

Aus der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**„Markierung primärer humaner Hepatozyten mit
Eisenoxidpartikel zur Darstellung mittels
klinischer Magnetresonanztomographie“**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Nathanael Johannes Raschzok

aus Neuendettelsau

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Peter Neuhaus
2. Prof. Dr. med. Wolf Otto Bechstein
3. Prof. Dr. med. Bernd Hamm

Datum der Promotion: 09.09.2011

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|--|----|
| I. | Abstract | 4 |
| II. | Einleitung, Zielstellung | 5 |
| III. | Methodik, Ergebnisse, Diskussion | 6 |
| IV. | Erklärung über Anteil an den Publikationen | 13 |
| V. | Originalarbeiten | 15 |
| VI. | Lebenslauf | 16 |
| VII. | Publikationsliste | 17 |
| VIII. | Erklärung über Selbstständigkeit | 18 |

I. Abstract

Hintergrund: Die Leberzelltransplantation wird bei verschiedenen Lebererkrankungen als alternatives Therapieverfahren zur Lebertransplantation erwogen und in ersten klinischen Studien untersucht. Derzeit existiert jedoch keine geeignete Methode, um Leberzellen während und nach der Applikation mittels bildgebender Verfahren darzustellen. Die Magnetresonanztomographie (MRT) ermöglicht die Lokalisierung von superparamagnetischen Eisenoxidpartikel. Ziel dieser Studie war es, eine Methode zur Markierung primärer humaner Hepatozyten mit Eisenoxidpartikel zu entwickeln und die Effekte der Markierung sowie die Bereitstellung der markierten Zellen für eine Zelltransplantation *in vitro* zu untersuchen.

Methoden: Primäre humane Hepatozyten wurden mittels eines Kollagenase-Perfusionsverfahrens aus Leberteilresektaten von 19 Zellspendern isoliert und für die Markierungsversuche in Adhäsion kultiviert. Als intrazelluläres Kontrastmittel wurden superparamagnetische, Tat-Peptid modifizierte „*MagForce*“-Partikel (100nm) sowie „*Micron-sized polymer encapsulated iron oxide particles*“ (MPIOs; 1,6µm) evaluiert. Zellproben wurden nach Fixierung in Agarose mittels eines klinischen MRT bei einer Feldstärke von 3,0 Tesla untersucht. Die Partikelaufnahme wurde mit Licht-, Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie nachgewiesen. MPIO-markierte Hepatozyten wurden enzymatisch resuspendiert und während einer Rekulturphase von 5 Tagen anhand verschiedener Parameter charakterisiert und mit Kontrollgruppen verglichen (Partikelgehalt, AST- und LDH-Freisetzung, Harnstoff- und Albuminsynthese, mitochondriale Aktivität, Gesamtprotein).

Ergebnisse: Kultivierte primäre humane Hepatozyten konnten mit modifizierten „*MagForce*“-Partikel nach einstündiger Inkubation markiert und mittels klinischer MRT dargestellt werden. Zur Lokalisierung auf Einzelzellniveau war jedoch eine Markierung mit MPIOs erforderlich. Eine ausreichende Partikelinkorporation von 18 Partikel/Zelle konnte nach vier Stunden bei einer Inkubationskonzentration von 30 Partikel/Zelle erzielt und mikroskopisch nachgewiesen werden. MPIO-markierte Hepatozyten wurden erfolgreich resuspendiert und rekultiviert. Die Markierung mit MPIOs blieb während des gesamten Versuchszeitraumes stabil. Sowohl die Markierung als auch die Resuspendierung übten keinen negativen Effekt auf die Zellintegrität und die metabolische Aktivität der kultivierten primären humanen Hepatozyten aus.

II. Einleitung, Zielstellung

Die Leberzelltransplantation stellt einen experimentellen Therapieansatz in Fällen von akutem oder chronischen Leberversagen sowie metabolischen Lebererkrankungen dar. Dieses Verfahren beruht auf der Applikation einer Leberzellsuspension mittels eines Katheters über die V. portae oder die A. linealis. Die transplantierten Zellen sollen sich im Zielorgan ansiedeln und die Leberfunktion des Patienten unterstützen. Im Vergleich zur Lebertransplantation liegen die Vorteile einer Zelltransplantation in der geringen Invasivität und der Möglichkeit, mehrere Patienten mit Zellen eines Spenderorgans zu therapieren.

Ein prinzipielles Risiko stellt die Verschleppung der transplantierten Zellen im Gesamtorganismus und die Embolisation von Gefäßen in anderen Organen dar. Ein diagnostisches Verfahren zur Darstellung der Prozesse während und nach der Leberzelltransplantation steht derzeit nicht zur Verfügung. Dies ist jedoch erforderlich, um Komplikationen zeitnah entgegenwirken zu können. In der klinischen Praxis kommen derzeit lediglich die histologische Untersuchung von Gewebeproben nach der Leberzellapplikation sowie die Szintigraphie radioisotopmarkierter Spenderzellen zur Anwendung. Beide Verfahren sind nicht dazu geeignet, die Zellen während der Applikation zu lokalisieren. Nuklearmedizinische Verfahren sind darüber hinaus durch die kurze Halbwertszeit der für die klinische Anwendung zur Verfügung stehenden Radionukleotide und durch ihre geringe anatomische Auflösung begrenzt. Die Magnetresonanztomographie (MRT) ermöglicht nichtinvasive Untersuchungen bei hoher Auflösung ohne Strahlenbelastung für den Patienten. Einzelne Zellen können nach der Markierung mit bioresistenten superparamagnetischen Eisenoxidpartikel über einen langen Zeitraum mittels MRT dargestellt werden. Bislang existierte jedoch kein Verfahren zur Markierung humaner Leberzellen. Ein solches Verfahren sollte sowohl eine kontinuierliche als auch langfristige Darstellung der Prozesse während und nach einer Zellapplikation ermöglichen und so zur Qualitätssicherung der klinischen Leberzelltransplantation beitragen.

Ziel der vorliegenden Studie war es, eine Methode zur Markierung primärer humaner Hepatozyten mit Eisenoxidpartikel und ihrer Darstellung mittels klinischer MRT zu entwickeln. Darüber hinaus sollten die Bereitstellung dieser Zellen für die klinische Zelltransplantation sowie die Effekte der Markierung *in vitro* untersucht werden.

III. Methodik, Ergebnisse, Diskussion

Als Zellquelle diente Lebergewebe aus 19 Spenderorganen, welches bei Leberteileresektionen aufgrund primärer oder sekundärer maligner Tumoren sowie benigner Lebererkrankungen gewonnen wurde (Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie, Campus Virchow Klinikum, Charité Berlin). Die Nutzung des humanen Gewebes für Forschungszwecke wurde von der Ethikkommission der Charité genehmigt und die Patienten zuvor dementsprechend aufgeklärt. Die Isolierung primärer humaner Hepatozyten erfolgte unmittelbar nach der Gewebeentnahme aus gesunden, tumorfreien Arealen der Leberresektate. Das Lebergewebe wurde unter sterilen Bedingungen kanüliert, mit 500ml Spüllösung gereinigt und unter Rezirkulation von 100ml Kollagenase-Lösung für circa 15 Minuten verdaut. Daraufhin wurde das Gewebe mechanisch zerkleinert und der enzymatische Verdau durch Zugabe einer Spüllösung mit humanem Albumin gestoppt. Die Leberzellsuspension wurde filtriert und mit einer Dichte-Gradienten-Zentrifugation aufgereinigt. Die Zellzahl und Viabilität der primären humanen Hepatozyten wurde mittels des Trypanblau-Ausschlusses in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden in supplementiertem Williams' Medium E in 6-, 8- und 96-Lochplatten ausgesät und in einem begasteten Brutschrank bei 37°C kultiviert. Das Nährmedium wurde während der gesamten Kulturphase in einem Intervall von 24 Stunden gewechselt und der entnommene Überstand für die Analyse biochemischer Parameter eingefroren. Zur enzymatischen Resuspendierung wurden die Zellen mit Phosphatpuffer (PBS) gespült und mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,25 / 0,02%) inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in Nährmedium aufgenommen.

MRT-Untersuchungen wurden nach Resuspendierung und Fixierung der Zellen in Agarose-Suspension (1%) durchgeführt. Eingesetzt wurden ein klinischer Magnetresonanztomograph mit einer Feldstärke von 3,0 Tesla und eine zirkulär polarisierte Oberflächenspule mit einem Durchmesser von 2cm. Die Bildaufnahme erfolgte mittels einer T2*-gewichteten Gradienten-Echo-Puls-Sequenz (TR: 200ms, TE: 25ms, FA: 20°, NEX: 12, FoV: 20mm, Matrix: 256x256 Pixel, Schichtdicke: 0,8mm, resultierendes Voxelvolumen: 78µm x 78µm x 800µm, TA: 5:10min.).

Als intrazelluläres Kontrastmittel zur Darstellung humaner Hepatozyten mittels MRT wurden zwei verschiedene Eisenoxidpartikel evaluiert. Erste Studien untersuchten die Markierung mit nanoskaligen Eisenoxidpartikel, so genannten „*Superparamagnetic iron oxide particles*“ (SPIOs), an Zellen von 6 Spenderorganen.

Hierfür kamen „*MagForce*“-Partikel mit einem Gesamtdurchmesser von circa 100nm zur Verwendung. Diese Partikel sind mit Aminosilan beschichtet und wurden über reaktive NH₂-Gruppen mit FITC-Fluorochromen für den immunfluoreszenz-mikroskopischen Nachweis sowie dem Tat-Peptid des humanen HI-Virus zur schnellen Aufnahme in die Zellen modifiziert. Adhärenente primäre humane Hepatozyten wurden nach einer Präkulturphase von 24 Stunden mit der Partikelsuspension bei einer Konzentration von 100µg Fe/ml/1x10⁶ Zellen für eine Stunde unter Standard-Kulturbedingungen inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Partikelaufnahme mittels Licht- und Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Zur Darstellung mittels MRT wurden Proben von 1x10⁶ markierten und nativen Zellen in 250µl Agarose-Suspension erstellt.

Weitere Untersuchungen erfolgten mit Eisenoxidpartikel im microskaligen Bereich, so genannten „*Micron-sized polymer encapsulated superparamagnetic iron oxide particles*“ (MPIOs), an Zellen von 13 Spenderorganen. Diese Partikel besitzen einen Gesamtdurchmesser von ca. 1,6µm und einen Eisengehalt von ca. 42,5%. Der Eisenkern ist in ein Polymer aus Divinylbenzenen enkapsuliert und die Partikel sind mit *Dragon-Green*-Fluorochromen markiert. Im Rahmen einer Pilotstudie zur Ermittlung der geeigneten Inkubationsbedingungen wurden adhärenente Hepatozyten nach einer Präkulturphase von 24 Stunden bei Konzentrationen von 10 – 40 Partikel/Zelle für 18 Stunden sowie nach einer Präkulturphase von 18 Stunden bei einer Konzentration von 30 Partikel/Zelle für 2, 4, 6 und 8 Stunden inkubiert. Für beide Fragestellungen kamen jeweils Zellen von 3 Spenderorganen zur Verwendung. Die Partikelaufnahme wurde mittels Licht-, Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie nachgewiesen. MRT-Messungen wurden an markierten und nativen Zellen bei einer Zellzahl von 1000 Zellen in 250µl Agarose-Suspension sowie einer korrelierenden Menge an freien Partikel durchgeführt und das Signal-zu-Rausch Verhältnis (SNR) bestimmt. Zur Untersuchung der Effekte der Markierung und Resuspendierung wurden Hepatozyten von 9 Zellspendern verwendet und in vier Versuchsgruppen (A - D) über einen Zeitraum von 6 Tagen kultiviert. Die Zellen der Gruppen B und D wurden nach 18 Stunden Präkultur mit 30 MPIOs/Zelle für 4 Stunden inkubiert, die Zellen der Gruppen A und C wurden nicht markiert. Die Zellen der Gruppen C und D wurden nach 24 Stunden Präkultur sowie direkt nach der Markierung resuspendiert und unter Standardbedingungen rekultiviert. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 5 Tagen nach Markierung bzw. Resuspendierung anhand folgender Parameter

charakterisiert: Morphologie, Partikelgehalt, Freisetzung von Aspartat-Amino-Transferase (AST) und Lactat-Dehydrogenase (LDH), Synthese von Albumin und Harnstoff. An den Kulturtagen 2 und 6 erfolgte die Bestimmung der mitochondrialen Aktivität der markierten Zellen (*CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay*) und am Ende der Kulturphase wurde der Proteingehalt der Zellen aller Gruppen ermittelt. Zur statistischen Auswertung wurden t-Tests für unabhängige Stichproben sowie einfaktorielle Varianzanalysen für verbundene Stichproben durchgeführt. Ein p-Wert kleiner oder gleich 0,05 wurde als statistisch signifikant beurteilt. Alle Werte wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben.

Im Rahmen dieser Studie wurden frisch isolierte primäre humane Hepatozyten mit einer durchschnittlichen Viabilität von $75,72\% \pm 1,42\%$ verwendet. Um eine hohe metabolische Aktivität zu gewährleisten, wurden die Zellen für die Markierungsversuche in Adhäsion kultiviert. Die Versuche mit SPIOs zeigten, dass Eisenoxid-markierte humane Hepatozyten *in vitro* mittels klinischer MRT dargestellt werden können und nach einstündiger Inkubation mit „*MagForce*“-Partikel detektierbar sind. Die Partikelaufnahme ließ sich durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen nachweisen. Anhand morphologischer Kriterien konnten keine Veränderungen der markierten Hepatozyten im Vergleich zu nativen Zellen festgestellt werden. T2*-gewichtete MRT-Aufnahmen der SPIO-markierten Zellen zeigten deutliche Signalauslöschungen, native Zellen induzierten dagegen kein detektierbares Signal. Allerdings gelang es nicht, die SPIO-markierten Hepatozyten auf Einzelzellniveau darzustellen. Dies wäre jedoch die Voraussetzung für einen Nachweis einzelner Zellen nach Zelltransplantation. Die Ursache hierfür lag vermutlich in einer zu geringen Partikelaufnahme durch die kultivierten Hepatozyten. Da SPIOs im Vergleich mit anderen superparamagnetischen Eisenoxidpartikel einen relativ schwachen Effekt auf die MR-Relaxivität haben, ist zur Darstellung markierter Zellen auf Einzelzellniveau die Aufnahme einer großen Partikelmenge erforderlich. Dies kann durch eine lange Inkubation erzielt werden. Um humane Hepatozyten für eine Zelltransplantation zu nutzen, sollte jedoch eine möglichst kurze Inkubationszeit gewählt werden, da die Effektivität der Resuspendierung zuvor adhärenter Hepatozyten in Abhängigkeit von deren Kulturdauer abnimmt. Zur Gewährleistung einer schnellen Partikelaufnahme sind die „*MagForce*“-Partikel mit dem Tat-Peptid des HI-Virus modifiziert worden. Dieses Membran-Translokations-Peptid vermittelt

eine Aufnahme durch adsorptive Endozytose. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Zellen mit Tat-Peptid-gekoppelten Eisenpartikel ohne einen signifikanten Effekt auf ihre Integrität und Funktion markiert werden können. Da der Funktionsmechanismus dieser Translokation noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnte, bleibt eine klinische Anwendung bislang jedoch ausgeschlossen. Darüber hinaus ist die Nutzung von SPIOs zur Langzeitdarstellung transplantierte Zellen durch zwei weitere Faktoren limitiert: die Menge an inkorporierten Partikel wird durch jede Zellteilung verringert, dies kann zu einem Verlust der Detektierbarkeit SPIO-markierter Zellen führen. Nach Aufnahme in die Zellen können SPIOs lysosomal abgebaut und ihr Eisengehalt intrazellulär freigesetzt werden. Dies führt zu oxidativem Stress und Apoptose der markierten Zellen.

Um ein Verfahren zu etablieren, welches sowohl die Langzeitdarstellung der transplantierten Zellen ermöglicht als auch für die klinische Anwendung geeignet ist, wurde die Markierung humaner Hepatozyten mit MPIOs untersucht. Diese Partikel zeichnen sich durch ihre hohe Relaxivität und Stabilität aus. Mehrere Studien hatten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* im Kleintiermodell gezeigt, dass MPIO-markierte Zellen auf Einzelzellniveau lokalisiert werden können. Der hohe Eisengehalt dieser Partikel erlaubt eine Darstellung einzelner Zellen mittels MRT bereits nach Inkorporation weniger Partikel. Dies ermöglicht die Detektion der Zellen auch nach mehreren Zellteilungen. Die Einkapsulierung des Eisenkerns in ein bioresistentes Polymer verhindert den intrazellulären Abbau der Partikel und gewährleistet somit die Langzeitdarstellung der markierten Zellen. Eine schnelle Partikelaufnahme ist durch die geringe Dichte negativ geladener Carboxylgruppen auf der Oberfläche des Polymers gewährleistet. Zur Ermittlung geeigneter Inkubationsbedingungen und der zur Einzelzelldarstellung humaner Hepatozyten erforderlichen Partikelaufnahme wurden zwei Dosisfindungsstudien durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen ließen sowohl einen Einfluss der Präkulturdauer als auch der Inkubationsdauer und der Inkubationskonzentration auf die Partikelaufnahme sowie die Effektivität der Markierung erkennen. Nach 24 Stunden Präkultur und 18 Stunden Inkubation mit steigenden Partikelkonzentrationen wurde eine Partikelaufnahme von 10 – 25 Partikel/Zelle erzielt, 79,50% ± 7,33% - 100% der Zellen konnten erfolgreich markiert werden. Nach 18 Stunden Präkultur und Inkubation mit 30 Partikel/Zelle bei steigender Inkubationsdauer konnten die Zellen mit 12 – 22 Partikel/Zelle markiert werden, bereits nach 4 Stunden waren alle inkubierten Zellen markiert. Die

intrazelluläre Lokalisation der inkorporierten MPIOs wurde mittels Licht-, Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie nachgewiesen. MRT-Untersuchungen an markierten Zellen (10, 16, 18, und 25 Partikel/Zelle) zeigten, dass humane Hepatozyten nach Aufnahme von 18 ± 1 Partikel/Zelle bei einem Signal-zu-Rausch Verhältnis von $28,82 \pm 5,27$ auf Einzelzellniveau dargestellt werden können. Die MRT-Aufnahmen der Agarose-fixierten Zellen wurden mit bereits publizierten MRT-Daten von MPIO-markierten Zellen verglichen. Die markierten Hepatozyten zeigten punktuelle Signalauslöschungen und kontrastierten sich klar gegen den Bildhintergrund. Native Zellen sowie Proben mit einer korrelierenden Menge an freien Partikel bewirkten keine punktuellen Signalauslöschungen. Eine Partikelaufnahme von 18 Partikel/Zelle konnte nach einer Präkulturdauer von 18 Stunden bei einer Inkubationskonzentration von 30 Partikel/Zelle und einer Inkubationsdauer von 4 Stunden erzielt werden.

Basierend auf diesem Protokoll wurden die Effekte der Markierung mit MPIOs sowie der Bereitstellung der in Kultur markierten Hepatozyten für die Zelltransplantation *in vitro* untersucht. Da humane Hepatozyten in Abhängigkeit von der Kulturzeit morphologisch und metabolisch dedifferenzieren, wurde für diese Untersuchungen eine Versuchsdauer von 6 Tagen gewählt. Kultivierte Hepatozyten können mittels enzymatischer Resuspendierung für eine Zelltransplantation bereitgestellt werden. Die Effektivität dieses Verfahrens ist von der Kulturdauer sowie dem Anwachsverhalten der Hepatozyten nach Zellisolierung abhängig. Die Untersuchungen zeigten, dass eine Markierung mit MPIOs keinen negativen Effekt auf die Resuspendierung humaner Hepatozyten hat. 24 Stunden nach Isolierung konnten $52,17\% \pm 3,79\%$ der initial ausgesäten nativen Zellen (Gruppe C) sowie $55,11\% \pm 6,75\%$ der markierten Zellen (Gruppe D) erfolgreich resuspendiert werden. Ebenso hatte die Markierung keinen Effekt auf die Viabilität der resuspendierten Zellen (Gruppe C: $68,93\% \pm 3,24\%$, Gruppe D: $72,53\% \pm 3,54\%$). Die Markierung der humanen Hepatozyten mit MPIOs blieb während des gesamten Versuchszeitraumes stabil, es konnte sowohl bei den kontinuierlich adhärennten als auch resuspendierten Zellen kein Partikelverlust festgestellt werden. Zur Detektion möglicher negativer Effekte der Partikelaufnahme und der Resuspendierung wurde die Konzentration der Enzyme AST und LDH im Nährmedium bestimmt. Beide Enzyme stellen etablierte Parameter für die zelluläre Integrität kultivierter Hepatozyten dar, ihre Konzentration im Medium korreliert mit dem Grad der Zellschädigung. Die Zellen der Gruppen C

und D zeigten am 1. Kulturtag nach Resuspendierung signifikant erhöhte AST-Konzentrationen, im weiteren Verlauf stabilisierte sich die Enzymfreisetzung jedoch. Von Kulturtag 3 bis Kulturtag 6 ließen sich keine signifikanten Unterschiede in den AST-Konzentrationen aller Versuchsgruppen feststellen. Die hohen AST-Konzentrationen im Überstand der resuspendierten Zellen am Kulturtag 2 waren durch die geschädigten Zellen verursacht worden, welche nach Resuspendierung gemeinsam mit den viablen Zellen ausgesät und erst beim Mediumwechsel nach 24 Stunden entfernt wurden. Die LDH-Freisetzung der resuspendierten Zellen erreichte am Kulturtag 3 das Niveau der kontinuierlich adhärenen Zellen, im weiteren Verlauf zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Konzentrationen aller vier Versuchsgruppen. Lediglich von Kulturtag 5 auf Kulturtag 6 wurde ein Anstieg der LDH-Freisetzung der resuspendierten Zellen (Gruppe C und D) beobachtet. Die Markierung mit MPIOs hatte während der gesamten Versuchsdauer keinen Effekt auf die Konzentrationen der Schädigungsparameter AST und LDH. Die Analyse der mitochondrialen Aktivität der resuspendierten Zellen bestätigte diese Beobachtungen, auch hier zeigte sich kein negativer Effekt durch die Markierung mit MPIOs. Zur Charakterisierung der metabolischen Aktivität der markierten und resuspendierten Hepatozyten wurde die Syntheseleistung anhand der Parameter Harnstoff und Albumin untersucht. Die Harnstoff-Synthese der resuspendierten Zellen war 24 Stunden nach Resuspendierung im Vergleich zu den kontinuierlich adhärenen Zellen signifikant reduziert. Im weiteren Verlauf ließ sich kein Unterschied in der Syntheseleistung aller vier Versuchsgruppen feststellen. Die Albumin-Synthese stieg in allen Gruppen während des gesamten Kulturverlaufs an, signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht zu beobachten. Zur Validierung dieser Daten wurde am letzten Kulturtag die Menge an Gesamtprotein aller Kulturgruppen bestimmt. Da sich hier kein signifikanter Unterschied zeigte, konnte von einer gleichen Menge an kultivierten Zellen in allen Versuchsgruppen ausgegangen werden. Diese Untersuchungen zeigten, dass MPIO-markierte primäre humane Hepatozyten für eine Zelltransplantation genutzt werden können. Die Markierung mit MPIOs blieb während der gesamten Versuchsdauer stabil und wurde durch die enzymatische Resuspendierung nicht beeinträchtigt. Sowohl die Markierung als auch die Resuspendierung wirkten sich nicht negativ auf die Integrität und metabolische Aktivität der primären humanen Hepatozyten aus.

Die ersten Ergebnisse der Studien zur Markierung primärer humaner Hepatozyten konnten auf dem „Medical Students Research Congress“ in Istanbul 2007 (Morgul MH et al.: *Transplantation of primary human hepatocytes – Iron-oxide labelling for cell tracking via MRI*) sowie der Jahrestagung der „European Society for Artificial Organs“ in Krems 2007 (Morgul MH et al.: *Transplantation of primary human hepatocytes – Iron oxide labelling for cell detection via MRI*) vorgestellt werden. Die Ergebnisse der Versuche mit SPIOs wurden im Jahr 2008 im „*International Journal of Artificial Organs*“ veröffentlicht (Raschzok N, Morgul MH, Schwartlander R, Vondran FWR, Michel R, Stelter L, Pinkernelle J, Jordan A, Teichgraber U, Sauer IM: *Tracking of primary human hepatocytes with clinical MRI – Initial results with Tat-peptide modified superparamagnetic iron oxide particles*. Int J Artif Organs 2008. 31: 252-257). Die Ergebnisse der Untersuchungen mit MPIOs konnten auf dem „World Congress of Regenerative Medicine“ in Leipzig 2007 (Raschzok N et al.: *Transplantation of primary human hepatocytes – Iron oxide labelling for cell detection via MRI*), der 24. Jahrestagung der „German Association for the Study of the Liver“ in Frankfurt a. M. 2008 (Raschzok N et al.: *Preparation of iron oxide labelled primary human hepatocytes suitable for cell transplantation*) sowie der 54. Jahrestagung der „American Society for Artificial Internal Organs“ in San Francisco 2008 (Morgul MH et al.: *Iron oxide labeling of primary human hepatocytes for cell detection via clinical MRI*) präsentiert werden. Ein weiterer Artikel wurde im „*Journal of Cellular and Molecular Medicine*“ veröffentlicht (Raschzok N, Morgul MH, Pinkernelle J, Vondran FWR, Billecke N, Kammer NN, Pless G, Adonopoulou MK, Leist C, Stelter L, Teichgraber U, Schwartlander R, Sauer IM: *Imaging of primary human hepatocytes performed with micron-sized iron oxide particles and clinical magnetic resonance tomography*. J Cell Mol Med 2008. 12: 1384-1394).

Die Ziele dieser Studie konnten entsprechend der Planung erreicht werden. Es ließ sich eine Methode zur Markierung primärer humaner Hepatozyten mit Eisenoxidpartikel zur Darstellung mittels klinischer MRT etablieren. Darüber hinaus konnte die Bereitstellung dieser Zellen für die klinische Zelltransplantation untersucht und negative Effekte der Markierung und Resuspendierung *in vitro* ausgeschlossen werden. Die entwickelte Methode ist wesentlicher Bestandteil einer Großtierstudie zur Leberzelltransplantation im Schweine-Modell.

IV. Erklärung über den Anteil an den Publikationen

Herr Nathanael Johannes Raschzok hatte folgenden Anteil an den eingereichten Publikationen:

Publikation 1: Raschzok N*, Morgul MH*, Pinkernelle J, Vondran FWR, Billecke N, Kammer NN, Pless G, Adonopoulou MK, Leist C, Stelter L, Teichgraber U, Schwartlander R, Sauer IM. *Imaging of primary human hepatocytes performed with micron-sized iron oxide particles and clinical magnetic resonance tomography*. Journal of Cellular and Molecular Medicine 2008. 12: 1384-1394. *contributed equally to this work

65 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Zellisolierung, Aufreinigung der Zellen, Ansatz und Betreuung von Leberzellkulturen, Markierung mit Eisenoxidpartikeln, Lichtmikroskopische Begutachtung, Fluoreszenzfärbung, Probenentnahme für biochemische Analysen, Durchführung der Albumin-ELISAs, Bestimmung der Enzymaktivitäten von AST und LDH, Bestimmung von Harnstoff und Gesamtprotein, Durchführung eines Proliferationstests (MTT-Test), Erstellen der Proben für MRT und Elektronenmikroskopie, Durchführung der MRT-Messungen, Erstellen der Graphiken und Tabellen, Schreiben und Einreichen des Papers, Antwort auf die Fragen der Reviewer, Revision und Wiedereinreichen, Korrespondenz mit den Editoren bis zur Veröffentlichung.

Publikation 2: Raschzok N*, Morgul MH*, Schwartlander R, Vondran FWR, Michel R, Stelter L, Pinkernelle J, Jordan A, Teichgraber U, Sauer IM. *Tracking of primary human hepatocytes with clinical MRI – Initial results with Tat-peptide modified superparamagnetic iron oxide particles*. International Journal of Artificial Organs 2008. 31: 252-257. *contributed equally to this work

45 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Zellisolierung, Aufreinigung der Zellen, Ansatz und Betreuung von Leberzellkulturen, Markierung mit Eisenoxidpartikeln, Lichtmikroskopische Begutachtung, Fluoreszenzfärbung, Erstellen der Proben für MRT, Durchführung der MRT-Messungen, Erstellen der Graphiken und Tabellen, Schreiben und Einreichen des Papers, Antwort auf die Fragen der Reviewer, Revision und Wiedereinreichen, Korrespondenz mit den Editoren bis zur Veröffentlichung.

Publikation 3: Vondran FWR, Katenz E, Schwartlander R, Morgul MH, Raschzok N, Gong XB, Cheng XD, Kehr D, Sauer IM. *Isolation of primary human hepatocytes after partial hepatectomy – Criteria for identification of the most promising liver specimen.* Artificial Organs 2008. 32: 205-213.

10 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Isolierung von primären humanen Hepatozyten aus Resektaten, Aufreinigung der Zellen, Ansatz und Betreuung von Leberzellkulturen, Überarbeitung und Korrekturlesen des Manuskripts.

V. Originalarbeiten

Raschzok N*, Morgul MH*, Pinkernelle J, Vondran FWR, Billecke N, Kammer NN, Pless G, Adonopoulou MK, Leist C, Stelter L, Teichgraber U, Schwartlander R, Sauer IM.

Imaging of primary human hepatocytes performed with micron-sized iron oxide particles and clinical magnetic resonance tomography.

Journal of Cellular and Molecular Medicine 2008. 12: 1384-1394.

DOI: 10.1111/j.1582-4934.2008.00343.x

*contributed equally to this work

Raschzok N*, Morgul MH*, Schwartlander R, Vondran FWR, Michel R, Stelter L, Pinkernelle J, Jordan A, Teichgraber U, Sauer IM.

Tracking of primary human hepatocytes with clinical MRI – Initial results with Tat-peptide modified superparamagnetic iron oxide particles.

International Journal of Artificial Organs 2008. 31: 252-257.

*contributed equally to this work

Vondran FWR, Katenz E, Schwartlander R, Morgul MH, Raschzok N, Gong XB, Cheng XD, Kehr D, Sauer IM.

Isolation of primary human hepatocytes after partial hepatectomy – Criteria for identification of the most promising liver specimen.

Artificial Organs 2008. 32: 205-213.

DOI: 10.1111/j.1525-1594.2007.00524.x

VI. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

VII. Publikationsliste

Publikationen

- Publikation
Erst-Autor *Imaging of primary human hepatocytes performed with micron-sized iron oxide particles and clinical magnetic resonance tomography*
Journal of Cellular and Molecular Medicine 2008. 12: 1384-1394. (Impact Factor: 6,8 im Jahr 2007)
- Publikation
Erst-Autor *Tracking of primary human hepatocytes with clinical MRI – Initial results with Tat-peptide modified superparamagnetic iron oxide particles*
International Journal of Artificial Organs 2008. 31: 252-57. (Impact Factor: 1,3 im Jahr 2007)
- Publikation
Co-Autor *Isolation of primary human hepatocytes after partial hepatectomy – Criteria for identification of the most promising liver specimen*
Artificial Organs 2008. 32: 205-13. (Impact Factor: 1,8 im Jahr 2007)

Kongressbeiträge

- Vortrag
04/2007 *The SlideReactor – A new technique for continuous monitoring of cultured cells*
Medical Students Research Congress, Istanbul, Türkei
- Abstract
04/2007 *Transplantation of primary human hepatocytes – Iron oxide labelling for cell tracking via MRI*
Medical Students Research Congress, Istanbul, Türkei
- Vortrag
09/2007 *The SlideObserver - A new concept for the parallel operation of two SlideReactor bioreactor systems*
Congress of the European Society for Artificial Organs, Krems, Österreich
- Abstract
09/2007 *Transplantation of primary human hepatocytes – Iron oxide labelling for cell detection via MRI*
Congress of the European Society for Artificial Organs, Krems, Österreich
- Vortrag
10/2007 *Transplantation of primary human hepatocytes – Iron oxide labelling for cell detection via MRI*
World Congress of Regenerative Medicine, Leipzig, Deutschland
- Poster
01/2008 *Preparation of iron oxide labelled primary human hepatocytes suitable for cell transplantation*
Jahrestagung der German Association for the Study of the Liver, Frankfurt a. M., Deutschland
- Abstract
06/2008 *Iron oxide labelling of primary human hepatocytes for cell detection via clinical MRI*
54th Annual Conference of the American Society for Artificial Internal Organs, San Francisco, USA
- Vortrag
10/2008 *Quality control in transplantation of iron-oxide particle labelled liver cells by using continuum source atomic absorption spectrometry*
2nd International Symposium on Continuum Source Spectrometry, Berlin, Deutschland

VIII. Erklärung

„Ich, Nathanael Johannes Raschzok, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: 'Markierung primärer humaner Hepatozyten mit Eisenoxidpartikel zur Darstellung mittels klinischer Magnetresonanztomographie' selbst verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, 06.10.2008

Nathanael Raschzok