufficient for survival studies and visualization by MRI.

Methods

Particle characterization, fractionation and functionalization

We used commercially available ferucarbotran MNPs approved for clinical application (Resovist). They consist of ferrimagnetic cores of maghemite coated with carboxydextran shells, suspended in water and forming a stable, dark brown dispersion referred to as ferrofluid with a given concentration of 0.5 M iron. MRI experiments were mostly accomplished with original Resovist suspension and dilutions of it, respectively. To analyze the impact of the particle size on MR signal, one experiment with different size fractions of MNPs was generated. For this purpose, Resovist particle suspension was fractionated into four discrete size fractions by inhomogeneous magnetic fields generated inside a magnetic separation column (MACS LS, Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Germany) by a tunable electromagnetic field (Bruker, Karlsruhe, Germany). Particles remain within the column depending on the particle magnetic moment, i.e., particle core volume. At a lower magnetic field strength, only larger particles retain in the column. After separation, average hydrodynamic diameter of the particle fractions was determined using dynamic light scattering (DLS) measurements (photon correlation spectroscopy, PCS).

For further experiments, two batches of Resovist particles were labeled by two different fluorescent markers using reductive amination[22]: albumin-fluorescein isothiocyanate conjugate (FITC-Alb; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) and albumin-Texas Red (Texas Red-Alb; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri). In brief, for activation of the carboxydextran shell, Resovist particles were resuspended in citrate buffer, pH 5, and sodium periodate was added and incubated for 40 minutes at 4°C. Activated Resovist particles were separated from excess reaction material by gel filtration with a PD-10 column (Sephadex, GE Healthcare, Munich, Germany). Resovist particles were added to the fluorescent marker and incubated for 2 hours at 4°C. Reaction was stopped by addition of boran-dimethylamine (Sigma-Aldrich, Munich, Germany). After 2 hours at 4°C, ethanolamine hydrochloride (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) was added, followed by overnight incubation at 4°C. Finally, labeled Resovist particles were separated magnetically via a MACS LS column (Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Germany) and suspended in phosphate buffered saline (PBS).

Platelet preparation and detection of internalized particles

Hirudinized whole blood from healthy volunteers was centrifuged (120 *g*, 20–24°C, 20 minutes). The platelet-rich plasma was gel filtered at pH 7.4 in a sepharose CL-2B liquid chromatography column (Sigma-Aldrich, Munich, Germany). Gel-filtered platelets were resuspended in PBS pH 7.4 to 100,000–250,000 platelets/μL, incubated with unconjugated or fluorescence-labeled Resovist particles (10 mM iron concentration; 30 minutes; 37°C). After addition of adenine-citrate-dextrose A (ACD-A, Baxter, Unterschleißheim, Germany; 111 μL/mL gel filtered platelets), apyrase (Grade IV; Sigma-Aldrich; 1,000 U/mL) and 1,000 U/mL hirudin; platelets were washed to eliminate excess particles (650 *g*, 7 minutes, 20–24°C), and resuspended in Tyrodes buffer (pH 7.2; containing 60 μM bovine serum albumin (BSA), 5.6 mM glucose, 5 μM calcium chloride and 5 μM magnesium chloride) and rested 45 minutes at 37°C before further use.

Quantitative determination of cellular iron content

For the quantification of cellular iron we used atomic absorption spectroscopy (AAS). Gel-filtered platelets were incubated with unconjugated Resovist particles (iron concentration 10 mM) for 30 minutes at 37°C or PBS (blank samples); washed twice with PBS; recounted and digested with pancreatin and sodium lauryl sulfate for 30 minutes at 37°C for degradation of cell and protein structures. To solubilize iron complexes and salts, samples were heated with nitric acid and hydrogen peroxide. Iron content per cell was measured using an iron calibration graph with a Solaar 898QZ atomic absorption spectrometer (Unicam Chromatography, Kassel, Germany).

Fluorescence microscopy

Gel-filtered platelets were incubated with Texas Red-Alb labeled Resovist particles (iron concentration 10 mM; 30 minutes; 37°C) or PBS; adhered on a collagen covered cover slip (BD Biosciences Europe, Heidelberg, Germany) by sedimentation (30 minutes at 20–24°C); washed with PBS; and incubated with ethanolic Oregon Green 488 DHPE solution (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) for staining of cell membranes. Cells were finally fixed with formaldehyde solution 1% in PBS and embedded in Mowiol. Double fluorescence images were acquired using a Keyence BZ-8000 fluorescence microscope and the BZ-Image analyzer 2.5 (Keyence, Neu-Isenburg, Germany). Platelets with green-stained membranes without Resovist particles presented the blank sample.

Flow cytometry

FITC-Alb labeled Resovist particles were incubated with gel-filtered platelets (iron concentration 10 mM; 30 minutes; 37°C). CD42a Phycoerythrin antibody (BD Biosciences Europe) was added for platelet gating in a Cytomics FC 500 flow cytometer (Beckman Coulter, Fullerton, California) with a

Table 1
Mean hydrodynamic diameters of Resovist fractions determined by PCS

Current at fractionation (A)	Mean hydrodynamic diameter (nm) by PCS
0	92.3
0.0311	64.7
0.25	45.5
1	26.9

blue argon laser at 488 nm excitation for orange fluorescence (FL2). Quenching with Trypan Blue was used to determine the degree of Resovist particle coating on the outer platelet cell membrane.[23,24] Platelets without preincubation with Resovist particles served as a blank sample.

Transmission electron microscopy (TEM)

Gel-filtered platelets were washed with PBS and incubated with unconjugated Resovist particles (iron concentration 10 mM; 30 minutes; 37°C) or PBS, fixed with 0.1% and 3% glutaraldehyde in White`s Saline at 20–24°C for 60 minutes and then at 4°C overnight.[25] Postfixation was carried out in 1% osmium tetroxide in White`s Saline for 60 minutes followed by immersion of the specimen in 0.5% uranyl acetate. After dehydration in graded series of aceton, the material was embedded in agar. Sections were cut on an ultramicrotome (Reichert Ultracut, Leica UK Ltd, London, United Kingdom), stained with uranyl acetate and lead citrate and analyzed with a transmission electron microscope EM 906 (Carl Zeiss, Jena, Germany) at 80 kV.

Platelet function testing

Gel-filtered platelets were incubated with Resovist particles (iron concentration 10 mM for 30 minutes at 37°C) or with PBS and analyzed regarding their activation ability. Thrombin-receptor agonist peptide 6 (TRAP-6; Sigma-Aldrich) or collagen (Nycomed, Konstanz, Germany) were used as inductors in the light transmission platelet aggregation assay or for flow cytometry analysis.

The platelet aggregation assay was performed with a 4-channel-aggregometer (Labitec, Ahrensburg, Germany). Platelet aggregation was measured by turbidimetry induced by addition of 1 μg/mL collagen or 20 μmol/L TRAP-6.

Flow cytometry was utilized to measure the percentage of platelets with cell membrane-bound CD62P (P-selectin) as a marker for platelet activation. 20 μmol/L TRAP-6 served for the induction of platelet activation.

Magnetic resonance imaging

A 7 Tesla small-animal MRI scanner (ClinScan S-line 7 T, Bruker BioSpin, Karlsruhe, Germany) controlled by a Siemens Syngo workstation (Siemens Medical Solutions, Erlangen, Germany) was used for image acquisition. For high resolution and best contrast images for our MNPs a T2∗-weighted protocol with two-dimensional acquisition, a flip angle of 180 degrees, and a field of view of 40 × 40 mm was developed, known to show typical susceptibility artifacts of Resovist. In MRI repetition time (TR) is the time between two excitation pulses and determines the longitudinal relaxation T1, whereas echo time (TE) is the interval between application of excitation pulse and acquisition of MR signal, which determines the horizontal relaxation T2. Resovist as a magnetic contrast agent which is strong in T2∗ weighted images requires long TE to emphasize on the T2 component and long TR to eliminate the effect of T1. In our experiments we evaluated which protocol for TE and TR would generate best contrast for Resovist.

Magnetically labeled platelets or Resovist test solutions were placed in an 8-well culture plate (BD Biosciences, San Jose, California) on top of a phased array 1H rat brain coil with a 2∗2 coil configuration (Bruker BioSpin).

Contrasts of platelets labeled with Resovist particles with different cell counts were compared with nonlabeled cells in vitro to determine the minimal concentration of labeled cells for MRI. Furthermore, the smallest and the largest Resovist particle fraction resulting from magnetic fractionation adjusted to the same concentration of 0.5 mM Fe were used for comparison of signals from different particle sizes.

Coronal images of specific solutions within the wells of the culture slides were analyzed with Siemens Syngo Software, using circular regions-of-interest (2000 pixels) for signal-intensity measurements. Signal intensity of the artifact (SI_1), signal intensity of the medium (SI_2) and standard deviation (SD) of the background noise were obtained. The contrast-to-noise-ratio (CNR) was determined with

$$CNR = (SI_2 - SI_1) / SD. \quad (1)$$

Results

Particle characterization, fractionation and fluorescent labeling

Resovist was fractionated at magnetic field strengths achieved with currents of 0.0 A to 1.0 A (Table 1). In Table 1 the mean hydrodynamic diameters of Resovist fractions estimated by PCS are demonstrated.

MNP uptake by platelets

FITC-Alb-MNPs bound very efficiently to platelets, resulting in labeling of more than 98% of cells (Figure 1, *A* and *B*) as determined by flow cytometry.

The signal decreased to 54.8% after addition of Trypan Blue, indicating that about half of the Resovist particles had been internalized into the platelets (Figure 1, *C*). Trypan Blue interacts with FITC, thereby quenching its fluorescence signal. Because the dye cannot enter living cells, it neutralizes only signals of FITC molecules bound to the outer cell membrane.

By fluorescence microscopy and TEM localization of Resovist particles within the platelets and at the outer platelet membrane was confirmed (Figure 2). Most likely the majority of the Resovist particles that are internalized into platelets are stored in the open canalicular system. We cannot exclude, however, the possibility that some particles also localize within the alpha granules.

Iron quantification by atomic absorption spectroscopy

Iron content detection determined a value of 0.019 ± 0.001 pg iron per cell in nonlabeled platelets in comparison with 1.805 ± 0.089 pg iron per cell in Resovist-labeled platelets (Figure 3).

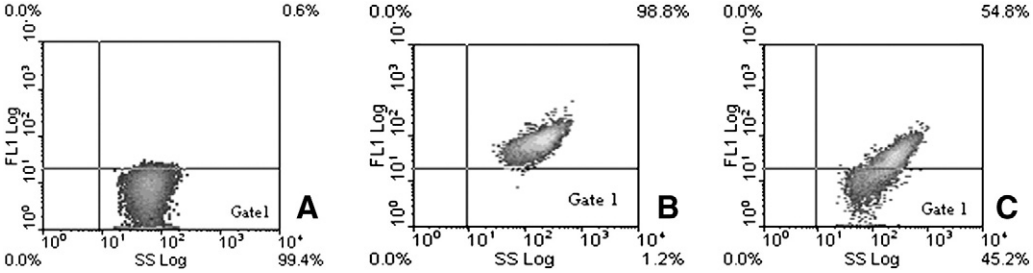


Figure 1. Flow cytometry graphs of nonlabeled **(A)**, labeled **(B)** and labeled platelets with Trypan Blue quenching **(C)**. The upper right quadrant characterizes the platelet gate. This shows that platelets are very well labeled by magnetic particles and that about half of the particles attach to the outer surface of platelets and can therefore be quenched by Trypan Blue.

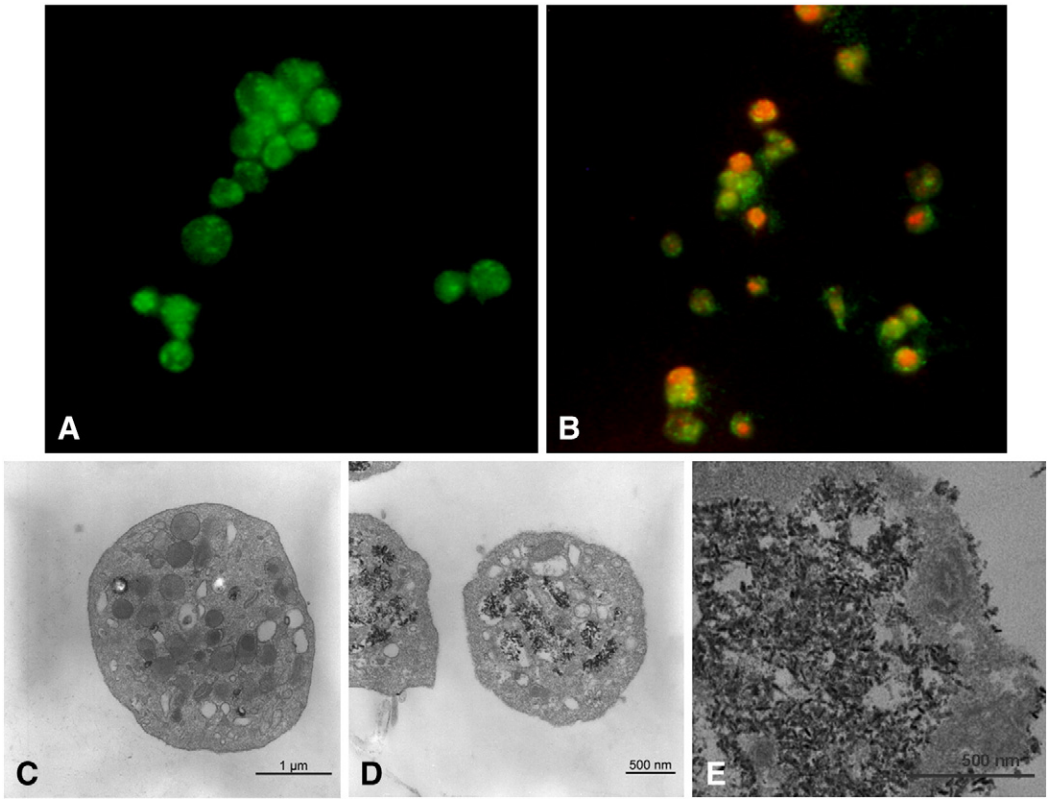


Figure 2. Microscopy images of nonlabeled and magnetically labeled platelets. Fluorescence microscopy for nonlabeled **(A)** and labeled platelets **(B)**. For best contrast cell membrane structures are green colored with Oregon Green 488 DHPE, and Resovist particles appear in red due to Texas-Red-Alb-linking. TEM images of nonlabeled **(C)** and labeled platelets **(D,E)** shows large clusters of iron particles primarily in the open canalicular system of platelets **(D)**. At higher magnification the particles attached to the outer membrane also become visible **(E)**.

Sensitivity of this iron determination method by AAS is as low as 2.8 pg iron/µL. This allows detection of at least 2 magnetically labeled platelets per µL.

Platelet function testing

Platelet function was analyzed by addition of collagen and TRAP-6 as inductors by aggregometry and by flow cytometry analysis.

Assessment of the expression of the activation marker CD62P by flow cytometry showed expression of this marker in 10% of nonlabeled control platelets. Labeling with Resovist particles resulted in expression of CD62P by approximately 50% of platelets. However, addition of TRAP-6 resulted in expression of CD62P in nearly all nonlabeled and labeled platelets (Figure 4, *A–D*).

Results from the aggregation assay showed decreased activation ability of platelets labeled with Resovist in comparison with nonlabeled platelets with the use of the inductor TRAP-6. The addition of collagen resulted in comparable activation of labeled and nonlabeled platelets (Figure 4, *E*).

MRI setup

Results from images of labeled platelet suspensions are demonstrated in Figure 5. The detected CNR signal was cell

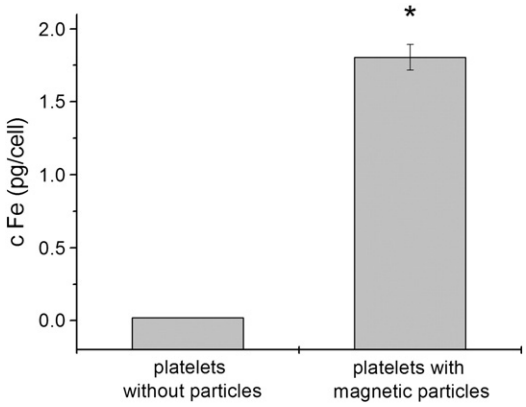


Figure 3. Iron concentration of nonlabeled and magnetically labeled platelets as determined by atomic absorption spectroscopy (AAS); mean ± SD (n = 6; the error bar is not visible at the column for platelets without particles; $*P < 0.001$ compared to nonlabeled platelets, Student's *t*-test).

concentration–dependent as expected. In detail the CNR for 1,130, 11,300, 113,000 magnetically labeled platelets per μL was 106, 17, and -10, respectively, in combination with a TE value of 296 ms. Diminution of the TE value results also in signal reduction.

Fractions of 26.9 nm and 92.3 nm average hydrodynamic diameters were chosen to represent small and large MNPs. Iron concentration was adjusted to be equal for both fractions at 0.5 mM. CNR analysis shows higher contrasts for the larger particle size in comparison with smaller particle size, both in the TR and the TE mode. In the TE mode both particle sizes converge. In Figure 6, *A* and *B* the best contrasts are demonstrated at values from 1000 ms to 1500 ms for TR and above 150 ms for TE.

Discussion

This study demonstrated magnetic labeling of platelets without any linker such as specific antibody–antigen or receptor–protein interactions for MR tracking. As magnetic label agents FDA- and EMA-approved Resovist superparamagnetic iron oxide particles with a carboxydextran shell were utilized. Labeling was efficient to detect 2 platelets/μL by AAS. This will allow survival studies of platelets at a more than 10-fold higher sensitivity in comparison with radioactive labeling. Current radioactive labeling reaches a sensitivity of 1 cell in 10 μL, as determined by Mendis et al for ^{51}Cr-labeled monocytes.[26]

Labeling of platelets with magnetic particles not only opens new perspectives for platelet survival studies in human volunteers and patients, it also has the very attractive perspective to visualize the labeled platelets by MR imaging. This might be a valuable tool for diagnostic and therapeutic interventions in patients with platelet-mediated hypercoagulable diseases such as coronary artery disease and stroke or in bleeding disorders associated with thrombocytopenia. In contrast to other MR labeling agents such as gadolinium chelates, superparamagnetic iron oxide particles are composed of biodegradable iron, which is biocompatible and can thus be recycled by cells. The used Resovist particles can easily be detected by light microscopy by means of iron staining or by electron microscopy as shown in Figure 3. This allows quality control of labeling efficacy before application.

Platelets are able to internalize particles as described in previous reports, where platelets had been able to take up latex particles from nano- to micrometer scale,[27] colloidal gold,[28] or bacteria.[29] Recently, Oldenburg et al provided labeling of rehydrated, lyophilized platelets (RL platelets) with MNPs contained in Feridex for imaging by magnetomotive optical coherence tomography in vitro in tissue phantoms and ex vivo in pig arteries. This may enable the further development of RL platelets as a platelet substitute. In contrast to labeling of RL platelets with Feridex, which resulted in iron concentrations of 0.048 pg/platelet after incubation overnight,[30] we succeeded in Resovist particle saturation within 30 minutes at ~2 pg iron per cell. This may be due to the larger iron oxide core of Resovist particles, so that the ratio between the iron oxide core and coating material is superior to that of Feridex particles, resulting in increased iron internalization by platelets. The relatively short labeling time, as well as the strong signal, is a major advantage for further development of this technique for in vivo use. A further benefit of iron oxide particles is that they provide the highest change in signal per unit of metal.[31] They produce a strong signal loss in T2∗-weighted MRI by virtue of susceptibility differences to the adjacent environment. Several size ranges of iron oxide particles are utilized: very small iron oxide particles (VSOPs) with diameters below 10 nm, ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles (USPIOs) with diameters between 10 and 40 nm, and small superparamagnetic iron oxide particles (SPIOs) with diameters of 50 – 150 nm.[32] We obtained the best signal when we used the largest particle fraction of the original Resovist suspension (Figure 6). This finding is in accordance with findings of other groups, who analyzed differences in imaging of iron oxide nano- and microparticles[21,33] or USPIOs and SPIOs.[34] Possible reasons are the greater magnetic moment and enhanced susceptibility in individual cells created by larger particles, which will lead to potential single-cell imaging or, in the case of very small cells such as platelets, to imaging of only few cells. However, the advantage of an enhanced signal has to be balanced against the efforts of subfractionation of a particle preparation that is otherwise "ready to use" in humans.

For optimal visualization by MRI, the CNR is important, but the time tolerable for the individual assessed by MRI is also important. Accordingly, the optimal settings for TE should be around 200 to 300 ms and TR around 1500 to 2000 ms.

A critical point of the utilization of MNPs as labeling agents is the impact on platelet function. Flow cytometry analysis showed an initial CD62P expression of nearly half of the applied platelets due to magnetic labeling compared with 10% without magnetic particle incubation, i.e., some 50% of magnetically labeled platelets are still intact. However, subsequent TRAP-6 addition yielded nearly complete activation of platelets in both cases. If half of the magnetically labeled platelets are functional, survival studies may be applicable considering the high sensitivity of AAS.

In many studies the percentage of CD62P expression in platelet concentrates for therapeutic transfusions has been determined to be in the range from 35 up to 50% within the approved storage

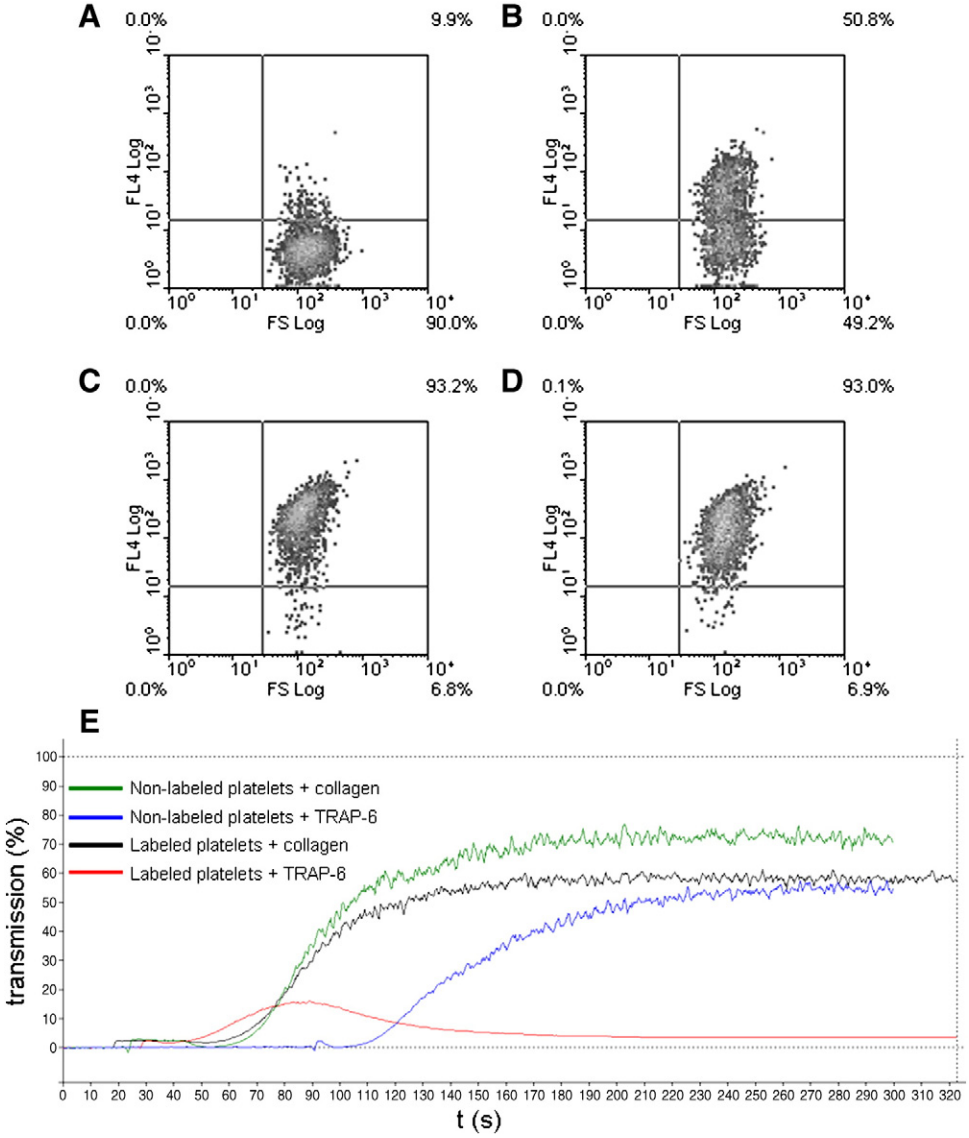


Figure 4. Flow cytometry graphs of nonlabeled **(A)** and labeled platelets **(B)**. Platelet activation was determined using analysis of CD62P expression by anti-CD62P antibody. Activation ability was accomplished by subsequent TRAP-6 addition (nonlabeled platelets **(C)**, labeled platelets **(D)**). Activation of nonlabeled and labeled platelets by addition of 4 μM collagen and 20 μM TRAP-6 determined by aggregometry **(E)**.

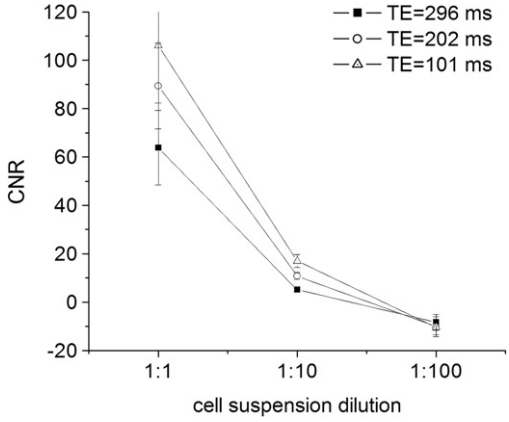


Figure 5. CNR at different TEs of labeled cell suspension with different cell counts based on 113 × 10^9 cells/L (TR = 1500 ms, n = 8, mean ± SD).

time.[35,36] With reference to this, the current level of CD62P expression after labeling of platelets seems to be acceptable.

Importantly, platelet aggregometry demonstrated that labeling with MNPs had no impact on activation of platelets by collagen. Thus the labeled platelets seem to be functional, which is a prerequisite for studies assessing in vivo platelet function. Collagen induces platelet activation primarily via the glycoprotein-VI–mediated signaling pathway, whereas TRAP-6 activates platelets on Gq-mediated signaling pathway.[37] This might be an explanation for the observed differences in platelet aggregation between TRAP-6 and collagen.

Although our findings are promising, several important aspects have to be assessed further before Resovist-labeled platelets can be used in vivo. A crucial point is the potential immunogenicity of labeled platelets. This is especially relevant for the particles adherent to the outer cell membrane, which will

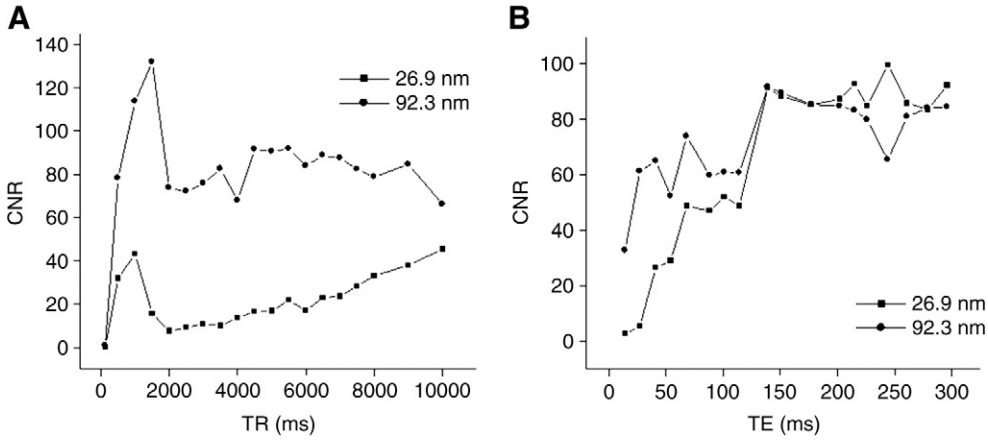


Figure 6. CNR versus TR **(A)** and TE **(B)** for 2 mean particle sizes of MNPs in MRI (n = 2).

come into direct contact with immune competent cells in vivo. Particle shells consist of dextran. It is conceivable to remove particles from the outer cell membrane by enzymatic digestion using dextranase. However, it will be difficult to remove the enzyme before transfusion of the labeled platelets into humans. A second approach could be the utilization of surface masking with polyethylene glycol (PEG). Due to their negatively charged shell, MNPs interact with plasma proteins and are rapidly cleared from plasma because of subsequent aggregation. This aggregation could be prevented using surface masking strategy with PEG as shown by Chertok et al.[38]

If these issues can be resolved, magnetically labeled platelets may become a very interesting new diagnostic tool.

Platelets can be labeled with a preparation of superparamagnetic NPs that is approved for use in humans. Without the need to add additional chemicals, the achieved concentration of Resovist particles stored within the platelets is sufficient for platelet-survival studies and adequate to obtain a signal by MRI.

Magnetically labeled platelets might become an important tool for diagnosis in patients with cardiovascular disorders, bleeding disorders, or thrombocytopenia. Furthermore they may help to assess the impact of different modes of platelet preparation on platelet survival in transfusion medicine.

References

1. Michelson AD. Platelet function testing in cardiovascular diseases. Circulation 2004;110:E489-93.
2. Stroncek DF, Rebulla P. Transfusion medicine 2 - platelet transfusions. Lancet 2007;370:427-38.
3. Taylor HL, Whitley P, Heaton A. A historical perspective on platelet radiolabeling techniques. Transfusion 2006;46:53S-8S.
4. Semple JW. Immune pathophysiology of autoimmune thrombocytopenic purpura. Blood Reviews 2002;16:9-12.
5. Greinacher A, Warkentin TE. Recognition, treatment, and prevention of heparin-induced thrombocytopenia: review and update. Thromb Res 2006;118:165-76.
6. Vassallo RR, Murphy S. A critical comparison of platelet preparation methods. Curr Opin Hematol 2006;13:323-30.
7. Heilmann E, Friese P, Anderson S, et al. Biotinylated platelets - a new approach to the measurement of platelet life-span. Br J Haematol 1993;85:729-35.
8. van der Meer PF, Tomson B, Brand A. In vivo tracking of transfused platelets for recovery and survival studies: an appraisal of labeling methods. Transfus Apher Sci 2010;42:53-61.
9. Warner JB, Bruin EJ, Hannig H, et al. Use of sequence variation in three highly variable regions of the mitochondrial DNA for the discrimination of allogeneic platelets. Transfusion 2006;46:554-61; Erratum in 46: 1461-2.
10. Hughes DL, Evans G, Metcalfe P, Goodall AH, Williamson LM. Tracking and characterisation of transfused platelets by two colour, whole blood flow cytometry. Br J Haematol 2005;130:791-4.
11. Kresse M, Wagner S, Pfefferer D, Lawaczeck R, Elste V, Semmler W. Targeting of ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO) particles to tumor cells in vivo by using transferrin receptor pathways. Magn Reson Med 1998;40:236-42.
12. Weissleder R, Moore A, Mahmood U, et al. In vivo magnetic resonance imaging of transgene expression. Nat Med 2000;6:351-5.
13. Wang ZJ, Boddington S, Wendland M, Meier R, Corot C, Daldrup-Link H. MR imaging of ovarian tumors using folate-receptor-targeted contrast agents. Pediatr Radiol 2008;38:529-37.
14. Chen TJ, Cheng TH, Chen CY, et al. Targeted Herceptin-dextran iron oxide nanoparticles for noninvasive imaging of HER2/neu receptors using MRI. J Biol Inorg Chem 2009;14:253-60.
15. Weissleder R, Lee AS, Khaw BA, Shen T, Brady TJ. Antimyosin-labeled monocrystalline iron oxide allows detection of myocardial infarct: MR antibody imaging. Radiology 1992;182:381-5.
16. Tiefenauer LX, Tschirky A, Kuhne G, Andres RY. In vivo evaluation of magnetite nanoparticles for use as a tumor contrast agent in MRI. Magn Reson Imaging 1996;14:391-402.
17. Serda RE, Adolphi NL, Bisoffi M, Sillerud LO. Targeting and cellular trafficking of magnetic nanoparticles for prostate cancer imaging. Mol Imaging 2007;6:277-88.
18. Partlow KC, Chen J, Brant JA, et al. 19F magnetic resonance imaging for stem/progenitor cell tracking with multiple unique perfluorocarbon nanobeacons. Faseb J 2007;21:1647-54.
19. von Zur Muhlen C, von Elverfeldt D, Choudhury RP, et al. Functionalized magnetic resonance contrast agent selectively binds to glycoprotein IIb/IIIa on activated human platelets under flow conditions and is detectable at clinically relevant field strengths. Mol Imaging 2008;7:59-67.
20. McAteer MA, Schneider JE, Ali ZA, et al. Magnetic resonance imaging of endothelial adhesion molecules in mouse atherosclerosis using dual-targeted microparticles of iron oxide. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2008;28:77-83.
21. von Zur Muhlen C, Peter K, Ali ZA, et al. Visualization of activated platelets by targeted magnetic resonance imaging utilizing conformation-specific antibodies against glycoprotein IIb/IIIa. J Vasc Res 2009;46: 6-14.

22. Aurich K, Glöckl G, Romanus E, Weber P, Nagel S, Weitschies W. Magneto-optical relaxation measurements for the characterization of biomolecular interactions. J Phys Condens Matter 2006;18: 2847-63.
23. Sahlin S, Hed J, Rundquist I. Differentiation between attached and ingested immune-complexes by a fluorescence quenching cytofluorometric assay. J Immunol Methods 1983;60:115-24.
24. Nuutila J, Lilius EM. Flow cytometric quantitative determination of ingestion by phagocytes needs the distinguishing of overlapping populations of binding and ingesting cells. Cytometry Part A 2005;65A: 93-102.
25. White JG. The morphology of platelet function. In: Harker LA, Zimmerman TS, editors. Measurement of platelet function. 1st ed. New York: Churchill Livingstone; 2011. p. 1-25.
26. Mendis D, Ginon I, Louis H, McGregor JL, Poston RN. Cell biotinylation provides a sensitive and effective detection technique for cellular adhesion assays: comparison with existing methods. J Immunol Methods 2001;253:57-68.
27. White JG, Clawson CC. Effects of large latex particle uptake on the surface connected canalicular system of blood-platelets - a freeze-fracture and cytochemical study. Ultrastruct Pathol 1981;2:277-87.
28. White JG, Escolar G. The blood-platelet open canalicular system - a 2-way street. Eur J Cell Biol 1991;56:233-42.
29. White JG. Platelets are covercytes, not phagocytes: Uptake of bacteria involves channels of the open canalicular system. Platelets 2005;16: 121-31.
30. Oldenburg AL, Gallippi CM, Tsui F, et al. Magnetic and contrast properties of labeled platelets for magnetomotive optical coherence tomography. Biophys J 2010;99:2374-83.
31. Bulte JW, Kraitchman DL. Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. NMR Biomed 2004;17:484-99.
32. Shapiro EM, Skrtic S, Sharer K, Hill JM, Dunbar CE, Koretsky AP. MRI detection of single particles for cellular imaging. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101:10901-6.
33. Hinds KA, Hill JM, Shapiro EM, et al. Highly efficient endosomal labeling of progenitor and stem cells with large magnetic particles allows magnetic resonance imaging of single cells. Blood 2003;102:867-72.
34. Oude Engberink RD, van der Pol SM, Dopp EA, de Vries HE, Blezer EL. Comparison of SPIO and USPIO for in vitro labeling of human monocytes: MR detection and cell function. Radiology 2007;243:467-74.
35. Ahmed AS, Leheta O, Younes S. In vitro assessment of platelet storage lesion in leucoreduced random donor platelet concentrates. Blood Transfus 2010;8:28-35.
36. Skripchenko A, Kurtz J, Moroff G, Wagner SJ. Platelet products prepared by different methods of sedimentation undergo platelet activation differently during storage. Transfusion 2008;48:1469-77.
37. Li ZY, Delaney MK, O'Brien KA, Du XP. Signaling during platelet adhesion and activation. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2010;30: 2341-9.
38. Chertok B, David AE, Moffat BA, Yang VC. Substantiating in vivo magnetic brain tumor targeting of cationic iron oxide nanocarriers via adsorptive surface masking. Biomaterials 2009;30:6780-7.