

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

DISSERTATION

*„In vitro Evaluierung von
Magnetresonanztomografie-Kontrastmitteln für die Markierung
primärer humaner Hepatozyten“*

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

David Mücke

aus Berlin

Gutachter/in: 1.: Priv.-Doz. Dr. med. I. M. Sauer

2.: Prof. Dr. med. U. P. Neumann

3.: Prof. Dr. med. S. Jonas

Datum der Promotion: 01.02.2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung	9
1.1 Lebertransplantation.....	9
1.2 Alternativen zur Lebertransplantation.....	11
1.3 Leberzelltransplantation	12
1.4 Qualitätsmanagement in der Leberzelltransplantation	15
1.5 SPIOs und MPIOs.....	16
1.6 Mögliche Risiken der Markierung mit Eisenoxidpartikeln: Eisenstoffwechsel und ROS.....	16
1.7 Ziel der Doktorarbeit.....	18
2 Material, Methodik.....	20
2.1 Materialliste	20
2.1.1 Zellisolierung.....	20
2.1.2 Zellkultur, Markierung	21
2.1.3 Morphologie, Zellschädigung, Gesamtprotein	21
2.1.4 Quantifizierung des Eisengehaltes	22
2.1.5 <i>In vitro</i> MRT und Phantommodell	22
2.1.6 Real-Time-PCR	22
2.1.7 Western Blot	23
2.2 Zellisolierung	24
2.3 Zellkultur.....	26
2.4 Inkubation der Hepatozyten mit Eisenoxidpartikeln und Eisenzitrat.....	27
2.5 Morphologie der Zellen, Nachweis der Partikelinkorporation und Quantifizierung des Eisengehaltes	28
2.5.1 Lichtmikroskopie	28
2.5.2 Quantifizierung des Eisengehalts	28
2.6 <i>In vitro</i> MRT und Phantommodell.....	29
2.7 Zellschädigung, Syntheseparameter, Gesamtprotein	30

2.8 ROS.....	31
2.9 Quantitative Real-Time-PCR.....	32
2.9.1 Isolierung der RNA	32
2.9.2 Reverse Traskriptase der RNA.....	32
2.9.3 Real-Time-PCR	33
2.10 Western Blot.....	34
2.10.1 Isolierung des Proteins	35
2.10.2 Elektrophorese.....	35
2.10.3 Blotting.....	36
2.10.4 Darstellung des Proteins.....	36
2.11 Statistische Analyse	37
3 Ergebnisse	38
3.1 Zellisolierung	38
3.2 Markierung	38
3.3 Morphologie.....	39
3.4 Eisengehalt.....	41
3.5 <i>In vitro</i> MRT	42
3.6 Zellschädigung und Syntheseparameter.....	43
3.7 ROS.....	45
3.8 Ferritinexpression.....	46
3.9 Transferrin-Rezeptorexpression.....	47
4 Diskussion.....	50
4.1 Leberzelltransplantation	50
4.1.1 Verfügbarkeit	50
4.1.2 Kryokonservierung.....	51
4.1.3 Abstoßung und Immunsuppression	52
4.1.4 Invasivität.....	53
4.1.5 Genmanipulation.....	53
4.1.6 Tierexperimentelle Studien	54
4.1.7 Klinische Studien	54
4.1.8 Ausblick, Ziele.....	55
4.2 Qualitätsmanagement in der Leberzelltransplantation	56
4.2.1 Histologische Probenentnahme.....	56
4.2.2 Indirekte Evaluierung.....	56

4.2.3 Markergene.....	57
4.2.4 <i>In vitro</i> Markierung.....	57
4.2.5 Kontrastmittel.....	58
4.2.6 Markierung und Aufnahme.....	59
4.2.7 Bildgebende Eigenschaften.....	60
4.2.8 Eisenfreisetzung.....	61
4.2.9 Ausblick, Ziele.....	63
5 Zusammenfassung.....	65
6 Literaturverzeichnis.....	67
Publikationsliste.....	78

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Patientenmortalität in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Lebertransplantation ...	10
Abb. 2: Prinzip der Hepatozytentransplantation.....	14
Abb. 3: Isolierung von primären humanen Hepatozyten.....	26
Abb. 4: Histologische Darstellung der Partikel.....	39
Abb. 5: Lichtmikroskopische Aufnahmen von primären humanen Hepatozyten.....	40
Abb. 6: Eisengehalt der Zellen in Kultur.....	42
Abb. 7: <i>In vitro</i> MRT.....	43
Abb. 8: Zellschädigung und Syntheseleistung.....	44
Abb. 9: Reaktive Sauerstoffspezies.....	45
Abb. 10: Eisenstoffwechsel.....	48

Abkürzungsverzeichnis

ALD	Alcoholic liver disease (alkoholtoxische Leberkrankheit)
ALT	Alanin-Aminotransferase
AST	Aspartat-Aminotransferase
BCA	Bicinchoninic acid (Bicinchoninsäure)
CCC	Cholangiocellular carcinoma (cholangiozelluläres Karzinom)
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
CSAAS	Continuum source atomic absorption spectrometry (Atomabsorptionsspektrometrie mit Kontinuumstrahler)
C _t	Cycle threshold (Schwellenzyklus)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMT	Divalenter Metalltransporter
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
Fe	Ferrum (Eisen)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HCC	Hepatocellular carcinoma (hepatozelluläres Karzinom)
HLA	Human Leukocyte Antigen (humanes Leukozytenantigen)
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IL	Interleukin
IRE	Iron responsive elements (auf Eisen reagierendes Element)
IRP	Iron regulatory proteins (Eisenregulationsprotein)
LAVA	Liver acquisition with volume Acceleration (Lebererfassung mit Volumen Akzeleration)
LCT	Liver cell transplantation (Leberzelltransplantation)
MARS	Molecular Adsorbents Recirculation System
MCS	Mesenchymal stem cell (mesenchymale Stammzelle)
MELD	Model of end stage liver disease (Modell für Lebererkrankungen im Endstadium)

MION	Monocrystalline iron oxide nanoparticles (monokristalline Eisenoxidnanopartikel)
MPIO	Micrometer-sized iron oxide particles (mikrometergroße Eisenoxidpartikel)
mRNA	Messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
MRT	Magnetresonanztomografie
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NASH	Nichtalkoholische Steatohepatitis
OLT	Orthotope Lebertransplantation
OTC	Ornithin-Transcarbamylase
PBS	Primäre biliäre Sklerose
PBS	Phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PHH	Primäre humane Hepatozyten
PSC	Primäre sklerosierende Cholangitis
qRT-PCR	Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion
RFU	Relative fluorescence unit (relative Fluoreszenzeinheit)
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
ROS	Reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SD	Standard deviation (Standardabweichung)
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)
SEM	Standard Error of the Mean (Standardfehler des Mittelwerts)
SPECT	Single photon emission computed tomography (Einzelphotonen-Emissions-Computertomografie)
SPIO	Superparamagnetic iron oxide particles (superparamagnetische Eisenoxidpartikel)
Tf	Transferrin
TfR	Transferrin-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
USPIO	Ultrasmall superparamagnetic iron oxide (ultrakleines superparamagnetisches Eisenoxid)

1 Einleitung

1.1 Lebertransplantation

Die orthotope Lebertransplantation (OLT) stellt den Goldstandard der Therapie bei akutem und chronischem Leberversagen, sowie metabolischen Leberfunktionsstörungen dar (1-3). Als Indikationen sind beispielsweise chronische virale (Hepatitis B, C), autoimmunologisch bedingte oder medikamentös-toxische Hepatitiden, alkoholtoxische Leberkrankheiten (ALD), nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH), primäre biliäre Sklerose (PBS), primäre sklerosierende Cholangitis (PSC), biliäre Atresie, Alpha1-Antitrypsinmangel, Morbus Wilson, hereditäre Hämochromatose, Glykogenspeicherkrankheit, Crigler-Najjar-Syndrom, Hypercholesterinämie, Harnstoffzyklusdefekte, Amyloidose und Karzinome (HCC, CCC) zu nennen (4).

Die erste erfolgreiche Lebertransplantation gelang Dr. Thomas Starzl im Jahre 1967. Neben Verbesserungen in der chirurgischen Technik und der Anästhesie wurden bis heute vor allem Fortschritte im perioperativen Verlauf erzielt. Dazu zählen die Organkonservierung mit Weiterentwicklung von Nährlösungen, die einen Organschaden in der Ischämiezeit bis zur Implantation minimieren sollen, die Verbesserung der Logistik und Technik und vor allem der Einsatz moderner Immunsuppressiva. (4-7).

Vor Etablierung der Lebertransplantation als Behandlungsoption verstarben Patienten mit fortgeschrittenen Lebererkrankungen meist innerhalb einiger Monate. Nun kann bei gutem Verlauf der Therapie sowohl die Lebensqualität als auch die Lebenserwartung erheblich verbessert werden (8). So betrug vor 1985 die 1-Jahresüberlebensrate in Europa 34%, die 5-Jahresüberlebensrate 22%, während bei der 1-Jahresüberlebensrate mittlerweile 86% und bei der 3-Jahresüberlebensrate 78% erzielt werden können (siehe Abbildung 1, (9)). Kinder erreichen sogar ein Langzeitüberleben von mehr als 90% (10).

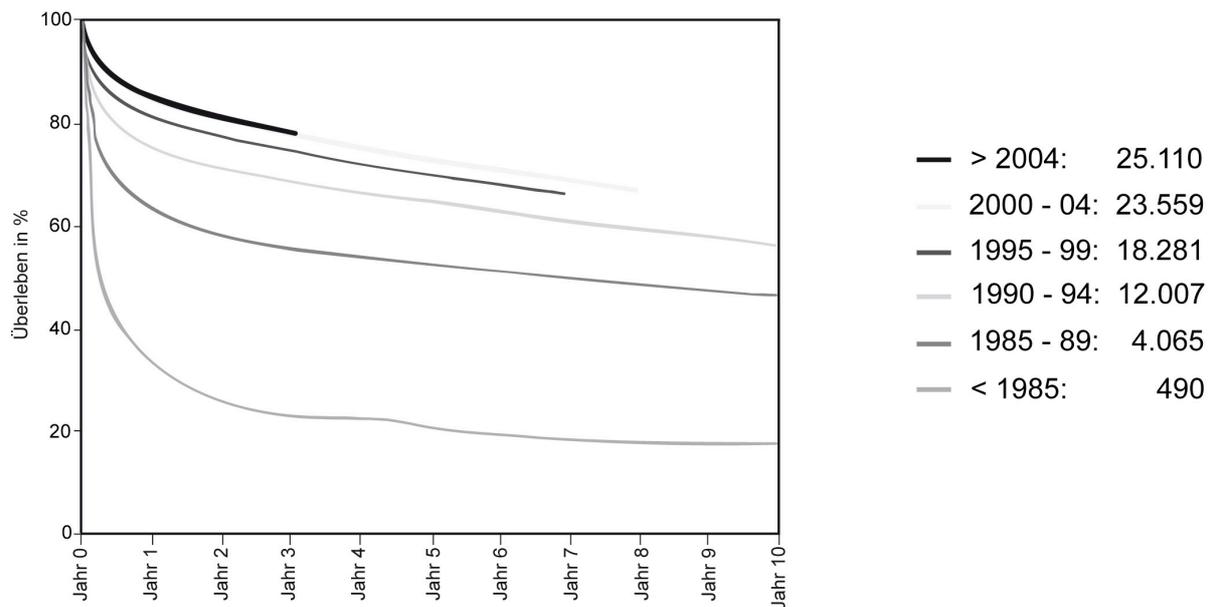


Abb. 1: Patientenmortalität in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Lebertransplantation

Sowohl das Langzeitüberleben als auch die Anzahl an transplantierten Lebern steigt mit den Jahren an (modifiziert nach (9)).

Dennoch kann der operative Eingriff der Lebertransplantation eine Vielzahl an Komplikationsmöglichkeiten zur Folge haben (8). Das trägt zur Einschränkung der Indikationsstellung bei. Bei nicht mortalen, aber dennoch als sehr belastend empfundenen Erkrankungen wird daher eher die konservative Behandlung bevorzugt. Auch stellt die hohe Invasivität bei beispielsweise multimorbiden Patienten eine Kontraindikation für den Eingriff dar. Zudem sind mit dem aufwendigen Verfahren hohe Kosten verbunden, welche den Eingriff selber, aber vor allem auch die Nachbehandlung betreffen. Es folgt eine lange Krankenhausverweildauer, auch ist die lebenslang nötige Immunsuppression besonders teuer. Neben dem finanziellen Aspekt geht das geschwächte Immunsystem des Patienten mit einer erhöhten Infektionsgefahr und einer verminderten Lebenserwartung einher (11). Das aber gravierendste limitierende Problem bei der Lebertransplantation stellt der Mangel an Spenderorganen im Verhältnis zum Bedarf dar. Dabei nimmt diese Diskrepanz weiter zu, da transplantationsbedürftige Lebererkrankungen wie virale Infektionen (z.B. Hepatitis B und C) oder Steatosis hepatis mit der Leberzirrhose als Folge in den letzten Jahren

anstiegen, während die Anzahl an Spenderlebern nicht im gleichen Umfang wuchs (12). Dies wirkt sich negativ auf die Todesrate der auf der Warteliste für eine Spenderleber stehenden Patienten aus (12, 13). In Deutschland wird seit 2006 ein innovatives System mit dem Grundsatz der Prioritätensetzung, der bevorzugten Behandlung des schwersten Falles (*sickest first*), nach dem MELD-Score (Model of End Stage Liver Disease) verfolgt. Dabei wird basierend auf Laborparametern die relative Lebenserwartung des Patienten mit und ohne Transplantat verglichen und daraus ein Ranking erstellt. So konnte die Mortalität der auf der Warteliste stehenden Patienten von vorher 20% auf 10% gesenkt werden (14-16).

Um das dennoch weiterbestehende Problem des Organmangels zu lösen und mehr Menschen behandeln zu können, werden Therapiealternativen gesucht. In den meisten Fällen wird das komplette Organ von hirntoten Spendern als Transplantat verwendet, es besteht jedoch auch die Möglichkeit eine Leber auf zwei Empfänger aufzuteilen (*split liver*) (17). Steigende Bedeutung wird auch der Lebendspende beigemessen. Dabei wird mit einer ähnlichen chirurgischen Technik ein Teil der Leber des Spenders entfernt und dem Empfänger transplantiert. Auf Grund des Regenerationspotentials der Leber entsteht dabei für den Spender kein Nachteil. Besonders für die Behandlung von Kindern hat sich die Lebendspende des linken Leberlappens als ein etabliertes Verfahren entwickelt (18).

1.2 Alternativen zur Lebertransplantation

Um eine Lösung für die limitierenden Probleme der OLT zu finden, beschäftigen sich viele medizinische Studien mit der Entwicklung von Unterstützungssystemen für die Leber. Ein Hauptproblem bei der Leberinsuffizienz stellt die Akkumulation von Stoffen wie Bilirubin, Fettsäuren oder Ammoniak dar, da sie nicht mehr von der Leber verstoffwechselt und ausgeschieden werden können. Die hepatische Enzephalopathie und Schädigung vieler anderer Organe sind die Folge (19, 20).

Man unterscheidet zwischen zwei verschiedenen Ansätzen, zum einen die extrakorporalen Unterstützungsverfahren, die wiederum in artifizielle und bioartifizielle Verfahren untergliedert werden können, zum anderen die intrakorporalen Unterstützungskonzepte, hierbei im Speziellen die Leberzelltransplantation.

Der primäre Anspruch an die Verfahren ist eine überbrückende Funktion bis zur Lebertransplantation. Längerfristige Ziele wären es, aufgrund der Entlastung durch die Verfahren, eine Regeneration der eigenen Leber oder eine permanente Übernahme der

Leberfunktion zu ermöglichen (21-23). Für die letzte Option wäre eine gute physiologische Einbindung vorteilhaft, die nur die intrakorporalen Ansätze bieten.

Bei den artifiziellen Leberunterstützungssystemen wird das Blut extrakorporal durch Filtrations- und Adsorptionsverfahren von Toxinen gereinigt. Zwei wesentliche Umsetzungsversuche dieses Systems sind derzeit in klinischer Erprobung, das MARS-, sowie das Prometheus-System (24, 25). Sie basieren auf der Albumin-Dialyse. Eine Regulations- oder sogar eine Syntheseleistung wird von dieser Art von Systemen nicht erbracht.

Die auf Zellen basierenden Unterstützungsverfahren leisten dies zumindest theoretisch. Bioartifizielle Leberunterstützungssysteme basieren auf der extrakorporalen Entgiftung mittels Hepatozyten via Biotransformation, zusätzlich bieten sie die Möglichkeit der Synthese und der Regulation der Homöostase. Viele Studien beschäftigen sich mit der Entwicklung der künstlichen Leber und verwendeten unterschiedlichste Zellen. Als Zellquelle wurden unter anderem primäre humane Hepatozyten, immortalisierte Zelllinien und porcine Hepatozyten verwendet. Aber auch hier kommt das Problem der geringen Zellverfügbarkeit zum tragen (20).

Der klinische Effekt der Leberunterstützungsverfahren beim Leberversagen ist derzeit noch nicht mit dem der Dialyse bei Nierenversagen zu vergleichen. Es kann nicht als dauerhafte Lösung, sondern viel mehr als überbrückende Maßnahme gesehen werden. Eine signifikante Mortalitätsverminderung konnte durch die Leberunterstützungssysteme nicht erreicht werden, allerdings konnte eine Besserung der klinischen Symptomatik und Parameter, wie Enzephalopathie oder die Senkung des Bilirubinspiegel, erreicht werden (26).

1.3 Leberzelltransplantation

Die Leberzelltransplantation (LCT) bietet besonders bei speziellen Indikationsstellungen, wie bei bestimmten Stoffwechselstörungen, eine vielversprechende Möglichkeit der Behandlung. Auch wenn die Zelltransplantation klinisch noch nicht etabliert ist und eine experimentelle Therapieoption darstellt, könnte sie in der Zukunft den Mangel an Spenderorganen zumindest anteilig verbessern und eine weniger invasive Alternative zur Lebertransplantation darstellen (27). Das Konzept beinhaltet, dass die transplantierten Zellen sich im Spender ansiedeln und die Funktion der geschädigten Leber unterstützen, beziehungsweise übernehmen (21-23). Wie bei

den bioartifiziellen Verfahren kann dabei theoretisch sowohl eine Entgiftungs-, sowie Synthese- und Homöostaseleistung erbracht werden.

Dazu werden aus den für die Lebertransplantation nicht in Frage kommenden Lebern oder Leberteilresektaten Hepatozyten isoliert und dem Patienten als Suspension infundiert (siehe Abbildung 2). Dabei wird die Applikation einer Zellmenge von ca. $30\text{-}100 \times 10^6$ Zellen/kg Körpergewicht angestrebt. Auf Grund von Thrombosegefahr sind die Konzentration der Suspension, die Infusionsgeschwindigkeit und die Maximaldosis bei Einmalgabe limitiert. Um die erforderliche Anzahl an transplantierten Zellen zu erreichen, sind auch mehrmalige Transplantationen möglich (28).

Die Applikation der Zellen in den Organismus kann über unterschiedliche Wege an unterschiedlichen Repopulationsorten erfolgen. Die bevorzugte Möglichkeit der Applikation stellt die direkte intraportale Injektion der Zellen dar. Indirekte Zugangswege zur Vena porta über die Katheterisierung der Vena jugularis oder die Vena femoralis werden ebenfalls angewandt. Die Zellen gelangen dann passiv mit dem Blutstrom zur Leber und lagern sich zunächst in den Lebersinusoiden an (2). Dort verursachen die Hepatozyten als Mikrothromben kurzzeitig eine Ischämie. Das führt zur Stimulation von Kupffer-Zellen und zur Freisetzung von TNF-alpha, was wiederum zur Permeabilitätssteigerung der Lebersinusoide führt und eine Translokation der Zellen ins Leberparenchym ermöglicht. Dort bilden sie *Gap junctions* und Gallengänge im Zusammenspiel mit den residenten Hepatozyten aus. Die Integration dauert drei bis sieben Tage. Eine Unterscheidung zwischen residenten Zellen und transplantierten Zellen ist nun kaum noch möglich (29, 30).

Besonders bei Patienten mit fulminantem Leberversagen, Leberzirrhose oder nach mehrmaliger Transplantation besteht nach intraportaler Applikation ein erhöhtes Risiko der Pfortaderthrombose. Wählt man die Milz als Repopulationsort für die zu transplantierenden Hepatozyten, kann dieses Risiko vermieden werden. Auch dieser Ansatz wurde in mehreren klinischen Studien durchgeführt. Den Zugangsweg stellt hierbei die Arteria splenica dar. Nach Applikation translozieren die Hepatozyten dann in die Leber (31-34). Auch wurde nach splenaler Applikation eine Hepatisierung der Milz beschrieben, dabei bilden sich sinusoidale Strukturen mit funktionstüchtigen Hepatozyten (35). Alternativ können die Zellen in die Peritonealhöhle oder in die Capsula adiposa renis appliziert werden (36, 37).

Besonderes Potential bietet die LCT bei der Behandlung genetisch bedingter Stoffwechselstörungen der Leber. Bereits eine geringe Menge an Lebergewebe kann den Stoffwechseldefekt suffizient ausgleichen. Durch eine allogene Hepatozytentransplantation können so Stoffwechseldefekte wie das Crigler-Najjar-Syndrom Typ I, Defekte des Harnsäurezyklus, hereditäre Hypercholesterinämie und Glykogenspeicherkrankheiten Typ I behandelt werden (2). Bei der Behandlung von akutem Leberversagen wird eine größere Menge an Leberzellen benötigt. Bei dieser Indikationsstellung ist die Leberzelltransplantation als überbrückende Maßnahme bis zur Lebertransplantation gedacht. Wie bei den anderen oben genannten Alternativen zur Lebertransplantation ist auch bei der LCT das Ziel durch die Entlastung die Regeneration der eigenen Leber zu ermöglichen. Der Ansatz chronisches Leberversagen mit LCT zu behandeln zeigte fallabhängig sehr unterschiedliche Ergebnisse und nur vereinzelt eine Verbesserung leberfunktionsspezifischer Parameter (1, 38).

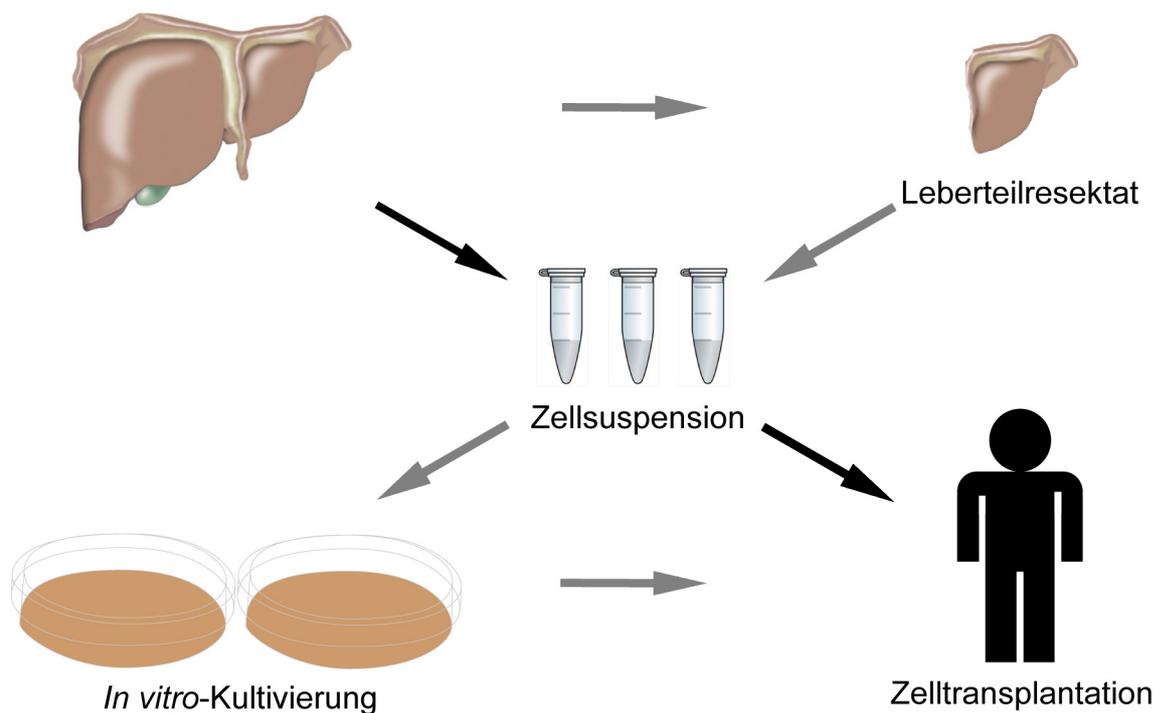


Abb. 2: Prinzip der Hepatozytentransplantation.

Aus der Leber oder einem Leberteilresektat werden die Hepatozyten mittels spezieller Isolierungs- und Reinigungsverfahren gelöst. Nachdem sie gegebenenfalls kultiviert und in vitro modifiziert wurden, werden sie transplantiert.

1.4 Qualitätsmanagement in der Leberzelltransplantation

Eine wichtige Voraussetzung für die klinische Etablierung der LCT ist eine Untersuchung des Verhaltens der Zellen nach der Transplantation, das „*Cell tracking*“. Bei klinischen Studien wurde in einigen Fällen nach der Transplantation ein Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks beobachtet, was auf eine Translokation der Zellen hindeuten könnte (39-41). Das ist nur ein Beispiel, warum es besonders wichtig ist eine Aussage über die Verteilung der Zellen im Empfänger, aber auch über die Zellviabilität und Funktionalität, sowie eine gegebenenfalls stattfindende Proliferation nach der Transplantation treffen zu können. Ein sowohl qualitatives als auch quantitatives Qualitätsmanagement *in vivo* ist unabdingbar, wobei es wichtig ist die Empfängerzellen von den Spenderzellen zu unterscheiden.

Es stehen dabei viele verschiedene Methoden mit unterschiedlichen Vor- und Nachteilen zur Auswahl. Als wichtigste Verfahren zur Evaluation sind die histologischen Untersuchungen nach Transplantation mittels Biopsie, die Markierung der Zellen mit radioaktiven Substanzen und Darstellung mit nuklearmedizinischen Methoden, sowie die Markierung mit Eisenoxidpartikeln und die Darstellung mittels Magnetresonanztomografie (MRT) zu nennen.

Dabei ist besonders die letzte Methode auf Grund ihrer Nicht-Invasivität und ihrer guten Auflösung sehr vielversprechend und wird daher in dieser Arbeit behandelt. Weitere Vor- und Nachteile werden im weiteren Verlauf diskutiert.

Um eine Darstellung zu ermöglichen werden bei der MRT-basierenden Evaluation die Zellen vor der Transplantation *in vitro* mit eisenoxidhaltigen Partikeln markiert, welche dann nach der Transplantation durch ein spezielles Signalverhalten im MRT *in vivo* sichtbar werden. Dabei steht eine Vielzahl von Partikeltypen zur Auswahl. Sie unterscheiden sich in Zusammensetzung und Größe und damit auch in ihren Markierungseigenschaften. Zu unterscheiden sind dabei paramagnetische und superparamagnetische Partikel. Für die paramagnetischen Partikel werden häufig Gadolinium-Verbindungen verwendet, die superparamagnetischen Partikel bestehen bevorzugt aus Dextran-, Siloxan-, Zitrat-, oder Polymer-ummantelten Eisenoxidkernen (42-45). Die Größen der Partikel variieren stark und reichen von einigen Nanometern bis hin zu Millimetern, woraus sich auch deren Namen ableitet. Beispiele für gängige superparamagnetische Partikel sind USPIOs (ultrasmall superparamagnetic iron oxide) mit einer Größe von 30-50 nm im Durchmesser, MION (monocrystalline iron oxide

nanoparticles, 100-200 nm), SPIOs (superparamagnetic iron oxide, 50-150 nm) oder MPIOs (micrometer-sized iron oxide particles, 0,9-8 µm) (46-51).

1.5 SPIOs und MPIOs

SPIOs sind klinisch zugelassene superparamagnetische Magnetresonanzkontrastmittel für die Milz und Leber, welche von unterschiedlichen Firmen unter Namen wie Endorem (Guerbet, Sulzbach, Deutschland), Feridex (Advanced Magnetix, Cambridge, MA) und Resovist (Schering, Berlin, Deutschland) vertrieben werden. Resovist und Endorem basieren auf Eisenoxid-, Feridex auf Ferucarbotran-Kernen. In dieser Arbeit wurden die als erstes klinisch zugelassenen SPIOs (Endorem) verwendet. Sie haben eine Größe von ca. 150 nm im Durchmesser und der Kern aus Eisenoxid ist mit Dextran ummantelt. Ihre Größe, ihre negative Oberflächenladung und ihre besondere galenische Suspensionsstabilisierung verhindert ein Sedimentieren in Lösung. Die Teilchen führen durch eine Relaxationszeitverkürzung zu einer Hypointensität sowohl in der T1-Wichtung als auch in der T2/T2*-Wichtung (52).

MPIOs stellen ebenfalls superparamagnetische Eisenoxidpartikel dar, sind jedoch klinisch nicht zugelassen. Die in dieser Arbeit verwendeten MPIOs (Bangs Laboratories, Fischer, IN, USA) haben einen Durchmesser von 1,63 µm und einen Eisengehalt von 1,1 pg/Partikel, damit beträgt die Eisenoxidkomponente 42,5%. Ummantelt sind die Mikropartikel mit einem Polymer aus Divinylbenzenen. Zusätzlich sind sie noch mit *Dragon-green* Fluorochromen (480/520 nm) markiert. Der Mechanismus der Signalgebung im MRT entspricht dem der SPIOs.

1.6 Mögliche Risiken der Markierung mit Eisenoxidpartikeln: Eisenstoffwechsel und ROS

Ungeklärt ist die Auswirkung der Eisenoxidpartikel auf den Eisenstoffwechsel der markierten Zellen. Insbesondere der große Eisenkern der MPIOs wirft die Frage auf, ob die Ummantelung der Partikel wirksam ist und eine Eisensfreisetzung verhindert werden kann. Zur Beurteilung dieser Fragestellung ist eine genaue Kenntnis über den Eisenstoffwechsel, dessen Regulation und dessen Zusammenhang mit der Radikalentstehung mit potentiellen Auswirkungen auf die Zellen notwendig.

Eisen ist für den Organismus essentiell. Eisen wird über den Darm aufgenommen und wird hauptanteilig als Myoglobin im Muskel, als Hämoglobin in den Erythrozyten und als Speichereisen in der Leber verteilt. Es dient als Elektronentransporter, auch wird es von

vielen metabolischen Enzymen zur Ausübung ihrer Funktion als Cofaktor benötigt (53, 54).

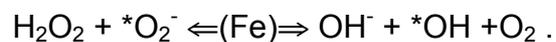
Transferrin fungiert als Transportprotein, welches zwei Fe^{3+} -Ionen zur Zielzelle transportiert. Ist es eisenbeladen wird es als Ferrotransferrin bezeichnet. Dort bindet es an das transmembranöse Rezeptorprotein, den Transferrinrezeptor (TfR). Der Transferrinrezeptor ist ein disulfidverbrücktes Homodimer mit zwei 95 kDA großen Untereinheiten. Er hat Bindungsstellen für zwei Ferrotransferrine. Ist die Bindung erfolgt, kommt es zu einer rezeptorvermittelten Endozytose des Komplexes. In diesem Vesikel wird daraufhin der pH-Wert gesenkt, wodurch die Fe^{3+} -Ionen im sauren Milieu vom TfR-Tf-Komplex abdissoziieren. Durch das NADH-abhängige Enzym Ferricyand-Oxidoreduktase wird das Eisen zu Fe^{2+} -Ionen reduziert und anschließend über den Eisentransporter DMT1 (divalenter Metalltransporter) ins Zytosol transferiert (55-57). Dort bindet es sich an das Eisenspeicherprotein Ferritin. Ferritin ist ein hochmolekulares aus 24 Untereinheiten aufgebautes Protein. Es kann bis zu 4000 Eisenionen pro Molekül speichern und hat damit eine Molekülmasse von ca. 900 kDA. Ferritin oxidiert das Fe^{2+} zu Fe^{3+} und speichert dieses im Molekülinneren, so dass das Eisen nicht mehr reagieren kann. Bei Bedarf wird das Eisen wieder frei gesetzt.

Die Regulation der Eisenaufnahme der Zelle über den TfR erfolgt vor allem über zwei Mechanismen. Die Membranproteine liegen nicht immer alle an der Zelloberfläche, sondern werden bei Bedarf durch Vesikelfusion vermehrt bereitgestellt. Außerdem wird die Expression des Proteins transkriptional und posttranskriptional beeinflusst. In mehreren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass in Zellen mit hoher zytosolischer Eisenkonzentration die Expression des TfR niedrig und dem entsprechend bei niedriger zytosolischer Eisenkonzentration hoch ist (58-60). Verantwortlich hierfür sind vor allem die sogenannten IREs (iron responsive elements) auf der mRNA des TfR, an die bei geringer Eisenbeladung der Zelle die IRPs (iron regulatory proteins) binden und die mRNA stabilisieren. So liegt mehr Transkriptionsprodukt vor und es kann eine vermehrte Translation erfolgen. Ist die zytosolische Eisenkonzentration gering, binden sich die IRPs vermindert an die IREs und die TfR-mRNA wird vermehrt von Ribonukleasen abgebaut (61, 62).

Die Regulation der Ferritinmenge erfolgt über transkriptionale, posttranskriptionale und translationale Mechanismen (60, 63). Auch hierbei spielt das IRE-IRP-System eine besonders wichtige Rolle. Auf der mRNA des Ferritins befindet sich ebenfalls ein IRE,

an welches sich bei geringer zytosolischer Eisenkonzentration IRPs binden. In diesem Fall wird die mRNA jedoch nicht stabilisiert, sondern die Translation inhibiert. Das bedeutet, dass bei geringer Eisenkonzentration in der Zelle die Biosynthese von Ferritin sinkt und umgekehrt (60, 64-66).

Die Eisenresorptionsrate aus dem Darm wird von den Enterozyten bestimmt, welche durch Regulationsproteine je nach Gesamteisenmenge des Körpers gesteuert werden. Eine zu hohe Konzentration des Eisens kann jedoch auf Grund der hohen oxidativen Wirkung zu Schäden führen. Kommt es zu einer Eisenüberladung, die durch die physiologischen Kompensationsmechanismen nicht mehr ausreichend ausgeglichen werden können, führt die hohe oxidative Potenz von Eisen zur Entstehung von toxischen Radikalen (reaktive Sauerstoffspezies, ROS). Die Haber-Weiss-Reaktion zeigt exemplarisch, wie Eisen die Bildung von Hydroxyl-Radikalen (*OH) katalysiert:



Deshalb ist eine eng kontrollierte Eisenhomöostase wichtig. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind eine Gruppe von Molekülen, die bei Überschreiten der Kompensationskapazität des Organismus zu oxidativem Stress und somit über Oxidation von Proteinen, Peroxidation von Lipiden und Modifikation von DNA zu einer lokalen Entzündungsreaktion, zu Zelltod oder zu Mutationen führen (53, 67). Eine Eisenüberladung der Zellen durch Freisetzung aus den Partikeln muss somit untersucht und ausgeschlossen werden. Über mögliche Langzeitschäden der Partikel auf die Zellen kann momentan nur spekuliert werden.

1.7 Ziel der Doktorarbeit

Von den zahlreichen Verfahren zur Lokalisierung der Zellen nach Leberzelltransplantation stellt die Markierung der Zellen mit Eisenoxidpartikeln *in vitro*, in Kombination mit der nicht-invasiven Darstellung der Zellen im Organismus mittels MRT, die momentan vielversprechendste Option dar.

Das Ziel dieser Dissertationsarbeit ist es die klinisch zugelassenen SPIOs und die experimentelle neue Gruppe der MPIOs hinsichtlich Markierung und möglichen Einflüssen auf die Trägerzelle zu analysieren sowie einen Überblick über den derzeitigen Stand der Wissenschaft zum Thema Qualitätsmanagement der Leberzelltransplantation zu schaffen.

Bei den Markierungseigenschaften interessieren besonders die Qualität der Aufnahme der Partikel in die Zelle und deren Darstellbarkeit im MRT. Um diese Fragen zu

untersuchen, werden zwei Gruppen von primären humanen Hepatozyten (PHH) mit der gleichen Menge an Eisenoxid markiert und die Darstellung im Phantommodell bewertet. Um den Einfluss der unterschiedlichen Partikel auf die Zellen zu bestimmen, werden ihre Morphologie und eine mögliche Zellschädigung mit Auswirkung auf die Enzymfreisetzung verglichen. Eine mögliche Eisenfreisetzung wird indirekt über den zeitlichen Verlauf der Expression von Schlüsselproteinen im Eisenstoffwechsel, Ferritin und Transferrin-Rezeptor-1, und über die Bildung von ROS gemessen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen dazu beitragen die Wahl des Kontrastmittels für die Markierung von Leberzellen zu optimieren und sich der klinischen Umsetzbarkeit der Leberzelltransplantation anteilig zu nähern.

2 Material, Methodik

2.1 Materialliste

2.1.1 Zellisolierung

Natrium-Chlorid	Fluka Chemie AG, Neu Ulm, Deutschland
Kalium-Chlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure)	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
BSA (Bovines Serumalbumin), Granulate	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
Calciumchlorid-2-hydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Collagenase P	Roche, Mannheim, Deutschland
PBS (Phosphate Buffered Saline)	PAA, Pasching, Deutschland
Percoll	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Albumin (human)	Baxter GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
Histoacryl	BIbraun, Melsungen, Deutschland
Falcon Tube 15ml/50ml	Becton Dickinson and Company, NJ, USA
Falcon Serological Pipet 5ml/10ml/25ml	Becton Dickinson and Company, NJ, USA
Zellkulturschalen 4cm/6cm/9cm	Becton Dickinson and Company, NJ, USA
Falcon Zellkulturplatten 6/12/24 Vertiefungen	Becton Dickinson and Company, NJ, USA
Pipettenspitzen 1000µl/200µl/20µl	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
SafeSeal Reagiergefäße 1,5ml/2ml	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Urinbecher	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland

Wärmebad	Köttermann GmbH, Uetze/Häisingen Deutschland
Bench	Heraeus Instruments
Zentrifuge (Mulitfuge 3 S-R)	Heraeus Instruments

2.1.2 Zellkultur, Markierung

6-Loch-Platten	Sarstedt, Newton, NC, USA
24-Loch-Platten	Sarstedt, Newton, NC, USA
FCS (Foetal Calf Serum)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Williams´ Medium E + GlutaMax, GIBCO	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Fortecortin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Insulin (human)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Natrium-Pyruvat	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Rattenkollagen	eigene Herstellung
MPIOs	Bangs Laboratories, Fischer, IN, USA
SPIOs (Endorem)	Guebert GmbH, Sulzbach, Deutschland
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Eisen(III) chlorid Hexahydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Trypan Blau Lösung (0,4%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

2.1.3 Morphologie, Zellschädigung, Gesamtprotein

Lichtmikroskop	Axio Imager M1, Zeiss, Jena, Deutschland
Chamber Slides	Lab-Tek, Thermo Scientific
Berliner Blau-Lösung (Kaliumferrozyanid-Lösung)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Paraformaldehyd	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
Methanol	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
NobiFlow GOT-IFCC	HITADO, Möhnensee, Deutschland
NobiFlow GPT-IFCC	HITADO, Möhnensee, Deutschland
NobiFlow Harnstoff-UV	HITADO, Möhnensee, Deutschland

CellLytic M Cell Lysis Reagent	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
BCA-Kit	Interchim, Mont Lucon, Frankreich
BCA Protein Assay	Thermo Scientific, Rockford, USA
Photometer, FluoStar Galaxy	BMG Labtech, Ottenburg, Deutschland
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vortex Mixer	neoLab, Heidelberg, Deutschland

2.1.4 Quantifizierung des Eisengehaltes

Eisenstandardlösung 1000mg/L	Merk, Darmstadt, Deutschland
THGA Graphitrohr-Ofen, Modell 4100ZL	Bodenseewerk Perkin-Elmer. Überlingen, Deutschland
AS-72 Autosampler	Bodenseewerk Perkin-Elmer. Überlingen, Deutschland

2.1.5 *In vitro* MRT und Phantommodell

Gelatine	konventionell erhältlich im Lebensmittelhandel
Agarose	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
Kontrastmittel (Gadolinium)	Dotarem, Guerbet, Cedex, Frankreich
3T-MRT, 30cm Spule	Signa 3T94, GE Healthcare, Milwaukee, WI, USA
Trypsin/EDTA-Lösung	Biochrom, Berlin, Deutschland
Oliven-Öl	konventionell erhältlich in Lebensmittelhandel

2.1.6 Real-Time-PCR

Mercaptomethanol	Merk, Darmstadt, Deutschland
Trizol	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Chlorophorm	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
75% Ethanol	Herbeta-Arzneimittel, Berlin, Deutschland
DEPC (Diethyldicarbonat)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Nano-Drop	peQLab, Biotechnologie GmbH, Erlangen,

	Deutschland
TaqMan High Capacity cDNA Archive Kit	PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Peltier Thermal Cycler PTC-200	MJ Research, Waltham, USA
TaqMan Universal Master Mix Assay (human TfR-1)	PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Assay (human ferritin)	PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
TaqMan GAPDH Control Reagents	PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
iCycler iQ Real Time PCR system	Biorad, CA, USA
iCycler	Biorad, CA, USA
iCycler iQ Optical System Software Version 3.0a	Biorad, CA, USA

2.1.7 Western Blot

TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
Triton X	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
Proteaseinhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Tris Glycin/SDS sample buffer	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
Elektrophoresekammer (Mini-Protean tetrasystem)	Biorad, Munich, Deutschland
Nitrozellulosemembran	Biostep GmbH, Jahnsdorf, Deutschland
Blottingkammer	Biorad, München, Deutschland
Elektrophorese-Glasplatten	Biorad, München, Deutschland
Ponceau-Rot	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Germany

Coomassie R 250	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Germany
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
Mouse monoclonal anti-human CD71 glycoprotein (TfR-1) AK	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA
Rabbit polyclonal anti-human ferritin AK	Abcam, Cambridge, MA, USA
Monoclonal mouse anti-rabbit GAPDH AK	HyTest Ltd., Turku, Finland
Anti-rabbit immunoglobulin G peroxidase conjugated antibody	Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME
Anti-mouse immunoglobulin G antibody	Dianowa, Hamburg, Deutschland
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific, Rockwood, USA
Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Acrylamid	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
SDS (Natriumlaurylsulfat)	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
APS (Amoniumpersulfat)	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
Glycin	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
QuantityOne	Biorad, München, Deutschland
Versa-Doc Imaging System Modell 4000	Biorad, München, Deutschland

2.2 Zellisolierung

Zur Gewinnung von primären humanen Hepatozyten wurden Leberteilresektate von neun verschiedenen Patienten verwendet. Die Nutzung des humanen Gewebes für Forschungszwecke erfolgte mit Genehmigung der Ethikkommission der Charité und nach schriftlicher Einwilligung der Patienten. Alle folgenden Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Nach Resektion wurde ein geeignetes tumorfreies Teilstück von 20 bis 40 g durch den Operateur entnommen und bei 4°C in Williams Medium E zur Zellisolierung überführt. Eine möglichst vollständige Digestion wird dabei durch die Perfusion der Gefäße mit

unten genannten Lösungen erreicht. Dazu wurden die auf der Schnittfläche freiliegenden Hauptstämme der hepatischen Gefäße über Kanülen mit der Perfusionspumpe verbunden. Die übrigen Gefäße und Gallengänge wurden, um den Perfusionsdruck zu erhöhen, mit Histoacrylkleber verschlossen. Es folgte ein 2-Schritt-Perfusionsverfahren, bei dem die erste Perfusionslösung der Entfernung des Restblutes aus dem Leberstück diente. Das Gewebe wurde dafür mit der 37°C warmen Lösung für 20 Minuten durchspült. Die Lösung enthielt 0,142 M NaCl, 6,7 mM KCl, 10 mM HEPES und 2,4 M EGTA bei einem pH von 7,4. Die zweite Perfusionslösung diente der Lockerung der Zellkontakte und wurde ebenfalls mit einer Temperatur von 37°C für 15 bis 20 Minuten rezirkulierend perfundiert. Sie enthielt 67 mM NaCl, 6,7mM KCl, 100mM HEPES, 0,5% bovines Serum Albumin, 4,8 mM CaCl₂·2H₂O und 0,02% Kollagenase P. Nach ausreichender Verdauung des Gewebes wurde die Digestion mit der modifizierten ersten 4°C kalten Perfusionslösung ohne EDTA gestoppt und anschließend mechanisch zerkleinert, um die Hepatozyten aus ihrem Verbund zu lösen. Zur Aufreinigung der Zellen zu einer reinen Hepatozytenkultur wurde die Suspension zunächst gefiltert und anschließend drei Mal zentrifugiert. Der erste Zentrifugationsschritt erfolgte bei 50 g für 5 Minuten und 4°C in Suspension mit PBS, der zweite Schritt mit 25%iger Percoll-Lösung bei 1420 g für 5 Minuten und 4°C, wobei der dritte wieder dem ersten Schritt entsprach. Es wurde jedes Mal der Überstand entfernt und das Zellpellet weiterverwendet (siehe Abbildung 3). Die Viabilität und die Zellzahl der verbliebenen Suspension wurden mit der Trypan Blau Färbung (1:40 Verdünnung) in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt.

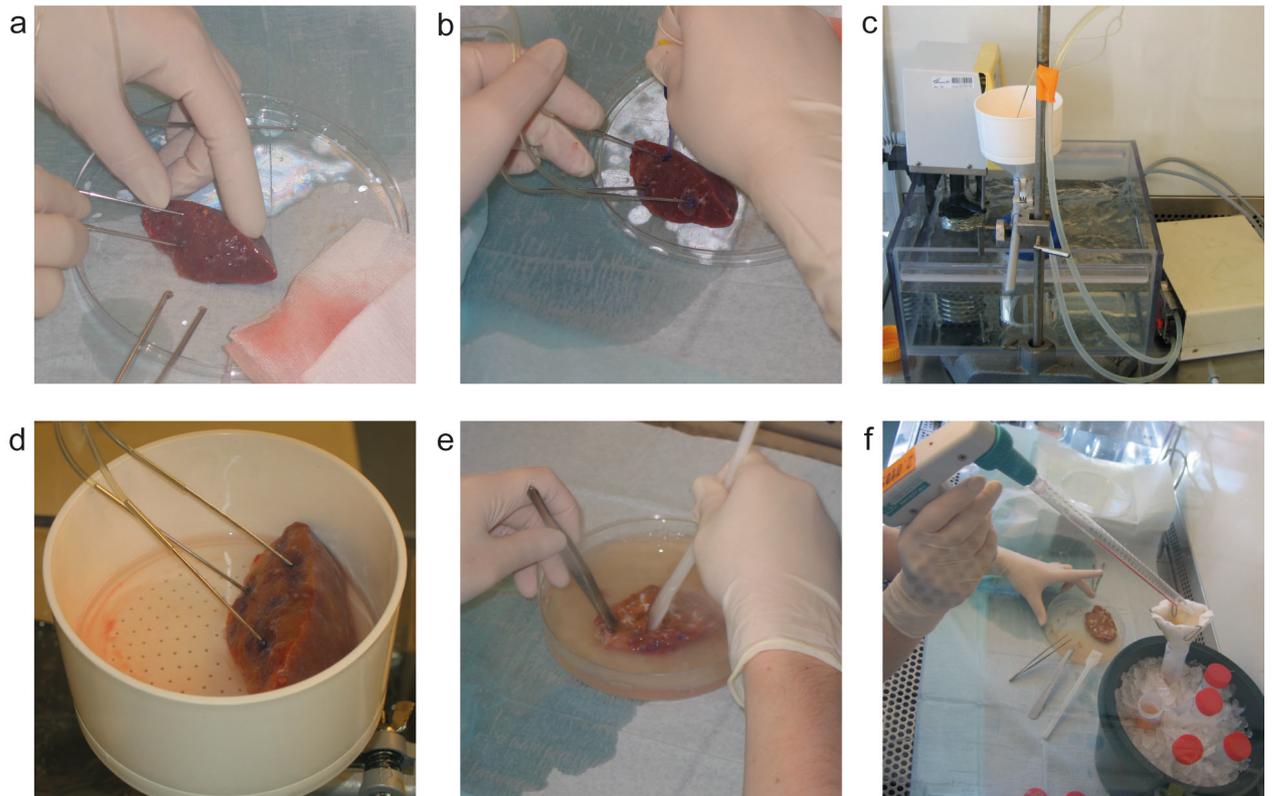


Abb. 3: Isolierung von primären humanen Hepatozyten.

Das Leberteileresektat wird kanüliert (a) und die angeschnittenen Gefäße mit Histoacrylkleber verschlossen (b). Anschließend wird es perfundiert (c, d) und die Zellen enzymatisch und mechanisch gelöst (e). Zur weiteren Aufreinigung werden die Zellen aliquotiert (f).

2.3 Zellkultur

Um die isolierten, in Suspension befindlichen Hepatozyten zu kultivieren und anschließend zu untersuchen, wurden sie in einer Konzentration von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml auf kollagenbeschichteten Platten ausgesät. Für die Beschichtung wurde jede Plattenvertiefung mit steriler Rattenkollagenlösung in einer Verdünnung von 1/500 bodendeckend befüllt und für 30 Minuten bei 36°C inkubiert. Je nach Versuch verwendete man 6-Loch-Platten mit 1×10^6 Zellen/Vertiefung oder 24-Loch-Platten mit $0,25 \times 10^6$ Zellen/Vertiefung. Als Kulturmedium wurde das Williams' Medium E mit Glutamax, versetzt mit $1 \mu\text{M}$ Insulin, 100 U/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin, $1 \mu\text{M}$ Natriumpyruvat, $15 \mu\text{M}$ HEPES, 10 % FCS und $1 \mu\text{M}$ Dexamethason/Fortecotin, verwendet. Anschließend wurden die Zellen für 6 Tage bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank kultiviert. Nach jeweils 24 Stunden wurden sie mit sterilem PBS

gewaschen und das Kulturmedium gegen frisches Medium ausgetauscht. Überstand, RNA- und Protein-Proben wurden genommen und bei -80°C für weitere Analysen gelagert.

2.4 Inkubation der Hepatozyten mit Eisenoxidpartikeln und Eisenzitat

16 bis 20 Stunden nach Kultivierung waren die Zellen auf den kollagenbeschichteten Platten adhärent, so dass sie nun zuerst gewaschen und dann markiert werden konnten. Die Zellen wurden von nun an als vier verschiedene Gruppen behandelt.

I	Negativkontrolle	native PHH
II	Positivkontrolle	mit Eisenzitat stimulierte PHH
III	markierte PHH	MPIOs
IV		SPIOs

Die Nativkontrollgruppe wurde durchgehend mit dem oben beschriebenen Kulturmedium behandelt, es wurde alle 24 Stunden erneuert. Die Gruppe der MPIO-markierten Zellen wurde für 4 Stunden mit dem Kulturmedium, versetzt mit MPIOs in einer Konzentration von 30 Partikel/Zelle (16,5 µg Eisen/ml), bei 37°C inkubiert. Nach vier Stunden Inkubation wurde die MPIO-Suspension nach dreimaligem Waschen mit PBS gegen das normale Kulturmedium ausgetauscht. Durch das Waschen wurden sowohl tote Zellen als auch nicht aufgenommene Partikel entfernt. Anschließend wurde das Kulturmedium wie bei den Nativzellen alle 24 Stunden gewechselt. Die SPIO-markierte Gruppe wurde für 16 Stunden mit einer SPIO-Konzentration von 50 µg Eisen/ml Kulturmedium bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte ein dreimaliger Waschschrift mit PBS. Die Zellen wurden dann mit Kulturmedium überschichtet und ab diesem Zeitpunkt wie die Nativkontrolle behandelt. Die Positivkontrolle wurde alle 24 Stunden mit Kulturmedium inkubiert, versetzt mit Eisenzitat in einer Konzentration von 30 µg Eisen/ml, um ein Eisenüberangebot zu simulieren. Das Eisen befand sich in einem Komplex mit einem Zitatliganden, wofür Trisodiumzitat-Dihydrat und Eisen-III-Chloridhexahydrat im Verhältnis von 10/1 gemischt wurden (60).

2.5 Morphologie der Zellen, Nachweis der Partikelinkorporation und Quantifizierung des Eisengehaltes

2.5.1 Lichtmikroskopie

Um etwaige morphologische Unterschiede der Gruppen zu dokumentieren, wurden täglich über die Dauer des Untersuchungszeitraumes repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der vier Gruppen in einer 200-fachen Vergrößerung angefertigt. Um die Aufnahme der Eisenoxidpartikel zu überprüfen, folgte eine Berliner Blau-Färbung. Dazu wurden die Zellen in *Chamber Slides* mit 4%igem Paraformaldehyd für 10 Minuten fixiert und anschließend mit -20°C kaltem Methanol für 20 Minuten überschichtet, um die Zellen zu permeabilisieren. Nun wurden sie für 20 Minuten mit 2%igem Kaliumferrocyanid in 6%iger Salzsäure inkubiert und mit Hämatoxylin gegengefärbt. Das intrazelluläre Eisen erschien blau. Die Partikelaufnahme wurde am Lichtmikroskop beurteilt.

2.5.2 Quantifizierung des Eisengehaltes

Der Eisengehalt der Hepatozyten in den verschiedenen Gruppen wurde mittels der *Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry* (CSAAS) gemessen (68). Die Probenentnahme für die quantitative Eisenbestimmung der vier Untersuchungsgruppen erfolgte jeweils am Tag 2, 4 und 6. Für die Probengewinnung wurden die Zellen aus einer 6-well-Platte mit 150µl CellLytic überschichtet und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Zellrasen mechanisch abgelöst und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Proben wurden bis zur Messung bei -80°C gelagert. Die Messungen wurden bei einer Wellenlänge von 305745 nm und einer Ofentemperatur von 2100°C durchgeführt. Zur Kalibrierung des Gerätes wurde eine Standard-Verdünnungsreihe (Eisenstandardlösung 1000 mg/L) angesetzt, gemessen und die Ergebnisse als Referenzwerte verwendet. Für eine genaue Messung mussten die Proben je nach Ausgangskonzentration mit deionisiertem Wasser verdünnt werden, um eine Extinktion unter 0,3 zu erreichen. Außerdem war es für eine homogene Partikelsuspension unbedingt erforderlich die Probe vor der Messung vorzutexten und zu resuspendieren. Alle Messungen wurden drei Mal durchgeführt und die Mittelwerte gebildet. Die Werte wurden je nach Verdünnung aufgerechnet und auf den Standard bezogen.

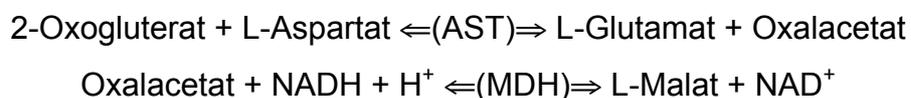
2.6 *In vitro* MRT und Phantommodell

Um zu bestimmen ab welcher Anzahl die markierten Zellen im MRT nachweisbar sind und um die Markierungseigenschaften der beiden Partikelarten bestimmen und vergleichen zu können, wurden *in vitro* MRT-Messungen mit einem Phantommodell durchgeführt. Das Phantom soll dabei ein idealisiertes Modell des menschlichen Körpers darstellen. Die Zellen wurden dabei in absteigender Konzentration im Phantommodell platziert. Um einen möglichen Fehler durch zeitabhängigen Partikelabbau oder Verlust zu vermeiden, wurden die Proben zur Bestimmung der MR-Messung direkt nach Abschluss der Markierung gewonnen. In 6-Loch-Platten kultivierte Nativzellen, SPIO- und MPIO-markierte Zellen des selben Spenders wurden nach dreimaligem Waschen mit PBS mit 0,4 ml/well Trypsin/EDTA-Lösung, welches auf 37°C angewärmt war, überschichtet und bei 37°C für 4 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die sich lösenden Zellen mechanisch weiter gelockert und dann mit 0,4 ml/well 4°C kaltem Medium resuspendiert. Die entstandene Zellsuspension wurde gesammelt, die Anzahl der vitalen Zellen mittels Trypan Blau Färbung und Neubauer-Zählkammer bestimmt und eine Verdünnungsreihe erstellt. Dabei wurden von jeder Gruppe jeweils 250000, 100000, 50000, 25000, 10000, 5000, 1000 Zellen in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Eppendorfgefäße wurden schon im Voraus mit 1 ml 1%iger Agarose, welche mit Gadolinium als Kontrastmittel in einer Konzentration von 0,2 mmol/L versetzt wurde, gefüllt. Darauf bildeten die Zellen durch Sedimentation einen Zellteppich. Als Kontrastreferenz wurden je noch eine Probe mit Öl und Wasser hinzugefügt. Alle Eppendorfgefäße wurden in Gelatine eingebettet. Zur *in vitro* MRT dienten ein 3,0 Tesla MR Scanner und eine 30 cm Ganzkörperspule. Die Messungen wurden mit einer T1-gewichteten transversalen Leberaufnahme mit Volumen Akzeleration (LAVA) Sequenz, welche eine 3D-Gradientenechosequenz mit einer auf das Abdomen hin optimierten Fettsuppression darstellt, (Repetitionszeit (TR)/Echozeit (TE): 3,464/1,6 ms; Flipwinkel (FA): 10°; Schichtdicke: 3 mm; Blickfeld (FoV): 34x32 mm; Matrixgröße: 256x256) und einer T2*-gewichteten Sequenz (Repetitionszeit (TR)/Echozeit (TE): 9700/30 ms; Flipwinkel (FA): 20°; Schichtdicke: 5 mm; Blickfeld (FoV): 30x27 mm; Matrixgröße: 256x256) durchgeführt. Das entspricht einem prinzipiell klinisch durchführbaren MRT-Messprotokoll. Die Messungen wurden mit Proben von drei unterschiedlichen Patienten durchgeführt.

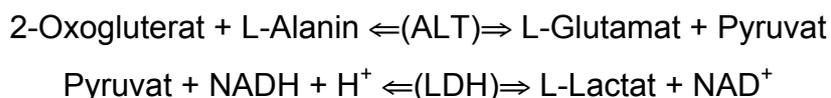
2.7 Zellschädigung, Syntheseparameter, Gesamtprotein

Als Parameter für die Zellschädigung wurde die Aktivität der intrazellulären Enzyme Aspartat-Aminotransferase (AST) und Alanin-Aminotransferase (ALT) am Tag 3 (24h nach abgeschlossener Markierung), 4, 5 und 6 im Kulturmedium bestimmt. Die Enzymaktivität korreliert dabei positiv mit der Zellschädigung, da beschädigte Hepatozyten die intrazellulären Enzyme ALT und AST freisetzen. Als Syntheseparameter wurde der dem Harnstoffzyklus entstammende Harnstoff verwendet. Das Kulturmedium wurde abgenommen und zur Aufreinigung bei 2000 rpm für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Bis zur weiteren Analyse wurde der Überstand bei -80°C aufbewahrt. Mittels eines Photometers wurde dann durch eine enzymvermittelte Reaktion die Konzentrationsänderung von NADH (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid) durch eine Absorptionsminderung in Abhängigkeit zur Zeit gemessen. Die Absorptionsänderung und damit auch die Konzentrationsänderung von NADH sind dabei proportional zur Konzentrationsänderung des jeweiligen Eduktes. Durch den Vergleich mit einem Standard kann so also auf die Konzentration von AST, ALT oder Harnstoff in der jeweiligen Probe geschlossen werden.

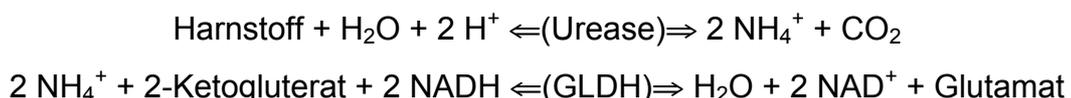
Testprinzip der AST-Messung:



Testprinzip der ALT-Messung:



Testprinzip der Harnstoffmessung:



Als Detektions-Kit wurden für die Transaminasen NobiFlow GOT-IFCC, bzw. GPT-IFCC, für den Harnstoff NobiFlow Harnstoff-UV verwendet. Die Extinktionswerte wurden auf eine Standardreihe bekannter Konzentration bezogen, um so die Konzentrationen

berechnen zu können. Diese Werte wurden wiederum auf die Werte des Gesamtproteins bezogen.

Das Gesamtprotein wurde am Tag 1, 2, 4 und 6 von jeder der vier Gruppe bestimmt. Dazu wurden die Zellen zunächst drei Mal mit PBS gewaschen und anschließend mit 300 µl CellLytic für 20 Minuten unter Schüttelbewegung inkubiert. Gestoppt wurde die Reaktion mit 300 µl PBS. Nun wurden die Zellen zusätzlich mechanisch gelockert und der Inhalt jeder Plattenvertiefung in jeweils ein Eppendorfgefäß überführt. Dieses Zelllysate wurde dann bei 12000 rpm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde daraufhin in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Daraus lässt sich über Extinktion im Photometer die Konzentration mit Hilfe eines BCA-Kits bestimmen. Alle Messungen erfolgten in Triplikaten von acht verschiedenen Spendern.

2.8 ROS

Um zu bestimmen ob die Zellen durch das Markierungsverfahren einem vermehrten oxidativen Stress ausgesetzt waren, wurden die Sauerstoffradikale (ROS) in den verschiedenen Proben gemessen. Die Messung erfolgte am Tag 1, 2, 4 und 6 mit 2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat (H₂DCF-DA) und beruht auf folgendem Prinzip: Durch zelleigene Esterase wird von dem Präfluorochrom die Acetat-Gruppen abgespalten und anschließend durch etwaige ROS in der Zelle oxidiert. Durch die Oxidation reagiert es zu einem Fluorochrom und ist dann im Photometer nachweisbar. Die Stärke der Fluoreszenz ist proportional zum umgesetzten H₂DCF-DA und damit zur ROS-Konzentration in der Zelle. Die Zellen jeder Gruppe der 24-Loch Platten wurden drei Mal mit PBS gewaschen und anschließend mit dem H₂DCF-DA in einer Konzentration von 10µM für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wiederum drei Mal mit PBS gewaschen und daraufhin mit 150 µL Lysepuffer, bestehend aus 0,1 M Kaliumdihydrogenphosphat, 0,1 mM EDTA, 0,1% Triton-X 100, überdeckt und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Es wurden 150 µL PBS dazugegeben, die Zellen mechanisch gelöst und in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Durch Zentrifugation bei 12000 g bei 4°C für fünf Minuten wurde die Suspension aufgereinigt. Der Überstand wurde in eine 96-Black-well-Platte überführt, worin daraufhin eine Fluoreszenzmessung erfolgte (Exzitation 492 nm, Emission 530 nm). Um eine Verfälschung der Messwerte durch etwaige Hintergrundstrahlung, ausgehend von den Partikeln oder dem Medium, zu verhindern, wurde die Differenz der Fluoreszenzwerte der gemessenen Werte von denen einer Negativkontrolle ohne Zusatz von H₂DCF-DA gebildet. Zusätzlich wurden

die Werte auf das Gesamtprotein der jeweiligen Probe bezogen (Bestimmung des Gesamtproteins s.o.) und auf den Wert des zweiten Tages der Negativkontrolle genormt. Alle Messungen erfolgten in Triplikaten von drei verschiedenen Spendern.

2.9 Quantitative Real-Time-PCR

Zur Bestimmung des Transkriptionsproduktes von TfR-1 und Ferritin wurde eine quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) durchgeführt. Die Gesamt-RNA (Ribonukleinsäure) wurde aus 2×10^6 Zellen jeder Gruppe an Tag 1, 2, 4 und 6 isoliert.

2.9.1 Isolierung der RNA

Zur Isolierung der RNA war eine zehnmütige Inkubation der Zellen mit 0,5 ml Trizol/Vertiefung auf Eis mit anschließender mechanischer Lösung der Zellen und Transfer in ein RNase-freies 1,5 ml Eppendorfgefäße erforderlich. Anschließend wurde in jedes Eppendorfgefäß 0,2 ml Chlorophorm hinzugegeben, gründlich durchmischt und bei 15-30°C für 2-3 Minuten inkubiert. Als nächstes wurden die Proben bei 12000 g für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Dabei bildeten sich drei Phasen, eine obere wässrige Phase, eine mittlere Interphase und eine untere Trizolphase. Die wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt, der Rest wurde verworfen. Dabei darf keine Vermischung der Phasen stattfinden. In die neuen Röhrchen wurden nun jeweils 0,5 ml Isopropanol zugesetzt und die Phasen durchmischt. Bei diesem Schritt wird die RNA präzipitiert. Die Proben wurden nun für eine Stunde bei 4°C inkubiert und danach bei 10000 g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Es bildete sich ein Pellet, der Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Das Pellet wurde mit 1 ml 75%igem Ethanol gemischt und anschließend bei 7500 g bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde möglichst komplett abgesaugt, der Rest der Flüssigkeit durch Lufttrocknung entfernt. Zum Pellet wurden 50 µl DEPC-Wasser gegeben und resuspendiert bis sich das Pellet löste. Um die Konzentration der RNA zu bestimmen, wurde eine photometrische Messung (NanoDrop) durchgeführt. Gleichzeitig wurde die Reinheit durch das Absorptionsverhältnis A₂₆₀/A₂₈₀ bestimmt.

2.9.2 Reverse Traskriptase der RNA

Mittels RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion) wurde die RNA in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben (TaqMan High Capacity cDNA Archive Kit). Dazu wurde ein Probenansatz auf folgende Weise erstellt:

	Volumen/Reaktion in μl
10x RT Buffer	2,0
25x dNTP Mix (100mM)	0,8
10x RT Random Primers	2,0
MultiScribe Reverse Transkriptase	1,0
Nuklease-freies Wasser (DEPC-Wasser)	4,2
Volumensumme der Reaktion	10

Zu diesem Ansatz wurde 1 μg RNA, gelöst in 10 μl DEPC-Wasser, gegeben. Das Gemisch wurde kurz zentrifugiert, um die Flüssigkeit am Eppendorfgefäßgrund zu sammeln, anschließend wurde die RNA im ThermalCycler umgeschrieben. Verwendet wurde folgendes Protokoll:

Schritt	Temperatur in $^{\circ}\text{C}$	Zeit
1	25	10 Minuten
2	37	2 Stunden
3	85	5 Sekunden
4	4	Erhaltungstemperatur bis zum Ende

Die cDNA wurde bei -80°C bis zur weiteren Messung gelagert.

2.9.3 Real-Time-PCR

Die cDNA wurde mit TaqMan Universal Master Mix, Assay human TfR-1 (assay ID: 9Hs99999911_m1), Assay human ferritin (assay ID: Hs01694011_s1), und TaqMan GAPDH Control Reagents (human) quantifiziert. Dazu wurden die Proben für TfR und Ferritin wie folgt angesetzt und auf 96-Loch-Platten pipettiert:

TaqMan Universal PCR Master Mix	11 μl
Nuklease-freies Wasser (DEPC-Wasser)	4 μl
Assay (TfR bzw. Ferritin)	1 μl
cDNA	5 μl

Die Proben für GAPDH stellten sich wie folgt zusammen:

TaqMan Universal PCR Master Mix	11 µl
Nuklease-freies Wasser (DEPC-Wasser)	4 µl
Assay (GAPDH)	
Forward Primer	0,5 µl
Reverse Primer	0,5 µl
Sonde	0,5 µl
cDNA	5 µl

Nach dem Verschließen der Gefäße und Sammeln der Flüssigkeit am Gefäßgrund mittels kurzer Zentrifugation erfolgte die Quantifikation mit dem iCycler iQ Real Time PCR System nach folgendem Protokoll.

Zyklen	Wiederholungen	Schritt	Zeit in Sekunden	Temperatur in °C
1	1	1	360	94
2	50	1	15	94
		2	40	60

Mit dem iCycler iQ Optical System Software Version 3.0a wurden die Ergebnisse analysiert. Der C_t -Wert des Zielgens wurde auf den von GAPDH als gleichmäßig exprimiertes Haushaltsgen bezogen ($2^{\Delta\Delta C_t}$) und auf den Wert des zweiten Tages der Nativkontrolle normalisiert. Dieses musste aus technischen Gründen durchgeführt werden, verändert aber die Ergebnisse nicht (Daten nicht aufgeführt). Die Messung wurde in Triplikaten zwei bis drei Mal durchgeführt.

2.10 Western Blot

Zur Bestimmung des Translationsprodukts von TfR-1 und Ferritin wurden Western Blot-Messungen durchgeführt. Von jeder Gruppe wurden dazu Proteinproben von 2×10^6 Zellen an Tag 1, 2, 4 und 6 verwendet.

2.10.1 Isolierung des Proteins

Nachdem die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen waren, wurde ein Lysepuffer, bestehend aus 20 mmol/L Tris (pH 7,5), 150 mmol/L Natriumchlorid, 1 mmol/L Ethylendiamintetraacetat (EDTA), 1 mmol/L Ethylenglycol-bis-2-aminoethylether-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA), 1% Triton, 1 mmol/L Phenylmethylsulfonylfluorid und einem Proteaseinhibitor Cocktail, hinzugegeben. Dabei wurden die Proteine aus den Zellen gelöst und freigesetzt. Nach 20 Minuten Inkubation auf Eis wurde die Suspension nach mechanischem Lösen in ein Eppendorfgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Mittels BCA (s.o.) wurde der Gesamtproteingehalt bestimmt. 50 µg Protein wurden dann im gleichen Volumenverhältnis mit Probepuffer (Serva Tris Glycin/SDS sample buffer und Mercaptoethanol im Verhältnis 100:1) für 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Dadurch wurden die Proteine denaturiert. Das SDS sorgt für eine negative Ladung der Proteine.

2.10.2 Elektrophorese

Die Proteine wurden auf ein 15%iges SDS-PAGE-Gel aufgetragen und elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt.

- Trenngel 15%, 1,5 mm

	2 Gele
AquaBiDest	4,8 ml
30% Acrylamid	6 ml
Trenngel-Puffer	3,8 ml
10% SDS	150 µl
TEMED	30 µl
10% APS	75 µl

- Sammelgel 5%, 1,5mm

	2 Gele
AquaBiDest	6,75 ml
30% Acrylamid	1,215 ml
Sammelgel-Puffer	2,85 ml
10% SDS	112,5 µl
TEMED	28,5 µl

10% APS	85,5 µl
---------	---------

Für den Elektrophoresepuffer wurden 25 mM Tris (pH 8,3-8,8), 192 mM Glycin und 0,1% SDS in Wasser gelöst. Zur Zuordnung des Molekulargewichts wurde ein Protein-Marker (SERVA Recombinant SDS PAGE Protein Marker) beigeetzt. Die Elektrophorese lief während der Sammelgelphase mit 60 V, während der Trenngelphase mit 100 V Spannung. Nach ausreichender Auftrennung wurde die Elektrophorese gestoppt.

2.10.3 Blotting

Blotting bezeichnet das Verfahren des Proteintransfers auf eine Membran. Die Proteine wurden mittels des *Blotting*-Nassverfahrens aus dem SDS-PAGE-Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Als Blotting-Puffer wurde eine Lösung aus 10% Elektrophoresepuffer, 20% Methanol und 70% Wasser verwendet. Geblottet wurde für 60 Minuten bei 4°C mit 100 V. Zur Evaluation des Blottingergebnisses wurden die Ponceau-Rot-Färbung, sowie die Coomassie-Färbung durchgeführt.

2.10.4 Darstellung des Proteins

Um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern, wurde die Membran mit 5%iger Milchpulverlösung (Lösungsmittel PBS-T) für 90 Minuten bei 4°C und unter kontinuierlicher Bewegung geblockt. Als primäre Antikörper wurden *mouse monoclonal anti-human CD71 glycoprotein (TfR-1)*, *rabbit polyclonal anti-human ferritin* und *monoclonal mouse anti-rabbit GAPDH* und als sekundäre Antikörper *anti-rabbit immunoglobulin G peroxidase conjugated antibody* und *anti-mouse immunoglobulin G antibody* verwendet. Sie wurden jeweils in einer Verdünnung von 1:5000 für mindestens 2 h bei Bewegung und 4°C inkubiert. Nach jedem Inkubationsschritt folgten vier Waschgänge mit PBS-T für jeweils 15 Minuten, um die nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Die Bindung der Antikörper und somit die Menge des spezifischen Proteins wurden nun mittels Chemolumineszenz bestimmt. Dazu wurde ECL-Reagenz auf die Membranen gegeben und die entstehende Fluoreszenz mittels VersaDoc detektiert und durch Densometrie mit Hilfe des Programms QuantityOne quantifiziert. Dabei ist die Stärke der Fluoreszenz proportional zur jeweiligen Proteinmenge. Um eine relative Vergleichbarkeit zu erreichen, wurden die Proteinwerte der zu untersuchenden Proteine auf ein Vergleichsprotein mit einheitlicher Expression bezogen, in dem Fall GAPDH. Die

Messungen wurden mit Proben aus drei verschiedenen Experimenten drei Mal wiederholt.

2.11 Statistische Analyse

Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) oder als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargelegt. Die statistische Analyse (Wilcoxon Test) wurde mit Microsoft Excel für Mac 2008 (V11.3.6, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) durchgeführt. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als signifikant festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Zellisolierung

Für die Studie wurden primäre humane Hepatozyten aus Leberteilresektaten von neun verschiedenen Patienten gewonnen. Ursache für die Leberteilresektionen waren bei vier Patienten kolorektale Lebermetastasen, bei zwei Patienten ein Hämangiom, bei anderen zwei Patienten ein cholangiozelluläres Karzinom und bei einem Patienten ein Klatskin-Tumor. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug $56,4 \pm 12,5$ Jahre und lag im Bereich von 35 bis 72 Jahren, die mittlere Viabilität der Hepatozyten betrug nach Isolierung $75 \pm 8,9\%$ im Bereich von 57 bis 84%.

Isolierung	Diagnose	Alter in Jahren	Viabilität in %
1	Hämangiom	35	82
2	Kolorektale Metastase	68	82
3	Cholangiozelluläres Karzinom	45	76
4	Klatskin-Tumor	46	72
5	Cholangiozelluläres Karzinom	60	84
6	Kolorektale Metastase	72	57
7	Hämangiom	53	75
8	Kolorektale Metastase	67	81
9	Kolorektale Metastase	62	66
Mittelwert		56,4	75,0
Standardabweichung		12,5	8,9

3.2 Markierung

Sowohl die Markierung mit SPIOs als auch mit MPIOs war möglich. In der qualitativen Auswertung der Partikelaufnahme, der Berliner Blau-Färbung, stellten sich die Partikel in der Gruppe der für 16 Stunden mit SPIO-markierten Zellen blau dar und waren im gesamten Zytoplasma der Hepatozyten verteilt. Da die MPIOs Polymer-ummantelt sind und der Eisenkern daher nicht frei liegt, konnte das Eisen nicht auf diese Weise angefärbt werden. Die Partikel sind allerdings auch ohne spezifische Anfärbung auf

Grund ihrer Größe deutlich abzugrenzen. Nach 4 Stunden Inkubationszeit mit den MPIOs waren die Partikel im Zytoplasma der Hepatozyten perinukleär angeordnet nachzuweisen. Die Partikel lagen sowohl einzeln als auch in Clustern vor (siehe Abbildung 4).

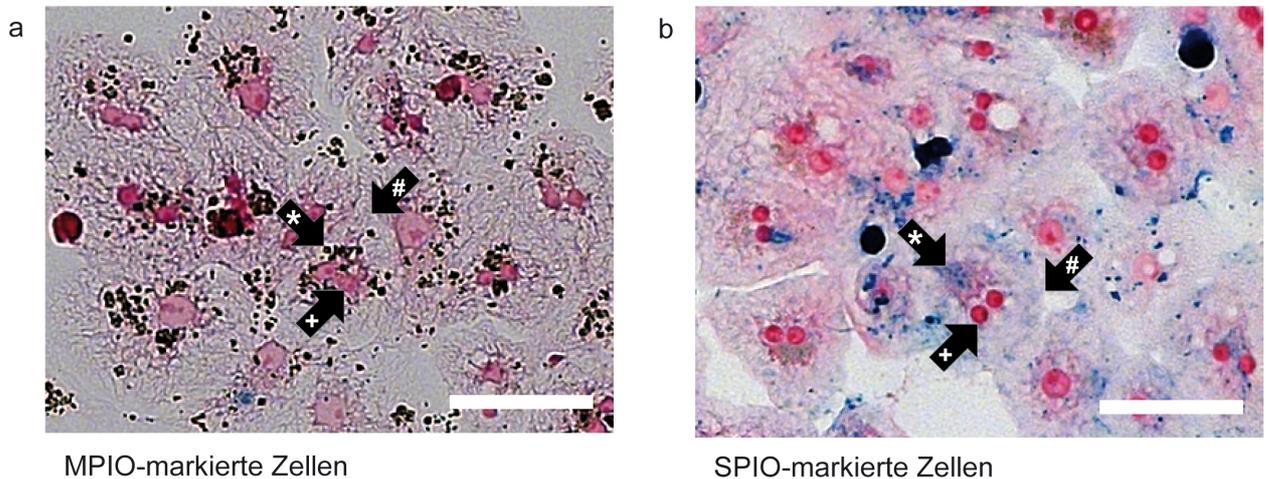


Abb. 4: Histologische Darstellung der Partikel

Bei 200-facher Vergrößerung sind die MPIOs ohne Färbung klar perinukleär zu erkennen (a), die SPIO stellen sich mit der Berliner Blau-Färbung im Zytoplasma dar (b). Skala: 50 µm, Pfeile: (#) Zellmembran, (+) Nukleus, () MPIO bzw. SPIO)*

3.3 Morphologie

Es ließen sich lichtmikroskopisch zwischen der Nativgruppe und den beiden mit Partikeln markierten Gruppen keine morphologischen Unterschiede der Zellen ausmachen. Die primären humanen Hepatozyten behielten über die Beobachtungsdauer ihre typische polygonale Form mit granulärem Zytoplasma bei, außerdem wiesen sie durchgehend ein konfluentes Adhäsionsverhalten auf. Die mit Eisenzitat behandelte Positivkontrolle zeigte eine zeitlich progrediente Ausdünnung des Zellrasens. Die Zellarchitektur war zunehmend gestört (siehe Abbildung 5).

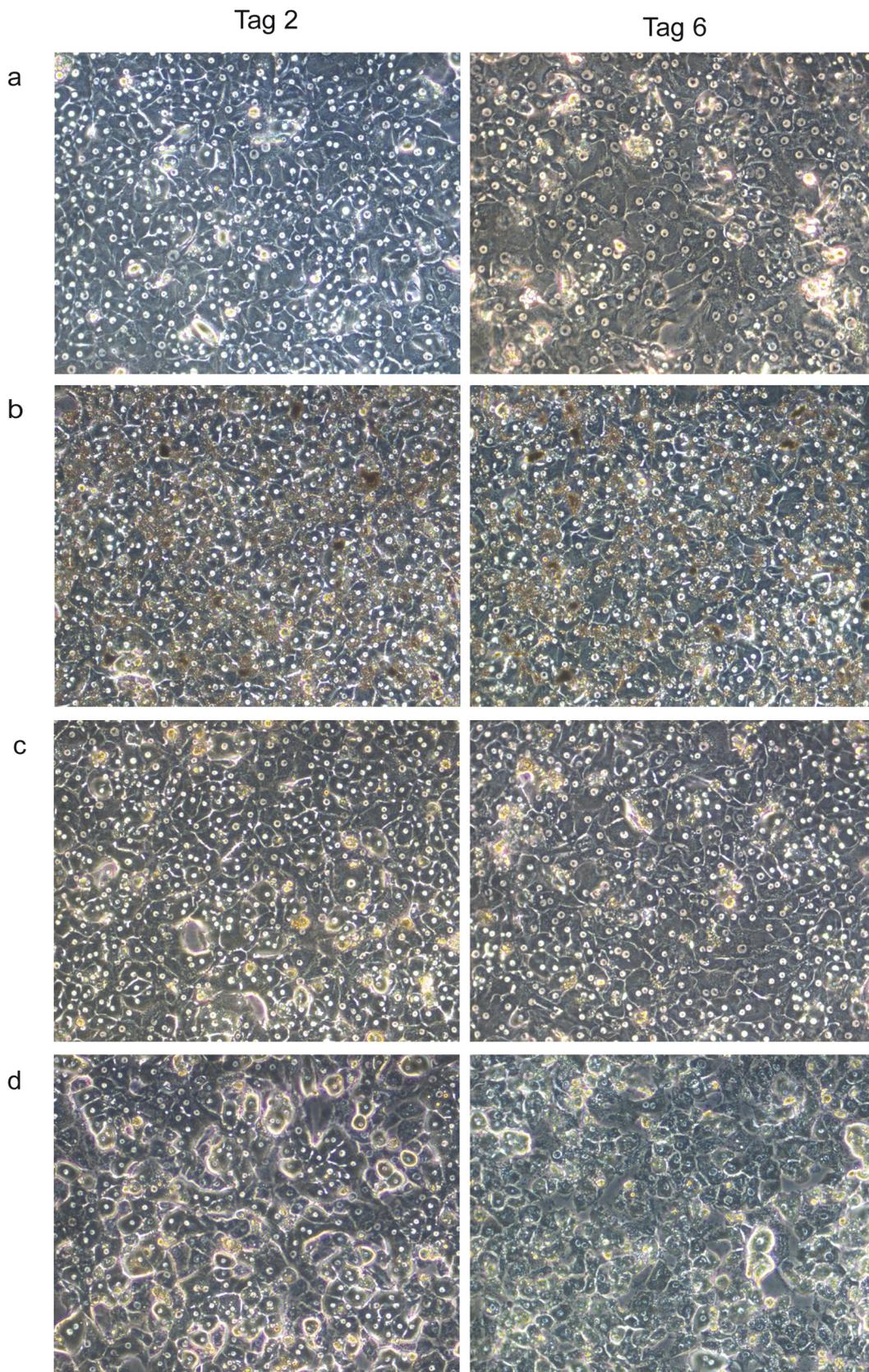


Abb. 5: Lichtmikroskopische Aufnahmen von primären humanen Hepatozyten

Exemplarische Darstellung der PHH am Tag 2 und 6 in 200-facher Vergrößerung. Die nativen Zellen (a), die MPIO-markierten Zellen (b) und die SPIO-markierten Zellen (c) weisen im Gegensatz zu den Eisen-stimulierten Zellen (d) am 6. Tag keine sichtbare Zellschädigung auf.

3.4 Eisengehalt

Bei der quantitativen Auswertung der Eisenaufnahme mit der CSAAS wiesen die nativen Hepatozyten der Negativkontrolle am zweiten Tag einen Eisengehalt von $1,4 \pm 0,7$ pg Eisen/Zelle auf, welcher über den Beobachtungszeitraum hinweg konstant blieb. Die mit Eisenzitrat kultivierten Hepatozyten der Positivkontrolle zeigten mit $2,1 \pm 1,5$ pg Eisen/Zelle bereits am Tag 2 einen höheren Eisengehalt als die Negativkontrolle. Der Gehalt stieg am Tag vier auf $9,4 \pm 4,9$ pg Eisen/Zelle und am Tag 6 bis auf $10,7 \pm 7,1$ pg Eisen/Zelle weiter an. Der Eisengehalt der MPIO-markierten Gruppe hingegen blieb mit den Werten $25,7 \pm 10,4$ pg Eisen/Zelle am Tag 2 und $23,0 \pm 4,9$ pg Eisen/Zelle am Tag 4, sowie $28,0 \pm 9,6$ pg Eisen/Zelle am Tag 6 über den Beobachtungszeitraum stabil. SPIO-markierten Zellen erreichten einen Eisengehalt von $21,4 \pm 13,2$ pg Eisen/Zelle am Tag 2, $16,6 \pm 13,5$ pg Eisen/Zelle am Tag 4 und $17,4 \pm 13,9$ pg Eisen/Zelle an Tag 6. Durch die Markierung der Zellen mit den beiden unterschiedlichen Kontrastmitteln ließ sich ein vergleichbarer Eisengehalt der Zellen erreichen, allerdings war die Markierungsgeschwindigkeit der MPIOs vier mal höher, als die der SPIOs. Um die gleiche Eisenbeladung der Zellen zu erreichen, mussten die MPIOs vier, die SPIOs 16 Stunden inkubiert werden. Die Markierung der mikroskaligen Eisenpartikel blieb über den Beobachtungszeitraum stabil, während die Werte der SPIO-Gruppe auf eine Eisenabnahme hindeuteten. Auffallend war auch die große Standardabweichung der SPIO-markierten Zellen (siehe Abbildung 6).

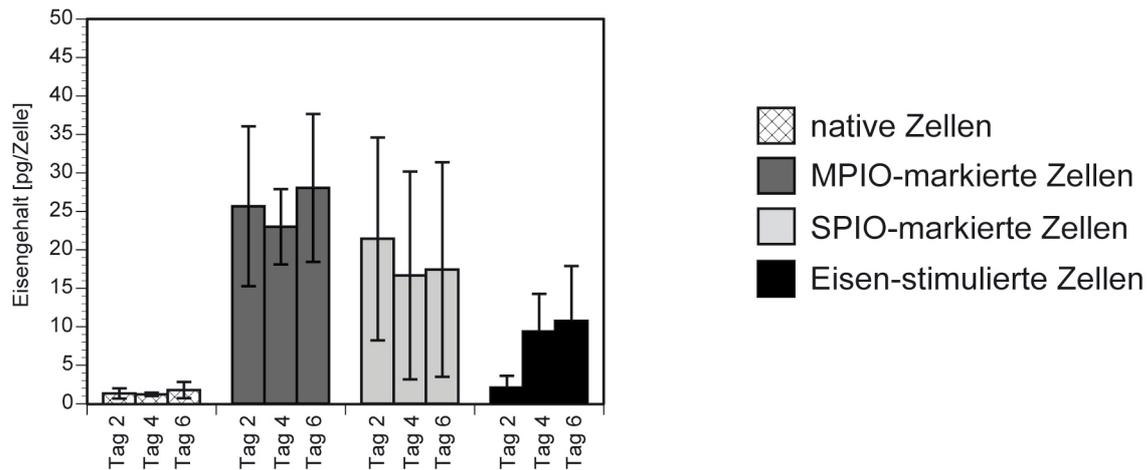


Abb. 6: Eisengehalt der Zellen in Kultur

Der Eisengehalt der markierten und unmarkierten Zellen wurde mit Hilfe von CSAAS bestimmt. Das Gesamteisen der markierten Zellen zeigt im Verlauf des Beobachtungszeitraumes keine signifikante Änderung. Besonders große Standardabweichungen (SD) und eine Tendenz zum Eisenverlust sind bei der SPIO-Gruppe zu beobachten.

3.5 In vitro MRT

Beide Kontrastmittel-markierten Zellgruppen waren in der 3,0 Tesla MRT im Phantommodell detektierbar. Sowohl in der T1- als auch in der T2*-Wichtung wiesen die Partikel eine deutliche Signalauslöschung im Vergleich zum simulierten Hintergrundkontrast des Phantoms auf. Die Signalauslöschung zeigte eine positive Korrelation zur Partikelmenge und außerdem eine Abhängigkeit von der Beschaffenheit der Partikel. Die MPIO-markierten Zellen wiesen bei der Messung mit T1-gewichteten LAVA Sequenzen schon bei einer Anzahl von 50.000 Zellen eine klar sichtbare Signalauslöschung auf. Um ein vergleichbares Ergebnis zu erzielen, war die fünffache Menge, also eine Anzahl von 250.000 SPIO-markierter Zellen, notwendig. Auch bei der T2*-gewichteten MR-Messung waren die MPIOs bei geringerer Zellzahl als die SPIOs zu detektieren. Die Partikel waren trotz gleichem Eisengehalt in den Zellen schon bei 10.000 Zellen deutlich sichtbar. Die SPIO-markierten Zellen benötigten eine höhere Zellansammlung von 50.000 Zellen, um eine vergleichbare Detektion im MRT zu ermöglichen. Die Nativzellen als Negativkontrolle verursachten keine detektierbare Signalauslöschung im MRT (siehe Abbildung 7).

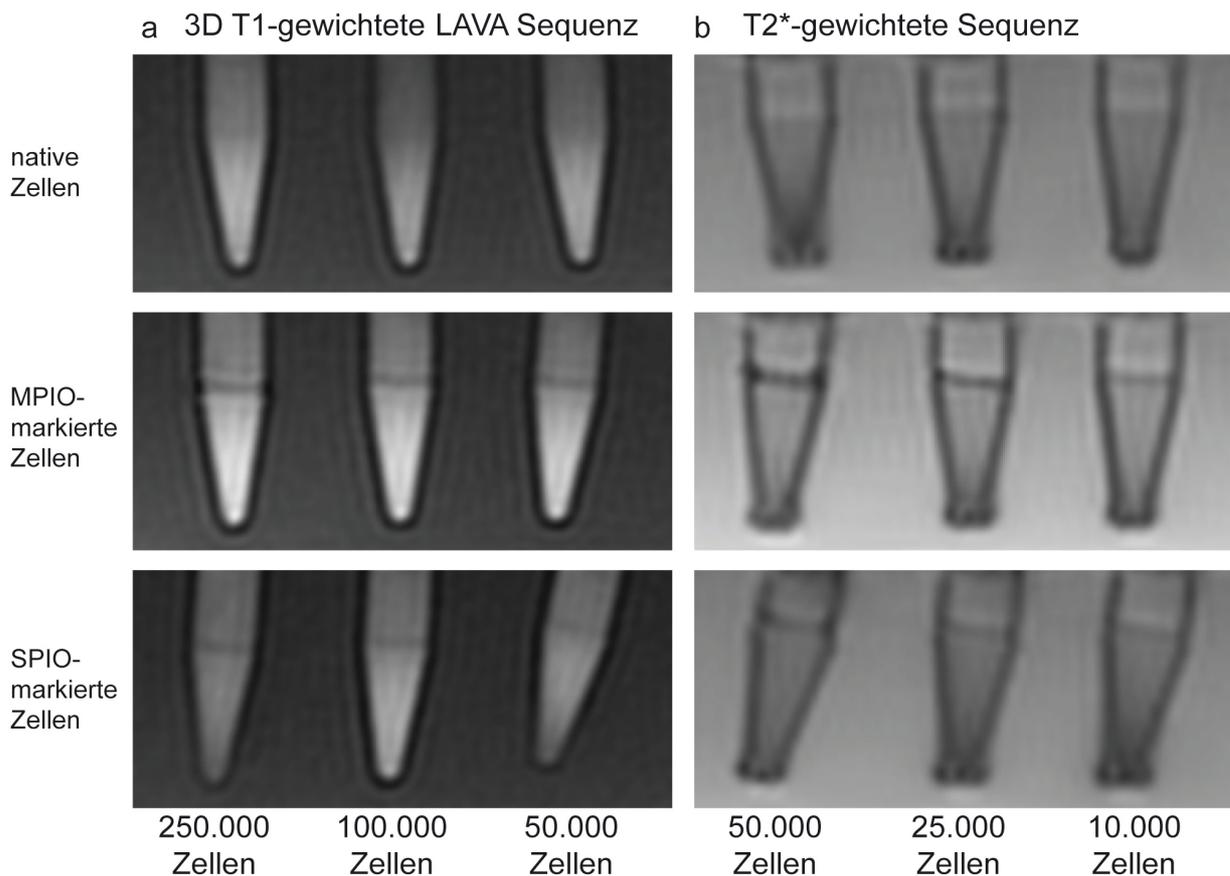


Abb. 7: In vitro MRT

Native Zellen, MPIO- und SPIO-markierte Zellen wurden in Agarose gebettet im 3,0 Tesla MRT in der T1-Wichtung (a) und der T2*-Wichtung (b) dargestellt. MPIO-markierte Zellen führten zu einer stärkeren Signalauslöschung als SPIO-markierte Zellen.

3.6 Zellschädigung und Syntheseparameter

Nach der Markierung der Zellen mit den Eisenoxidpartikeln waren weder bei der MPIO- noch bei der SPIO-Gruppe signifikant höhere Schädigungsparameter im Vergleich zu den Nativzellen festzustellen. Die ALT-Konzentration im Medium blieb bei den Nativzellen über den Beobachtungszeitraum weitestgehend konstant. Die MPIO- und SPIO-markierten Zellen unterschieden sich darin nicht signifikant von der Nativkontrolle. Die Positivkontrolle zeigte ab Tag 3 signifikant erhöhte ALT-Werte und sie entwickelten sich bis zum Tag 6 steigend bis auf das 5,5-fache des Ausgangswertes der Nativgruppe. AST hatte bei der nativen und den Partikel-markierten Gruppen die höchste Konzentration im Medium am Tag 3 und nahm im Laufe der Kultivierung leicht ab. Die mit Eisenziträt stimulierten Zellen hatten vom Tag vier an einen signifikant

erhöhten AST-Wert, welcher bis Tag 6 noch deutlich anstieg und den etwa dreifachen Wert des Ausgangswertes der Nativkontrolle erreichte. Auch wenn die Werte der mit Partikeln markierten Gruppen sich nicht signifikant untereinander unterschieden, war die Tendenz zu sehen, dass die Werte der SPIO-Gruppe im Vergleich zu den Werten der MPIO-Gruppe leicht erhöht waren. Die Harnstoff-Konzentration blieb über den Beobachtungszeitraum sowohl bei den Nativzellen als auch bei den MPIO-markierten Zellen weitestgehend konstant. Die Werte der SPIO-markierten Zellen stiegen verglichen mit der MPIO-Gruppe am Tag 4 und 5 signifikant an. Auch die Positivkontrolle zeigte einen Anstieg und hatte ab Tag 4 eine zu den Nativzellen signifikant erhöhte Harnstoff-Konzentration im Medium (siehe Abbildung 8).

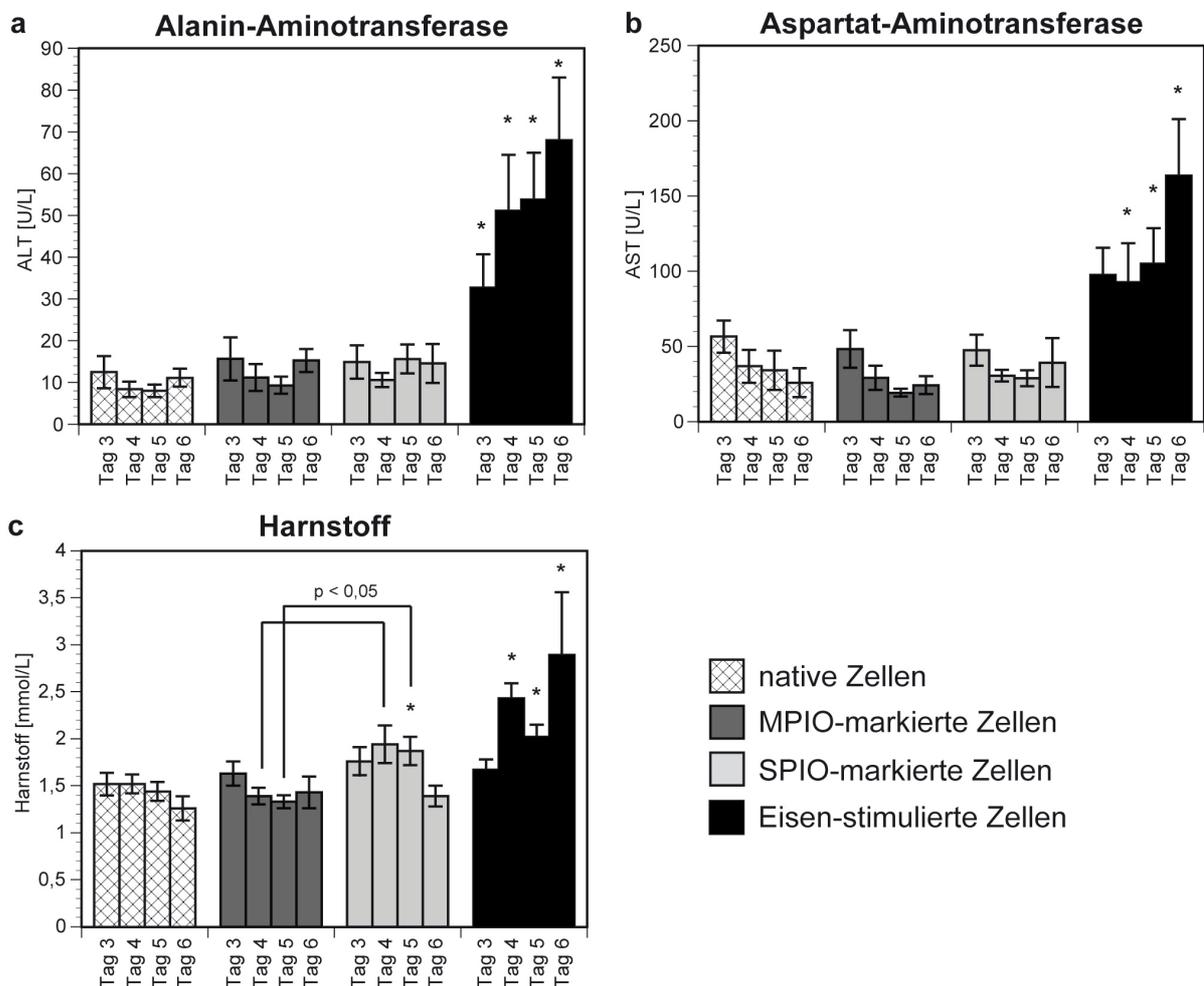


Abb. 8: Zellschädigung und Syntheseleistung

Zellschädigungs- (a, b) und Syntheseparameter (c) der markierten Zellen und der Kontrollgruppen mit SEM. Die Werte wurden auf das Gesamtprotein der Probe

bezogen. Sowohl die Werte der markierten als auch der Eisen-stimulierten Zellen wurden mit denen der Nativgruppe zum gleichen Zeitpunkt verglichen (* $p < 0,05$). Signifikante Abweichungen gab es bei den Zellschädigungsparametern der Eisen-stimulierten Zellen und bei den Syntheseparametern der SPIO-markierten und Eisen-stimulierten Zellen.

3.7 ROS

Betrachtet man den zeitlichen Verlauf der gemessenen ROS-Werte aus der Gruppe der nativen Zellen, ist ein leichter Abfall festzustellen. Der Wert war am Tag 2 am höchsten und sank leicht aber kontinuierlich bis Tag 6 ab. Die MPIO-markierten Zellen verhielten sich ähnlich. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen, was für keine vermehrte ROS-Entwicklung der MPIO-markierten Zellen spricht. Die ROS-Werte der SPIO-markierten Zellen zeigten hingegen signifikant höhere Ergebnisse am Tag 2 und 4 im Vergleich zu der Gruppe der MPIO-markierten Zellen und am Tag 2 im Vergleich zu der Nativgruppe. Am Tag 2 war der Wert 1,4x so hoch wie der vergleichbare Wert der Negativkontrolle zur selben Zeit. Die ROS-Werte der mit Eisenzitrat stimulierten Zellen der Positivgruppe wiesen besonders am Tag 4 und 6 einen Anstieg und auch an diesen beiden Tagen signifikante Unterschiede im Vergleich zu der Negativkontrollgruppe auf. Am Tag 6 war der Wert doppelt so hoch wie der vergleichbare der Nativzellen (siehe Abbildung 9).

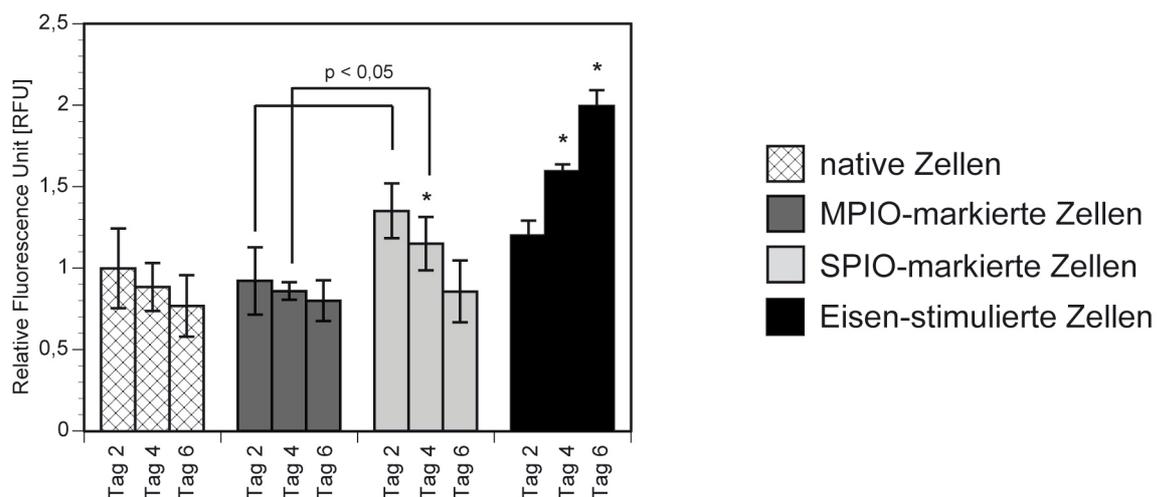


Abb. 9: Reaktive Sauerstoffspezies

Die ROS-Entwicklung der markierten und Eisen-stimulierten Zellen wurde in RFU (relative fluorescence unit) mit SD dargestellt und sowohl auf den jeweiligen

*Gesamtproteinwert als auch auf den RFU-Wert der Nativgruppe am Tag 2 normalisiert. Sowohl die Werte der markierten als auch der Eisen-stimulierten Zellen wurden mit denen der Nativgruppe zum gleichen Zeitpunkt verglichen (* p < 0,05). Eine vermehrte ROS-Entwicklung wurde sowohl bei den SPIO-markierten Zellen als auch bei den Eisen-stimulierten Zellen beobachtet.*

3.8 Ferritinexpression

Zur Untersuchung der Auswirkungen der Markierung der Zellen auf ihren Eisenstoffwechsel wurden die Transkription und die Translation von Ferritin in den primären humanen Hepatozyten der vier verschiedenen Gruppen analysiert. Die nativen Zellen zeigten keine Änderung der Menge an Ferritin-mRNA während des Beobachtungszeitraums. Die Ferritin-Proteinkonzentration stieg am Tag 2 leicht an, um dann am Tag 4 auf das 0,8-fache und am Tag 6 auf das 0,6-fache des Ausgangswertes zu fallen. Die MPIO-markierten Zellen verhielten sich vergleichbar, nach der Markierung mit den mikroskaligen Eisenoxidpartikeln ließ sich keine Erhöhung der Ferritin-mRNA nachweisen. Das Translationsprodukt stieg zunächst am Tag 2 leicht an und fiel am Tag 4 und 6 auf ähnliche Weise wie die Nativkontrolle ab. Die mit Eisenzitrat stimulierten Zellen der Positivkontrolle verhielten sich anders. Am Tag 2 stieg die Menge der mRNA zunächst leicht an. Am 4. Tag erhöhte sie sich jedoch auf das 20,5-fache des vergleichbaren Wertes der Negativkontrolle, um schließlich am Tag 6 drastisch auf das 406-fache anzusteigen. Tag 4 und 6 unterschieden sich damit signifikant von der Nativgruppe. Auch die Proteinkonzentration erhöhte sich deutlich, jedoch nicht auf vergleichbar hohe Art und Weise. Am Tag 2 war schon die 1,4-fache Menge des Proteins wie in der Negativkontrolle nachzuweisen, am Tag 4 und 6 das 4,1- und 4,0-fache. Auch hier ist ein signifikanter Unterschied zur Nativgruppe gegeben. Die Gruppe der Leberzellen, die mit SPIOs markiert wurden, zeigten bei der mRNA-Menge am Tag 4 und Tag 6 eine Abweichung nach oben zur Nativgruppe. Der Anstieg ist zwar deutlich geringer als bei der Positivkontrolle, gleicht diesem jedoch im Prinzip. Die Proteinmenge der SPIO-Gruppe war am Tag 4 und 6 signifikant höher als die Werte der MPIO-Gruppe zur selben Zeit. Auch hier erinnerte der Anstieg an die Werte der mit Eisen-stimulierten Zellen (siehe Abbildung 10).

3.9 Transferrin-Rezeptorexpression

Ob die Markierung der Zellen Auswirkungen auf die Expression des Transferrin-Rezeptors-1 hat, wurde mit den folgenden Messungen untersucht. Die TfR-1-mRNA der Nativzellen stieg über die Beobachtungsdauer der Zellkultur leicht an. Die Proteinwerte von TfR-1 erhöhten sich von Tag 1 bis 4 bis auf das doppelte des Ausgangswertes, an Tag 6 fiel der Wert wieder leicht ab. Die mRNA der eisenstimulierten Zellen stieg von Tag 1 bis Tag 6 kontinuierlich an. Am Tag 6 stieg der Wert auf das 9-fache des Wertes der Nativkontrolle, der Unterschied war signifikant. Der Proteinwert der Positivkontrolle war am Tag 2 zunächst signifikant erniedrigt, darauf hin stieg er wieder am Tag 4 und 6. Am Tag 6 war er signifikant höher als bei der Negativkontrolle. Ähnlich wie bei der Negativkontrolle stiegen die TfR-1-mRNA-Werte der MPIO-markierten Zellen über den Beobachtungszeitraum langsam an. Am Tag 2 war der Wert im Vergleich zur Nativkontrolle signifikant erniedrigt. Die Proteinwerte zeigten einen ähnlichen Verlauf. Dabei sanken die Werte am Tag 2 signifikant im Vergleich zu den Normalwerten und stiegen am Tag 4 und 6 relativ gesehen zu den Vorwerten wieder an. Aber auch am Tag 4 war der Wert noch signifikant erniedrigt. Die SPIO markierten Zellen zeigten steigende mRNA Werte am Tag 2 und am Tag 4 auf das 5-fache des Normalwertes, am Tag 6 sank er relativ gesehen wieder auf das 2,7-fache des Normalwertes ab. Die Werte zeigten einen signifikanten Anstieg im Vergleich zur Negativkontrolle an den Tagen 2 und 4 und eine signifikante Erhöhung zur MPIO-Gruppe am Tag 4. Die Proteinwerte der SPIO-markierten Gruppe zeigten einen Anstieg über die Zeit mit einem leichten Abfall am Tag 6. Signifikanz zeigten die Werte am Tag 4 durch eine Erniedrigung im Vergleich zur Nativgruppe, aber durch eine Erhöhung im Vergleich zur MPIO-markierten Gruppe (siehe Abbildung 10).

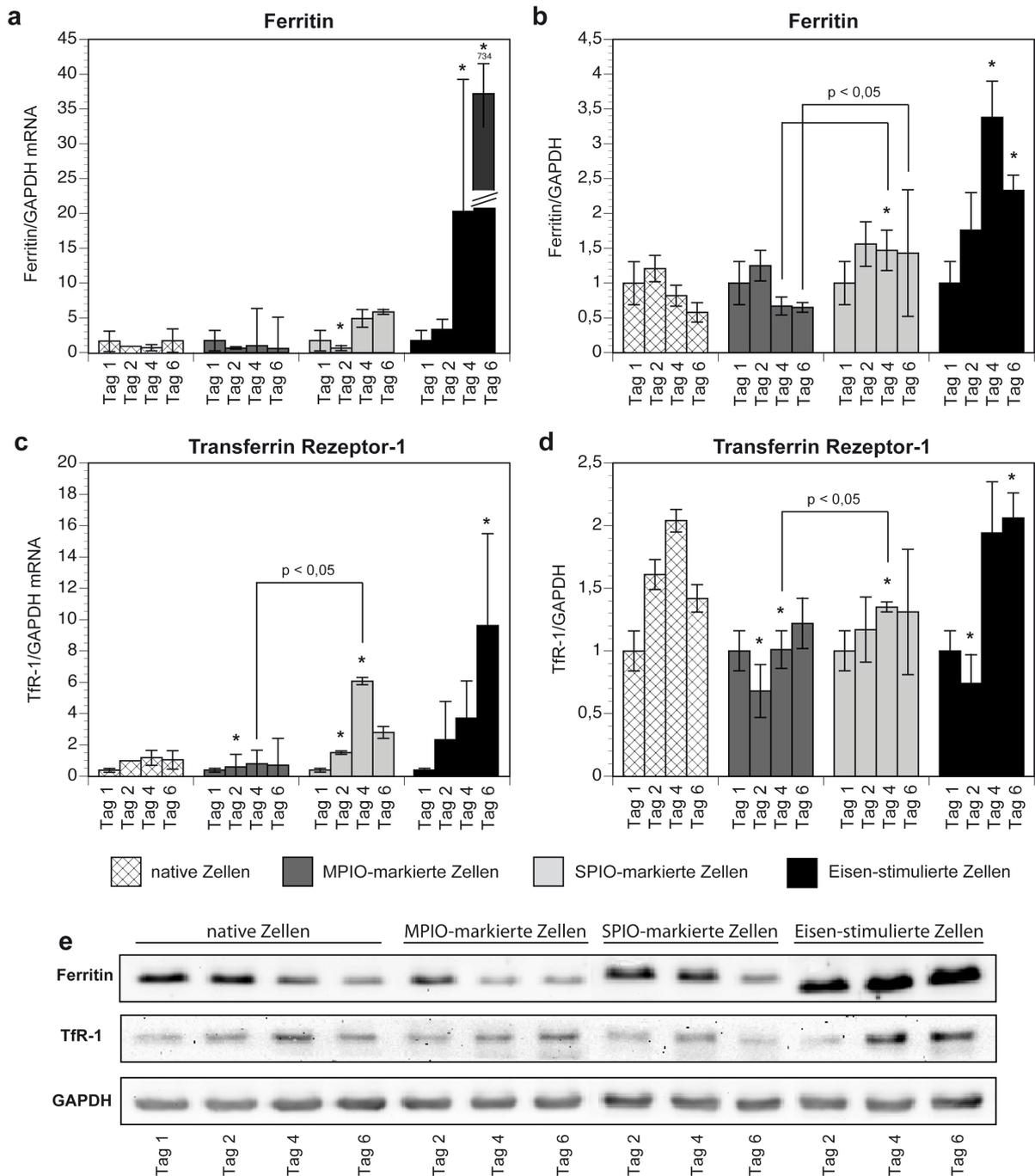


Abb. 10: Eisenstoffwechsel

Ferritin-Genexpression (a und b) von nativen, MPIO-markierten, SPIO-markierten und Eisen-stimulierten Zellen mit SD. Die Ferritin-Expressionsprodukte der nativen und MPIO-markierten Zellen verminderten sich über den Kulturzeitraum, während die Ferritin-Expression der Eisen-stimulierten Zellen mit der steigenden Eisenmenge korrelierte. Die Ferritin-Proteinwerte der SPIO-markierten Zellen waren am Tag 4 und 6 signifikant höher als bei der MPIO-markierten Zellgruppe. TfR-1-Genexpression (c und

d) unterliegen den Einflüssen vom freien Eisengehalt und der ROS-Konzentration in den Zellen. Die TfR-1-mRNA und das TfR-1-Protein der SPIO-markierten Zellen waren am Tag 4 signifikant höher verglichen mit der MPIO-markierten Gruppe. Sowohl die qRT-PCR- als auch Western Blot-Probenergebnisse wurden auf die entsprechenden GAPDH-Werte normalisiert. Sowohl die Werte der markierten als auch der Eisenstimulierten Zellen wurden mit denen der Nativgruppe zum gleichen Zeitpunkt verglichen (* $p < 0,05$). Repräsentative Western Blots von Ferritin und TfR-1 mit GAPDH als Referenz (e).

4 Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die MPIOs den SPIOs hinsichtlich der Markierungseigenschaften überlegen sind. Es waren weniger MPIO-markierte Zellen notwendig, um bei gleicher Eisenbeladung der Zelle eine sichtbare Signalauslöschung zu induzieren (siehe Abbildung 7). Auch ging der Markierungsvorgang bei den mikroskaligen Eisenoxidpartikeln schneller vonstatten als bei den nanoskaligen Eisenoxidpartikeln. Die MPIOs zeigen im Hinblick auf die Auswirkungen auf die Trägerzelle ebenfalls Vorteile gegenüber den SPIOs. Die Markierung mit SPIOs zeigte Hinweise auf eine Aktivierung des Eisenstoffwechsels und hatte eine Sauerstoffradikalentwicklung zur Folge, was auf eine Eisenfreisetzung aus den Partikeln mit daraus resultierender Zellschädigung hindeutet. Bei den MPIO-markierten Zellen hingegen konnten keine Hinweise einer ROS-Bildung gefunden werden, der Eisenstoffwechsel war mit dem der Nativgruppe zu vergleichen (siehe Abbildung 9, 10). Das spricht dafür, dass aus den MPIOs kein Eisen in zellschädigender Menge freigesetzt wird.

4.1 Leberzelltransplantation

Die Leberzelltransplantation ist besonders bei speziellen Indikationsstellungen eine vielversprechende Alternative zur Lebertransplantation. Angewandt wurde sie in der Vergangenheit vor allem bei angeborenen metabolischen Defekten der Leber und bei akutem Leberversagen. Die LCT bietet gegenüber der OLT eine Reihe von Vorteilen, die nachfolgend diskutiert werden.

4.1.1 Verfügbarkeit

Ein Vorteil der LCT im Vergleich zur OLT ist die bessere Verfügbarkeit von Leberzellen. Nicht für die orthotope Lebertransplantation in Frage kommende Lebern, wie beispielsweise bei der Explantation beschädigte Organe, Leberteilresektate oder Organe minderer Qualität (marginale Lebern), können verwendet werden. So wird beispielsweise das Segment IV der Leber aus anatomischen Gründen für die Leberteiltransplantation (*split-liver transplantation*) nicht verwendet und kann als Quelle für eine Hepatozytenisolierung dienen (69). Zu den marginalen Lebern zählen Organe, die beispielsweise einer zu langen Kaltischämie ausgesetzt waren, Fettlebern,

zirrhotische Lebern, Lebern von Patienten mit sklerosierender Cholangitis oder Lebern von älteren Spendern. Trotz diesen Ausschlusskriterien für die OLT ist es möglich eine große Zahl an vitalen Hepatozyten zu isolieren und für die LCT zu verwenden. Allerdings sind die aus den marginalen Lebern isolierten Zellen oft qualitativ beeinträchtigt, was sich in ihrer Viabilität, ihrer Funktionalität und ihrem Anwachsverhalten im Empfängerorganismus widerspiegelt. Mit sinkender Qualität der Zellen steigt die Gefahr der Abstoßung (2, 12, 29).

Zusätzlich bietet die LCT die Möglichkeit eine flexible, an den Bedarfsfall angepasste Menge an Hepatozyten zu transplantieren. So können Zellen eines Spenderorgans unter Umständen auf verschiedene Empfänger verteilt und die Ressourcen so besser genutzt werden (35).

Trotz der alternativen Quellen für Hepatozyten ist auch die LCT durch das verfügbare Spendermaterial limitiert. So können nicht alle Patienten, die von dieser Therapie profitieren würden, behandelt werden. Um das Therapieverfahren der Leberzelltransplantation noch weiter zu verbessern, muss eine stabile Zellquelle gefunden werden, die auch eine ausreichende Funktionalität der Hepatozyten bietet. Dieses Problem ist daher Gegenstand intensiver Forschung. In Studien werden xenogene Zellen, wie beispielsweise porcine Hepatozyten, verwendet. Zusätzlich kommen immortalisierte Zelllinien humanen Ursprungs und embryonale, fetale oder Stammzellen aus Leber oder Knochenmark zum Einsatz. Auch wird versucht Hepatozyten *in vitro* zur Proliferation anzuregen (2, 12, 70-74). Mögliche Komplikationen wie Kanzerogenese oder Zoonosen müssen vor klinischer Anwendung ausgeschlossen werden.

4.1.2 Kryokonservierung

Die Verfügbarkeit von Leberzellen lässt sich ebenfalls durch verbesserte Konservierungsverfahren erhöhen. Anders als bei kompletten Organen besteht bei Leberzellen in Suspension die Möglichkeit der Kryokonservierung. Dies eröffnet eine Reihe neuer Möglichkeiten. Die Hepatozyten könnten auf diese Weise bis zur Verwendung in Zellbanken gelagert werden und somit könnte auf eine verbesserte Biokompatibilität zwischen Spender und Empfänger geachtet werden. Auch wäre es möglich Hepatozyten für den Notfalleinsatz, wie zum Beispiel der Behandlung von akutem Leberversagen, verfügbar zu machen (75). Die Voraussetzung dafür ist eine gut erhaltene Zellfunktion nach dem Auftauprozess. Die Ergebnisse präklinischer und

klinischer Studien weisen jedoch auf ein Verbesserungspotential dieser Methodik hin. Nach Transplantation kryokonservierter Hepatozyten war zwar ein klinischer Erfolg feststellbar, dieser war jedoch nicht vergleichbar mit dem Ergebnis der Transplantation frischer Hepatozyten (76-79). Die Zellen büßten durch das Verfahren sowohl an Viabilität als auch an Funktionalität ein, auch war eine erhöhte Abstoßung nach Kryokonservierung festzustellen. *Terry et al.* vermuteten als Ursache dafür, neben dem direkten Schaden an den Zellen, den Verlust von Adhäsionsmolekülen (75, 79)

4.1.3 Abstoßung und Immunsuppression

Ein generelles Problem der LCT besteht im unzureichenden Anwachsverhalten der transplantierten Zellen. Nach Transplantation ist nur noch ein kleiner Teil der Zellen im Organ nachweisbar, welcher suffizient arbeitet (80). Dies ist vermutlich unter anderem durch eine fehlende Histokompatibilität und Aktivierung des Immunsystems zu erklären. *Gewartowska et al.* beschrieben, dass die Abstoßungsreaktion auf die transplantierten Leberzellen unter anderem von freiliegenden membranösen Cadherinen der nicht adhären Hepatozyten vermittelt würden, welche von Immunzellen erkannt und attackiert werden. So sind nicht nur allogene, sondern auch autologe Hepatozyten im nicht adhären Zustand betroffen (35). Doch auch die erfolgreich internalisierten Hepatozyten verlieren nach einer Zeitspanne von sechs bis neun Monaten ihre Funktion. Ob dies durch Apoptose, Abstoßung oder andere Ursachen zu begründen ist, ist zur Zeit nicht sicher zu sagen (30). *Allen et al.* vermuteten eine zytotoxische T-Zell-Reaktion, getriggert durch die HLA-I-Inkompatibilität von Spender und Empfänger als Ursache (81). Doch auch unter einer immunsuppressiven Therapie kommt es zu einer Langzeitabstoßung. Als gängige medikamentöse Immunsuppression bei LCT werden Kombinationen von Tacrolimus, Methylprednisolon, Cyclosporin und IL-2-Rezeptor Antikörper verwendet. An einer adäquaten Immunsuppression wird derzeit noch geforscht (30).

Neben der Immunsuppression gibt es einige experimentelle Ansätze zur Verbesserung der langfristigen Integration der Hepatozyten in den Empfänger. Das kann vor allem durch kontrollierte Schädigung der Akzeptorleber vor der Transplantation, wie beispielsweise durch Bestrahlung, partielle Hepatektomie oder temporäre Embolisierung erreicht werden. In Folge dessen resultiert ein starker Regenerationsreiz mit einem Wachstumsvorteil der Spenderhepatozyten. Auch eine direkte Stimulation der Hepatozyten mit dem Wachstumsfaktor TNF-alpha ist versucht worden (82-84).

Diese Verfahren wurden im Tiermodell getestet und sind nur bedingt klinisch umsetzbar.

Trotz geringer Anwachsrate der Hepatozyten kann durch eine wiederholte LCT die Anzahl der erfolgreich transplantierten Zellen erhöht und so eine verbesserte Leberfunktion erreicht werden (85).

4.1.4 Invasivität

Mit der OLT gehen eine invasive, langwierige und kostenintensive Operation einher. Obwohl gerade bei Kindern mit Stoffwechselerkrankungen damit ein gutes Langzeitüberleben erzielt werden kann, bleibt die Lebertransplantation eine Therapieoption, die auf Grund ihrer Invasivität mit entsprechendem Komplikationsrisiko weder bei „zu Gesunden“, noch „zu Kranken“ durchgeführt wird (10, 16). Die LCT könnte minimal-invasiv unter Lokalanästhesie durchgeführt werden. Das würde sowohl die Morbidität, Mortalität als auch die Kosten im Vergleich zur kompletten Lebertransplantation senken (2). Zusätzlich könnten mehr Patienten von einer Therapie profitieren. Gerade bei nicht lebensbedrohlichen Erkrankungen ist diese Art der Behandlung auf Grund ihres geringeren Risikos eine gute Therapieoption (21). Außerdem wird bei der LCT im Gegensatz zur orthotopen Lebertransplantation der Erhalt der eigenen Leber ermöglicht, was die Chance der Regeneration beispielsweise nach akutem Leberversagen offen hält. Auch eine Abstoßung wäre weniger gefährlich, da das verbleibende Organ eine absichernde Restfunktion bietet (2).

4.1.5 Genmanipulation

Durch die Möglichkeit der *in vitro* Modifikation der Leberzellen bietet das Verfahren Potential für weitere Therapieansätze, beispielsweise für die Behandlung genetisch bedingter Stoffwechselerkrankungen mit autolog genmanipulierten Zellen. Die allogene Transplantation könnte durch eine autologe Transplantation mit dem Vorteil der besseren Histokompatibilität ersetzt werden. Dem Patienten könnte ein Stück der regenerationsfähigen Leber entfernt werden, *in vitro* könnte der Gendefekt durch Genmanipulation behoben und die spendereigenen Hepatozyten reimplantiert werden, um von nun an die nötige Stoffwechsellistung zu erbringen. Bei Transplantation autologer Hepatozyten könnte die postoperative Immunsuppression reduziert werden und müsste nicht dauerhaft gegeben werden (35, 86, 87).

4.1.6 Tierexperimentelle Studien

In tierexperimentellen Studien wurden bei diversen Leberfunktionsstörungen die Effektivität der Behandlung mit sowohl allogener als auch autologer Leberzelltransplantation untersucht. Die erste Studie zur Behandlung von leberassoziierten Stoffwechselerkrankungen mittels Hepatozytentransplantation wurde 1976 von *Matas et al.* im Rattenmodell durchgeführt. Die hyperbilirubinämischen *Gunn-Ratten* stellen ein Modell für das Crigler-Najjar-Syndrom Typ-I dar, bei dem ein genetischer Defekt im Enzym zur Glucuronidierung von Bilirubin besteht (Bilirubin-UDP-Glucuronosyltransferase). Durch intraportale Transplantation von allogenen Hepatozyten gelang es das konjugierte Bilirubin zu erhöhen und somit den Plasmabilirubinspiegel zu senken (88). Als weitere präklinische Studien für Behandlungen von Stoffwechseldefekten sind unter anderem die *Long Evans cinnamon Ratten* als Modell für Morbus Wilson und die *dipeptidyl peptidase IV-deficient Ratten* zu nennen (1, 2, 89-91).

Die Behandlung von akutem Leberversagen mittels Hepatozytentransplantation stand ebenfalls im Fokus vieler Studien. Nach medikamentös oder chirurgisch induziertem akutem Leberversagen in der Ratte wurde nach Leberzelltransplantation eine signifikante Verbesserung des Überlebens beobachtet (92, 93).

4.1.7 Klinische Studien

Die ersten Ergebnisse zur Leberzelltransplantation beim Menschen wurden 1992 von *Mito et al.* veröffentlicht (94). Beschrieben wurde die Transplantation von humanen Hepatozyten bei zehn Patientin mit Leberzirrhose. Nur in einem Fall wurde eine deutliche Besserung der Symptome erreicht, die anderen Fälle wurden als schwer zu beurteilen beschrieben. Die erste klinische Anwendung zur Behandlung von Stoffwechseldefekten wurde 1997 von *Strom et al.* bei einem fünf Jahre alten Jungen mit OTC-Mangel (Ornithin-Transcarbamylase, ein Enzym des Harnstoffzyklus) durchgeführt. Nach einer initialen Besserung der Symptome verstarb der Patient 42 Tage nach der Behandlung durch Verschlechterung der Stoffwechsellage an einer Infektion (95). Mittlerweile wurde die Leberzelltransplantation bereits bei mehr als 50 Patienten im Rahmen klinischer Studien durchgeführt. In den meisten Fällen besserten sich zwar unmittelbar nach Transplantation die Leberfunktion und die daraus resultierenden Symptome, wie Enzephalopathie und Ikterus, der Effekt war jedoch nur vorübergehend. Er hielt 4-8 Wochen, maximal bis zu 26 Monaten an. In vielen Fällen

konnten die Patienten darauf hin allerdings mit einer OLT therapiert werden (21, 28). Bei der Behandlung von akutem Leberversagen waren die Ergebnisse sehr variabel. Viele Patienten starben trotz LCT wenige Stunden oder Tage nach dem Leberversagen, einige erreichten allerdings die vollständige Genesung. Durch die Varianz der initialen Schädigung fällt es dabei schwer zu sagen, ob die Genesung des Patienten der Behandlung oder einer spontanen Erholung zu verdanken ist.

Den besten Behandlungserfolg hat die LCT nach derzeitiger Studienlage bei angeborenen Stoffwechselerkrankungen (2, 21). Der geringere Behandlungserfolg von akutem und chronischem Leberversagen könnte damit zu erklären sein, dass hierfür eine größere Anzahl an Hepatozyten notwendig ist, um den Defekt zu kompensieren. Um die hohe Anzahl der applizierten Leberzellen zu erreichen, waren oft wiederholte Infusionen notwendig.

4.1.8 Ausblick, Ziele

Der Erfolg der präklinischen Studien konnte also noch nicht in vollem Umfang beim Menschen reproduziert werden. Zumindest kann die Leberzelltransplantation momentan als überbrückende Maßnahme bis zur Lebertransplantation, im Idealfall bis zur Regeneration der eigenen Leber, angewendet werden.

Weitere Zellquellen für die LCT müssen erschlossen und deren Anwendung etabliert werden (fetale Stammzellen, Leberstammzellen, -progenitorzellen). Da die Transplantation von xenogenen Zellen ein großes Potential, aber auch ein erhöhtes Abstoßungsrisiko, die Gefahr von Xenosen und ethisches Konfliktpotential bietet, ist diese Möglichkeit umstritten (74, 96, 97).

Da die Zellqualität eine wichtige Einflussgröße auf den Erfolg des Eingriffes darstellt, ist eine Optimierung der Isolierung, Kultivierung, Markierung und Konservierung anzustreben.

Die in Zellkultur markierten Zellen verlieren nach enzymatischer Lösung drastisch an Viabilität und Funktionalität, aus diesem Grund ist ein optimiertes Markierungsprotokoll notwendig, welches erlaubt die Zellen möglichst schnell und ohne Schaden zu markieren. Ein Ansatz wäre die Markierung in Suspension. Damit würde man die adhärenzte Kultivierung der Hepatozyten und vor allem die später nötige Ablösung der Zellen vermeiden (98).

Um eine bessere Konservierung und damit eine bessere Verfügbarkeit zu erreichen, wären die Kryokonservierung oder die Kultivierung unter Hypothermie vielversprechende Methoden, die ein großes Potential bergen (99).

Obwohl sich die Leberzelltransplantation bereits in der Phase der experimentellen klinischen Anwendung befindet, gibt es noch viele Bereiche die Gegenstand intensiver Forschung sind. Sowohl die Zellverfügbarkeit als auch die Ergebnisse müssen noch verbessert werden, um den Therapieerfolg für die Patienten zu maximieren.

4.2 Qualitätsmanagement in der Leberzelltransplantation

4.2.1 Histologische Probenentnahme

Das einzige derzeit etabliertes Verfahren zur Evaluation nach Leberzelltransplantation stellt die Gewebeprobenentnahme (Leberbiopsie) mit anschließender histologischer Aufbereitung dar (100-102). Sie ermöglicht eine gute Aussage über die lokalen Geschehnisse der Zellen in der jeweiligen Probe. Eine globale Aussage, wie zum Beispiel über die räumliche Verteilung der Zellen, ist jedoch nicht möglich. Auch besteht die Gefahr eines Probefehlers, der nicht repräsentativ ist (103). Durch eingeschränkte Eindringtiefe wird die räumliche Evaluation zusätzlich eingeschränkt. Das Verfahren ist invasiv und unangenehm für den Patienten. Durch multiple Komplikationsgefahren wie postinterventionelle Blutungen oder Infektionen ist die Indikation zur Biopsie gründlich abzuwägen. Dies limitiert die Eingriffshäufigkeit und somit die Kontrolle des zeitlichen Verlaufes des Verhaltens der Hepatozyten nach Transplantation (104).

Aus diesem Grund wurden in vielen Studien an Methoden der nicht- oder gering invasiven *in vivo* Evaluation gearbeitet.

4.2.2 Indirekte Evaluierung

Insbesondere wenn die Hepatozyten zur Behandlung eines Stoffwechseldefizits eingesetzt werden, kann man durch die Verlaufskontrolle von Stoffwechselfparametern über Blutproben auf die Funktionalität der Hepatozyten auch über einen längeren Zeitraum schließen. Beurteilt werden können neben den sonst defizitären Stoffwechselprodukten beispielsweise Harnstoff und Albumin. So ist es jedoch nicht möglich zwischen der Funktion residenter und transplantierte Hepatozyten zu unterscheiden oder eine Aussage über deren Lokalisation zu treffen.

4.2.3 Markergene

Bei dem Nachweis mittels Markergenen wird bei den zu transplantierenden Zellen das Genom *in vitro* durch Genmanipulation so verändert, dass ein spezifisches Genprodukt entsteht, welches zur Detektion der Zellen später *in vivo* beitragen kann. Bei den Genprodukten kann es sich beispielsweise um ein Enzym handeln, welches ein später appliziertes Kontrastmittel so umwandelt, dass es die Zelle nicht mehr verlassen kann und in ihr akkumuliert. Es kommt so zu einer selektiv höheren Anreicherung. Ein anderer Ansatz besteht darin, dass das Genprodukt einen Rezeptor darstellt, der das Kontrastmittel bindet (105, 106). Man kann so nicht nur auf die Lage der Zellen, sondern auch auf deren Expressionsaktivität schließen. Kommt es zur Proliferation der Zellen und hat das Markergen eine stabile Transfektion, so könnte auch dann noch eine Aussage über die Anzahl der Zellen getroffen werden. Folgen des bei Langzeitstudien mehrfach zu applizierenden Kontrastmittels, aber besonders auch die Folgen der Genmanipulation sind schwer zu beurteilen. Das stellt eine Hürde für die klinische Anwendung dar (100).

4.2.4 *In vitro* Markierung

Einen geringeren Eingriff in die Zellintegrität stellt die direkte *in vitro* Markierung der Zellen dar, welche eine *in vivo*-Evaluation nach Transplantation ermöglicht. Auch dazu gibt es eine Vielzahl an Studien mit verschiedenen Ansatzmöglichkeiten. Dazu gehören die Markierung der Zellen mit Isotopen und späterer Detektion mit nuklearmedizinischen Methoden, sowie die Markierung mit eisenoxidhaltigen Kontrastpartikeln und Detektion mittels Magnetresonanztomografie.

Bei dem nuklearmedizinischen Verfahren werden radioaktive Isotope mit möglichst langer Halbwertszeit in die Zelle transferiert oder an die Zelloberfläche gekoppelt. Beispiele für verwendete Isotope sind das ¹¹¹In-Oxiquinolon oder Indium-111 (23, 107, 108). Sie werden mittels Chelatoren in die Zelle geschleust und können dann später *in vivo* mittels Szintigraphie oder SPECT detektiert werden (23, 100, 108). Die Sensitivität ist dabei sehr hoch, nicht allerdings die Eigenschaften zur Bestimmung der Quantität. Auch wird die Auflösung den Anforderungen als Marker momentan nicht gerecht (100, 109). Außerdem ist diese Art der Markierung nicht sehr stabil, so transloziert das Isotop schon nach kurzer Zeit aus der Zelle und verfälscht so das Ergebnis (110, 111). Auch die Halbwertszeit bewirkt eine Limitierung. Eine Langzeitevaluation ist somit mit dieser

Methode momentan noch nicht möglich. Zudem ist derzeit die Langzeitwirkung des radioaktiven Materials auf die Zelle und den Organismus ungeklärt.

Bei den MRT-basierenden-Verfahren werden die Zellen *in vitro* mit Kontrastmittel inkubiert und so markiert. Das Kontrastmittel wird dabei entweder von den Zellen aufgenommen oder an die Zellmembran gekoppelt. Vorteile der MRT gegenüber den anderen Methoden sind die gute räumliche Auflösung, der exzellente Gewebekontrast und das Fehlen von Strahlenbelastung (112). Dies ermöglicht bei Longitudinalstudien die wiederholte Untersuchung des gesamten Körpers. Auch ermöglicht die MRT eine intraoperative Evaluation im Sinne eines nicht invasiven *Real-time-trackings* (113, 114). Eine limitierende Eigenschaft dieser Methode ist die passive Signalgebung der Partikel im MRT unabhängig von der Art oder der Viabilität der Zelle in der sie sich befinden. Eine Freisetzung der Partikel aus den Hepatozyten und Aufnahme in Makrophagen kann momentan nicht ausgeschlossen werden.

4.2.5 Kontrastmittel

Es gibt eine breite Auswahl an MRT-Kontrastmitteln. Es handelt sich hierbei um Eisenpartikel, die in ihrer Größe, Beschaffenheit und Oberfläche variieren. Daraus folgen unterschiedliche physikalischen Eigenschaften und Markierungsqualitäten.

Es gibt sowohl Partikel aus paramagnetischem als auch aus superparamagnetischem Material (115, 116). Paramagnetische Kontrastmittel führen im MRT besonders zu einer Signalerhöhung in T1-gewichteten Sequenzen, bei genügend hoher Konzentration auch zu einer Signalerhöhung in der T2-Wichtung (100, 103). Allerdings ist das verursachte Signal relativ schwach, da die paramagnetischen Kontrastmittel pro Molekül nur ein Eisenatom besitzen. Daraus folgt, dass kleine Mengen Zellen nicht mehr detektiert werden können. Ein weiteres Problem besteht darin, dass die Partikel spontan nur schlecht in die Zelle aufgenommen werden können. Eine große Rolle spielt dabei die Oberflächenladung: Partikel mit anionischen oder kationischen Oberflächen tragen besser zur Inkorporation bei als Partikel mit neutraler Ladung. Es gibt eine Reihe von Möglichkeiten um die Aufnahme zu beschleunigen. Beispiele dafür wären die Nutzung von Transportvesikeln (117, 118), Antikörper-gekoppelte Endozytose (119), Magnetoelektroporation (120) und Kopplung der Partikel mit dem Tat-Peptid aus dem HI-Virus (121, 122). Ob es mögliche Auswirkungen dieser Verfahren auf die Zelle oder nach der Transplantation auf den gesamten Empfängerorganismus gibt, ist derzeit noch weitestgehend ungeklärt.

Superparamagnetische Kontrastmittel haben einen wesentlich stärkeren Effekt auf die MR-Relaxivität. Die Anzahl der Eisenatome ist bei ihnen um ein vielfaches höher als bei den paramagnetischen Partikeln. Sie führen besonders zu einer Signalauslöschung in T2-/T2*-gewichteten Sequenzen, so dass auch schon wenige Zellen im MRT sichtbar gemacht werden können (52, 100). Außerdem ist ihre Spontanaufnahme in die Zellen wesentlich höher. Ein Gebrauch von Transfektionsagenzien ist deshalb nicht mehr zwingend notwendig. Aus diesen Gründen gibt es mittlerweile kaum noch Studien, die paramagnetische Kontrastmittel zum *in vivo Cell tracking* verwenden. Superparamagnetische Partikel dominieren auf diesem Gebiet.

4.2.6 Markierung und Aufnahme

Die Evaluation der Leberzelltransplantation setzt voraus, dass hierdurch die Hepatozyten weder während der Markierung, noch nach der Transplantation Schaden nehmen. Auch eine systemische Schädigung des Patienten muss unbedingt ausgeschlossen werden. Die Eigenschaften der Partikel im Hinblick auf eine mögliche Interaktion mit dem Patienten müssen also vor klinischer Anwendung genau untersucht werden. Ebenfalls muss eine möglichst gute Anwendbarkeit vorausgesetzt werden. Dazu zählt unter anderem, dass die Zellen nach Isolierung aus dem Spenderorgan schnell und unkompliziert markiert und dann dem Patienten ohne großen Zeitverlust transplantiert werden können.

Sowohl die MPIOs als auch die SPIOs eignen sich für eine Markierung von primären humanen Hepatozyten. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen zusätzlich, dass es mit den MPIOs möglich ist die Zellen in einem Viertel der Zeit, also in 4 Stunden, mit der gleichen Menge an Eisen zu beladen, wie es mit den SPIOs in 16 Stunden möglich ist. Die auffallend großen Standardabweichungen der CSAAS-Messung der SPIO-Gruppe kann als Folge einer ungleichmäßigen Markierung interpretiert werden (siehe Abbildung 6). Auch wenn eine Erhöhung der Aufnahmegeschwindigkeit der SPIOs mit Hilfe von Transfektionsagenzien erreicht wurde, ist diese Möglichkeit der Beeinflussung umstritten, da eine Interaktion nicht ausgeschlossen werden kann und eine noch verstärkte inhomogene Verteilung der Partikel angenommen wird (123-125). Es gibt zudem Hinweise darauf, dass die Partikel auf diese Weise nicht in die Zelle aufgenommen werden, sondern an der Zelloberfläche verbleiben. Das führt zu einer verminderten Stabilität der Markierung und kann sogar zu einer lokalen inflammatorischen Reaktion führen (126). Deshalb ist bislang eine Markierung ohne

Transfektionsagencien, zumindest bis dieses Verfahren optimiert wurde und oben beschriebene Folgen ausgeschlossen werden können, vorzuziehen. MPIOs ermöglichen also durch schnellere Markierung eine schnellere Applikation der Zellen nach Isolierung, was der Qualität der Zellen und damit dem Erfolg der Intervention zugute kommt. Ob für den Aufnahmemechanismus der Partikel eine passive Aufnahme, Phagozytose, Pinozytose oder Rezeptor-abhängige Endozytose eine Rolle spielt, ist derzeit noch ungeklärt. Für die SPIOs wird jedoch eine elektrostatische Interaktion der Partikeloberfläche mit der Zellmembran angenommen, was zu einer Endosombildung führt (127). Bei der mit Eisenzitrat behandelten Positivkontrolle zeigte sich von Tag 2 bis 6 ein stetig ansteigender Eisengehalt, was durch die langsamere Aufnahme, aber stetigen Kumulation des Eisens durch die tägliche Applikation zu erklären ist.

4.2.7 Bildgebende Eigenschaften

Um eine möglichst genaue Evaluierung der dynamischen Verteilung der Zellen im Organismus zu ermöglichen, ist es von Vorteil, wenn das Kontrastmittel ein Maximum an Signalstärke bei einem Minimum an Markierungsbeladung bietet. Das bedeutet, dass das Effekt-Partikel-Verhältnis möglichst groß sein sollte. So ist es auch möglich kleinste Zellmengen später im MRT wieder auffindbar zu machen. Außerdem ist die Evaluation auf diese Art auch mit klinisch in Gebrauch befindlichen MRT-Geräten möglich und nicht nur auf Geräte mit extrem hoher Feldstärke beschränkt. Das würde die Anwendung erleichtern und in weitem Feld einsetzbar machen. Die CSAAS-Messungen und die MRT-Phantomaufnahmen der Zellen zeigen, dass die MPIO-markierten Zellen bei gleicher Eisenbeladung eine stärkere Signalauslöschung zeigen als die SPIO-markierten Zellen (siehe Abbildung 6, 7). Das Effekt-Partikel-Verhältnis der MPIOs ist also größer als das der SPIOs. Daraus folgt die Möglichkeit einer besseren Detektion der Zellen, wobei weniger Partikel verwendet werden müssen. Dies ist dadurch zu erklären, dass mit zunehmender Größe die Signalauslöschung der superparamagnetischen Partikel nicht nur direkt proportional, sondern exponentiell ansteigt. Die Signalauslöschung ist also größer als die einfache physikalische Größe. Diese physikalische Eigenschaft wird als „*blooming effect*“ bezeichnet (128). *Shapiro et al.* gelang es mit MPIOs markierte Leberzellen auf Einzelniveau im 7-T-MRT darzustellen (129).

4.2.8 Eisenfreisetzung

Partikel mit einem Eisenkern bergen bei Eisenfreisetzung die Gefahr der Bildung von Sauerstoffradikalen. Dies kann zu sofortigem Zellschaden bis hin zur Apoptose oder Nekrose, aber auch zu längerfristigen Schäden wie DNA-Veränderungen mit mutagenen und kanzerogenen Effekten führen (67, 130). Durch eine reflektorische Entzündungsreaktion wird auch das Nachbargewebe geschädigt (54). Gerade bei Kontrastagenzien, die im Körper verbleiben, ist eine uneingeschränkte Kompatibilität mit der Zelle obligat. Außerdem ist eine Stabilität der Markierung für eine Langzeitevaluation ebenfalls von Vorteil, da ein Partikelabbau eine Signalabschwächung und somit eine Ergebnisverfälschung bedeuten würde. Anspruch an Markierungspartikel zu Leberzelltransplantation muss also sein, dass die Partikel biologisch inert sind.

Sowohl lichtmikroskopisch als auch bei der Betrachtung der Transaminasen als Schädigungsparameter konnte bei beiden Gruppen der Partikel-markierten Zellen kein Hinweis auf eine Zellschädigung gefunden werden (siehe Abbildung 5, 8).

Auch bei den CSAAS-Messungen konnte kein signifikanter Eisenabfall im Laufe der Zeit beobachtet werden, was gegen den Verlust von Partikeln aus den Zellen spricht (siehe Abbildung 6). Eine Freisetzung des Eisens ins Zytoplasma kann jedoch so noch nicht ausgeschlossen werden. Sowohl der veränderte Eisenstoffwechsel als auch die erhöhten ROS-Werte sprechen dafür, dass die SPIOs nicht zur Gänze biologisch inert sind. Der Eisenstoffwechsel und die ROS-Konzentration der MPIO-Gruppe ähneln den Werten der Negativkontrolle (siehe Abbildung 9 und 10). Die MPIOs scheinen also weniger reaktiv als die SPIOs zu sein. Das könnte mit der anderen Oberflächenummantelung zusammenhängen. Zusätzlich kommt den um ein Vielfaches größeren Partikeln das bessere Volumen-Oberflächenverhältnis zugute ($V_{\text{Kugel}} = 4/3\pi r^3$, $A_{\text{Kugel}} = 4\pi r^2$). Mit größerem Durchmesser haben die MPIOs bei höherem Volumen eine relativ kleinere Oberfläche, folglich sinkt das statistische Risiko der Eisenfreisetzung.

Eine indirekte Möglichkeit, um die Eisenfreisetzung in kultivierten primären humanen Hepatozyten zu überprüfen, ist die Untersuchung der Veränderung des Eisenstoffwechsels. Die Schlüsselproteine des Eisenstoffwechsels Ferritin und TfR werden in Anlehnung an andere Studien als repräsentative Marker für den Eisenstoffwechsel verwendet (60, 131).

Sowohl die Ferritin-mRNA als auch das Protein Ferritin sinken bei der Nativ-Gruppe

und der MPIO-Gruppe über die Beobachtungsdauer ab. Die mRNA und das Protein von TfR der Nativgruppe steigen hingegen tendenziell eher an (siehe Abbildung 10). Das ist damit zu erklären, dass im Williams Medium E ein geringerer Eisengehalt als im physiologischen Serum vorliegt und zusätzlich nur in gebundener Form als Eisen-(III)-Nitrat vorkommt (132). Es stellt also ein Eisenmangelmedium dar. Es wurde verwendet, da es als Medium für die Kultivierung von PHH etabliert ist und die Zellen so möglicherweise eine sensitivere Antwort auf die Eisenfreisetzung zeigen. Der Verlauf der Werte der Nativzellen wird als Normalwert interpretiert. Durch die Referenz auf die Werte der Nativkontrolle kann der vom Medium unabhängige Verlauf der Expressionsprodukte von der MPIO- und SPIO-Gruppe kalkuliert werden.

Die theoretische Annahme, dass mit steigendem Eisen die Expression des TfR herunterreguliert wird, hat sich auf den ersten Blick nicht bestätigt. Trotz des stetigen Anstiegs der Eisenkonzentration in der Positivkontrolle, wurde ein starker Anstieg sowohl der mRNA als auch des Proteins ab Tag 4 beobachtet (siehe Abbildung 10). Eine mögliche Erklärung wäre die Abhängigkeit der TfR-Expression von der Konzentration der Sauerstoffradikale. *Andriopoulos et al.* beobachteten einen Zusammenhang zwischen der TfR-Expression und der Entstehung von ROS. Vermehrte ROS-Bildung induziert dabei die Expression des TfR (133). Da die ROS-Konzentration der Eisen-überladenen Gruppe mit der Expressionserhöhung korreliert, kann damit der Anstieg des TfR erklärt werden. Auch bei der SPIO-Gruppe ist ein derartiger Trend festzustellen. Auf eine initiale ROS-Erhöhung folgte nach einer leichten Zeitverzögerung, besonders beim Transkriptionsprodukt, eine Erhöhung des TfR. *Schäfer et al.* kamen nach der Markierung von Ratten-MCS mit SPIOs auf ein ähnliches Ergebnis. Auch sie beobachteten eine gesteigerte TfR-Expression nach der Markierung. Sie konnten den zugrunde liegenden Mechanismus jedoch nicht direkt erklären (124). Auf Grund der Interaktion der beiden Einflussgrößen, freies Eisen und ROS, auf die TfR-Expression ist es daher schwer den Verlauf hinsichtlich der Eisenfreisetzung zu interpretieren. Nur bei der Nativgruppe und den MPIO-markierten Zellen ist ein direkter Rückschluss auf die Eisenfreisetzung möglich, da die ROS-Konzentration in den beiden Gruppen nahezu konstant bleibt.

Bei der MPIO-Gruppe deutet der TfR-Abfall am Tag zwei auf eine transiente Eisenfreisetzung hin. Da jedoch auf Grund dieser weder Sauerstoffradikale noch andere Zellschädigungsparameter entstanden sind, ist davon auszugehen, dass die

Eisenfreisetzung die zellschädigende Grenze nicht überschritten hat und sie von den physiologischen Kompensationsmechanismen der Zelle ausgeglichen wurde. Ferritin-gebundenes Eisen führt zu keiner Zellschädigung, da es in diesem engen Bindungszustand an keinen oxidativen Reaktionen teilnimmt (134). Die Ergebnisse der Ferritin-Expression stützen die vorigen Ergebnisse. Dass sowohl bei der Positivkontrolle als auch bei den SPIOs die Ferritin-Expression ansteigt, spricht ebenfalls für eine Aktivierung des Eisenstoffwechsels durch Eisenfreisetzung. Die MPIO-Gruppe verhält sich hinsichtlich der Ferritin-Expression wie die Nativkontrolle, was für ein inertes Verhalten der MPIOs spricht.

Harnstoff ist ein Stoffwechselendprodukt der Hepatozyten und wird oft als Parameter für ihre Syntheseleistung und somit als Korrelat für ihre Vitalität und Funktionalität verwendet. In dieser Studie bleibt die Ureakonzentration bei der Nativkontrolle und der MPIO-Gruppe gleich, tendenziell sinkt sie eher. Die SPIO-Gruppe zeigt an Tag 4 und 5 einen Anstieg, die Positivkontrolle an Tag 4 bis 6 (siehe Abbildung 8). Die Harnstoffkonzentration steigt hier also mit der Zeit, und betrachtet man die anderen Zellschädigungsparameter als Referenz, auch mit der Zellschädigung, an. Das kann dadurch erklärt werden, dass dem Kulturmedium die Aminosäure L-Arginin zugesetzt ist. Mit zunehmender Zellschädigung wird das zytoplasmatische Enzym Arginase freigesetzt, welches nun vermehrt L-Arginin zu Harnstoff und L-Ornithin verstoffwechselt. So steigt trotz der Zellschädigung der Harnstoffspiegel im Medium.

4.2.9 Ausblick, Ziele

Der nächste Schritt zur klinischen Etablierung der Markierung von Hepatozyten mit MPIOs wären *in vivo* Studien und Beobachtungen über einen längeren Zeitraum.

Ein limitierender Faktor des *Cell trackings* mittels MRT ist, dass lebende nicht von toten Zellen unterschieden werden können. Gehen markierte Zellen zugrunde, werden die Partikel freigesetzt bis sie von phagozytierenden Zellen (Makrophagen, Granulozyten) entfernt werden. Diese dann mit den Partikeln neu beladenen Zellen können im Empfängerorganismus wandern und zu einer Fehlinterpretation führen. Wenn markierte Zellen sich nach Transplantation teilen, werden die Markierungspartikel und damit das Signal Schritt für Schritt ausgedünnt (135). Um die Korrelation zwischen dem Signal der Partikel und der zu markierenden Zelle sicherzustellen, müssten weitere Studien durchgeführt werden (46).

Die Entwicklung einer Evaluationstechnik, die nicht nur eine Aussage über Lokalisation,

sondern auch über Funktionalität treffen kann, wäre wünschenswert. Dazu wären aktive Marker nötig, die spezifisch auf Art und Funktionszustand der Zelle ihr Signal variieren. Die Kombination von MRT-Evaluation und Markergenen wäre daher eine vielversprechende Zukunftsaussicht (135, 136). Es könnte von den Vorteilen beider Verfahren profitiert werden und eine gute qualitative, sowie quantitative Darstellung erfolgen. Zusätzlich wäre es möglich eine Aussage über Vitalität und sogar Funktionalität der Zelle zu treffen. Dazu müssten allerdings vor allem die Markierung mittels Markergenen und deren Langzeitauswirkungen noch besser erforscht werden. Dafür wäre es nötig den Beobachtungszeitraum auszudehnen.

5 Zusammenfassung

Die Lebertransplantation stellt derzeit den Goldstandard in der Behandlung des terminalen Leberversagens dar, die Verfügbarkeit dieses Therapieverfahrens ist jedoch durch den Mangel an geeigneten Spenderorganen limitiert. Die Leberzelltransplantation ist insbesondere bei metabolischen Lebererkrankungen eine vielversprechende therapeutische Alternative zur Lebertransplantation.

Sowohl im Tierexperiment als auch in klinischen Studien konnte nach Leberzelltransplantation ein therapeutischer Erfolg mittels klinischer und histologischer Daten nachgewiesen werden.

Für die weitere klinische Etablierung der Leberzelltransplantation wäre es zusätzlich von großer Bedeutung, eine Aussage über das Verhalten der transplantierten Zellen *in vivo* zu treffen. Ein hierfür vielversprechendes Verfahren stellt die Markierung der Zellen mit Eisenoxidpartikeln dar, deren kontrastgebenden Eigenschaften eine nicht-invasive Darstellung markierter Zellen mittels MRT erlauben. Hierfür stehen verschiedene Kontrastmittel zu Verfügung, die sich in vielerlei Hinsicht unterscheiden. Die Qualität der Partikel wird über die Markierungs- und Zellkompatibilitätseigenschaften bewertet. Hauptaugenmerk wird dabei auf die Aufnahme in die Zelle, die Signalgebung im MRT und auf den Ausschluss negativer Auswirkungen auf die Zelle hinsichtlich Vitalität und Funktionalität gelegt. Ziel dieser Arbeit ist es die Wahl des Kontrastmittels zu optimieren und durch Aufdeckung etwaiger Defizite Hinweise für Verbesserungspotential anzubieten. Es wurden dazu primäre humane Hepatozyten aus Leberteilresektaten gewonnen und *in vitro* kultiviert, anschließend mit klinisch zugelassenen nanoskaligen Eisenpartikeln (SPIOs) und nicht klinisch zugelassenen mikroskaligen Eisenpartikeln (MPIOs) markiert und über einen Zeitraum von einer Woche beobachtet. Zur Evaluation der Markierungseigenschaften der Partikel wurde die Eisenaufnahme in die Zellen gemessen und deren bildgebende Eigenschaften mit Hilfe eines Phantommodells im klinischen 3,0 Tesla MRT verglichen. Um den Einfluss der Partikel auf den Eisenstoffwechsel der Hepatozyten zu überprüfen, wurden mRNA- und Proteinsynthese von TfR und Ferritin untersucht. ROS, GOT, GPT, Harnstoff und lichtmikroskopische Bewertung der Zellmorphologie wurden als Parameter für die Zellschädigung verwendet.

Eine erfolgreiche Inkorporation ist mit beiden Partikelarten möglich. Die MPIOs zeigten jedoch Vorteile in den Markierungseigenschaften hinsichtlich Aufnahmegeschwindigkeit und Bildgebung. Sowohl zellmorphologisch als auch bezüglich der Zellschädigungsparameter konnte bei beiden Gruppen kein Hinweis auf Zellschädigung gefunden werden. Im Gegensatz zu den MPIOs zeigten die SPIOs jedoch eine temporäre ROS-Bildung und eine nicht physiologische Aktivierung des Eisenstoffwechsels.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit kann der Einsatz von MPIOs als Markierungsoption bei der Hepatozytentransplantation empfohlen werden. Ansatzpunkte für weitere Studien sollten die Verbesserung der bildgebenden Eigenschaften zur Darstellung der Zellen auf Einzelzellniveau mit klinischem MRT und eine Verbesserung der Evaluation mit Aussage der Funktionalität und Vitalität der Zellen *in vivo* sein. Auch Studien mit längerem Beobachtungszeitraum, welche Langzeitschäden ausschließen können, wären von wissenschaftlichem Interesse.

6 Literaturverzeichnis

1. Fisher RA, Strom SC. Human hepatocyte transplantation: worldwide results. *Transplantation* 2006;82:441-449.
2. Puppi J, Dhawan A. Human hepatocyte transplantation overview. *Methods Mol Biol* 2009;481:1-16.
3. Lysy PA, Campard D, Smets F, Najimi M, Sokal EM. Stem cells for liver tissue repair: current knowledge and perspectives. *World J Gastroenterol* 2008;14:864-875.
4. Thamara M, Perera MT, Mirza DF, Elias E. Liver transplantation: Issues for the next 20 years. *J Gastroenterol Hepatol* 2009;24 Suppl 3:S124-131.
5. Kalayoglu M, Sollinger HW, Stratta RJ, et al. Extended preservation of the liver for clinical transplantation. *Lancet* 1988;1:617-619.
6. Wall WJ. Liver transplantation: past accomplishments and future challenges. *Can J Gastroenterol* 1999;13:257-263.
7. Jamieson NV, Sundberg R, Lindell S, et al. Preservation of the canine liver for 24-48 hours using simple cold storage with UW solution. *Transplantation* 1988;46:517-522.
8. Murray KF, Carithers RL, Jr. AASLD practice guidelines: Evaluation of the patient for liver transplantation. *Hepatology* 2005;41:1407-1432.
9. EuropeanLiverTransplantRegistry. Patient Survival according to the Year of Liver Transplantation. In: *European Liver Transplant Registry*; 2009.
10. Sokal EM. Liver transplantation for inborn errors of liver metabolism. *J Inherit Metab Dis* 2006;29:426-430.
11. Starzl TE, Lakkis FG. The unfinished legacy of liver transplantation: emphasis on immunology. *Hepatology* 2006;43:S151-163.
12. Leckel K, Blaheta RA, Markus BH. [State of hepatocyte transplantation: a risk or a chance?]. *Zentralbl Chir* 2003;128:283-290.
13. Sterling RK, Fisher RA. Liver transplantation. Living donor, hepatocyte, and xenotransplantation. *Clin Liver Dis* 2001;5:431-460, vii.
14. Schlitt HJ, Loss M, Scherer MN, et al. [Current developments in liver transplantation in Germany: MELD-based organ allocation and incentives for transplant centres]. *Z Gastroenterol* 2011;49:30-38.

15. Weismuller TJ, Fikatas P, Schmidt J, et al. Multicentric evaluation of model for end-stage liver disease-based allocation and survival after liver transplantation in Germany - limitations of the 'sickest first'-concept. *Transpl Int* 2010.
16. Merion RM. When is a patient too well and when is a patient too sick for a liver transplant? *Liver Transpl* 2004;10:S69-73.
17. Keeffe EB. Liver transplantation: current status and novel approaches to liver replacement. *Gastroenterology* 2001;120:749-762.
18. Malago M, Hertl M, Testa G, Rogiers X, Broelsch CE. Split-liver transplantation: future use of scarce donor organs. *World J Surg* 2002;26:275-282.
19. Sauer IM, Baurmeister U. Cell-free artificial liver support. *Ther Apher Dial* 2006;10:105-107.
20. McKenzie TJ, Lillegard JB, Nyberg SL. Artificial and bioartificial liver support. *Semin Liver Dis* 2008;28:210-217.
21. Smets F, Najimi M, Sokal EM. Cell transplantation in the treatment of liver diseases. *Pediatr Transplant* 2008;12:6-13.
22. Choi D, Kim JH, Lim M, et al. Hepatocyte-like cells from human mesenchymal stem cells engrafted in regenerating rat liver tracked with in vivo magnetic resonance imaging. *Tissue Eng Part C Methods* 2008;14:15-23.
23. Bohnen NI, Charron M, Reyes J, et al. Use of indium-111-labeled hepatocytes to determine the biodistribution of transplanted hepatocytes through portal vein infusion. *Clin Nucl Med* 2000;25:447-450.
24. Rifai K, Ernst T, Kretschmer U, et al. Prometheus--a new extracorporeal system for the treatment of liver failure. *J Hepatol* 2003;39:984-990.
25. Mitzner SR, Stange J, Klammt S, et al. Improvement of hepatorenal syndrome with extracorporeal albumin dialysis MARS: results of a prospective, randomized, controlled clinical trial. *Liver Transpl* 2000;6:277-286.
26. Liu JP, Gluud LL, Als-Nielsen B, Gluud C. Artificial and bioartificial support systems for liver failure. *Cochrane Database Syst Rev* 2004:CD003628.
27. Dhawan A, Puppi J, Hughes RD, Mitry RR. Human hepatocyte transplantation: current experience and future challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;7:288-298.
28. Dhawan A, Strom SC, Sokal E, Fox IJ. Human hepatocyte transplantation. *Methods Mol Biol* 2010;640:525-534.

29. Fox IJ, Roy-Chowdhury J. Hepatocyte transplantation. *J Hepatol* 2004;40:878-886.
30. Fitzpatrick E, Mitry RR, Dhawan A. Human hepatocyte transplantation: state of the art. *J Intern Med* 2009;266:339-357.
31. Kusano M, Mito M. Observations on the fine structure of long-survived isolated hepatocytes inoculated into rat spleen. *Gastroenterology* 1982;82:616-628.
32. Darwish AA, Sokal E, Stephenne X, et al. Permanent access to the portal system for cellular transplantation using an implantable port device. *Liver Transpl* 2004;10:1213-1215.
33. Strom SC, Fisher RA, Thompson MT, et al. Hepatocyte transplantation as a bridge to orthotopic liver transplantation in terminal liver failure. *Transplantation* 1997;63:559-569.
34. Ponder KP, Gupta S, Leland F, et al. Mouse hepatocytes migrate to liver parenchyma and function indefinitely after intrasplenic transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:1217-1221.
35. Gewartowska M, Olszewski WL. Hepatocyte transplantation-biology and application. *Ann Transplant* 2007;12:27-36.
36. Khan AA, Habeeb A, Parveen N, et al. Peritoneal transplantation of human fetal hepatocytes for the treatment of acute fatty liver of pregnancy: a case report. *Trop Gastroenterol* 2004;25:141-143.
37. Kobayashi N, Ito M, Nakamura J, et al. Hepatocyte transplantation in rats with decompensated cirrhosis. *Hepatology* 2000;31:851-857.
38. Soltys KA, Soto-Gutierrez A, Nagaya M, et al. Barriers to the successful treatment of liver disease by hepatocyte transplantation. *J Hepatol* 2010;53:769-774.
39. Horslen SP, McCowan TC, Goertzen TC, et al. Isolated hepatocyte transplantation in an infant with a severe urea cycle disorder. *Pediatrics* 2003;111:1262-1267.
40. Fox IJ, Chowdhury JR, Kaufman SS, et al. Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N Engl J Med* 1998;338:1422-1426.
41. Sokal EM, Smets F, Bourgois A, et al. Hepatocyte transplantation in a 4-year-old girl with peroxisomal biogenesis disease: technique, safety, and metabolic follow-up. *Transplantation* 2003;76:735-738.

42. Shen T, Weissleder R, Papisov M, Bogdanov A, Jr., Brady TJ. Monocrystalline iron oxide nanocompounds (MION): physicochemical properties. *Magn Reson Med* 1993;29:599-604.
43. Jung CW, Jacobs P. Physical and chemical properties of superparamagnetic iron oxide MR contrast agents: ferumoxides, ferumoxtran, ferumoxsil. *Magn Reson Imaging* 1995;13:661-674.
44. Wagner S, Schnorr J, Pilgrimm H, Hamm B, Taupitz M. Monomer-coated very small superparamagnetic iron oxide particles as contrast medium for magnetic resonance imaging: preclinical in vivo characterization. *Invest Radiol* 2002;37:167-177.
45. Shapiro EM, Skrtic S, Sharer K, et al. MRI detection of single particles for cellular imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:10901-10906.
46. Slotkin JR, Cahill KS, Tharin SA, Shapiro EM. Cellular magnetic resonance imaging: nanometer and micrometer size particles for noninvasive cell localization. *Neurotherapeutics* 2007;4:428-433.
47. Zelivyanskaya ML, Nelson JA, Poluektova L, et al. Tracking superparamagnetic iron oxide labeled monocytes in brain by high-field magnetic resonance imaging. *J Neurosci Res* 2003;73:284-295.
48. Raschzok N, Morgul MH, Pinkernelle J, et al. 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.
49. Neuwelt EA, Hamilton BE, Varallyay CG, et al. Ultrasmall superparamagnetic iron oxides (USPIOs): a future alternative magnetic resonance (MR) contrast agent for patients at risk for nephrogenic systemic fibrosis (NSF)? *Kidney Int* 2009;75:465-474.
50. Saini S, Sharma R, Baron RL, et al. Multicentre dose-ranging study on the efficacy of USPIO ferumoxtran-10 for liver MR imaging. *Clin Radiol* 2000;55:690-695.
51. Dunn JF, Roche MA, Springett R, et al. Steady-state MR imaging with MION for quantification of angiogenesis in normal brain and in brain tumors. *Adv Exp Med Biol* 2003;540:221-226.
52. Wang YX, Hussain SM, Krestin GP. Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging. *Eur Radiol* 2001;11:2319-2331.
53. Papanikolaou G, Pantopoulos K. Iron metabolism and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;202:199-211.

54. Aisen P, Enns C, Wessling-Resnick M. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33:940-959.
55. Yamashiro DJ, Tycko B, Fluss SR, Maxfield FR. Segregation of transferrin to a mildly acidic (pH 6.5) para-Golgi compartment in the recycling pathway. *Cell* 1984;37:789-800.
56. Mellman I. Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996;12:575-625.
57. Nunez MT, Gaete V, Watkins JA, Glass J. Mobilization of iron from endocytic vesicles. The effects of acidification and reduction. *J Biol Chem* 1990;265:6688-6692.
58. Ward JH, Kushner JP, Kaplan J. Regulation of HeLa cell transferrin receptors. *J Biol Chem* 1982;257:10317-10323.
59. Mattia E, Rao K, Shapiro DS, Sussman HH, Klausner RD. Biosynthetic regulation of the human transferrin receptor by desferrioxamine in K562 cells. *J Biol Chem* 1984;259:2689-2692.
60. Hubert N, Lescoat G, Sciot R, et al. Regulation of ferritin and transferrin receptor expression by iron in human hepatocyte cultures. *J Hepatol* 1993;18:301-312.
61. Mullner EW, Kuhn LC. A stem-loop in the 3' untranslated region mediates iron-dependent regulation of transferrin receptor mRNA stability in the cytoplasm. *Cell* 1988;53:815-825.
62. Seiser C, Teixeira S, Kuhn LC. Interleukin-2-dependent transcriptional and post-transcriptional regulation of transferrin receptor mRNA. *J Biol Chem* 1993;268:13074-13080.
63. Theil EC. Ferritin: structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms. *Annu Rev Biochem* 1987;56:289-315.
64. Klausner RD, Rouault TA, Harford JB. Regulating the fate of mRNA: the control of cellular iron metabolism. *Cell* 1993;72:19-28.
65. Mattia E, Josic D, Ashwell G, Klausner R, van Renswoude J. Regulation of intracellular iron distribution in K562 human erythroleukemia cells. *J Biol Chem* 1986;261:4587-4593.
66. Munro HN, Linder MC. Ferritin: structure, biosynthesis, and role in iron metabolism. *Physiol Rev* 1978;58:317-396.
67. Huang X. Iron overload and its association with cancer risk in humans: evidence for iron as a carcinogenic metal. *Mutat Res* 2003;533:153-171.

68. Raschzok N, Billecke N, Kammer NN, et al. Quantification of cell labeling with micron-sized iron oxide particles using continuum source atomic absorption spectrometry. *Tissue Eng Part C Methods* 2009;15:681-686.
69. Mitry RR, Dhawan A, Hughes RD, et al. One liver, three recipients: segment IV from split-liver procedures as a source of hepatocytes for cell transplantation. *Transplantation* 2004;77:1614-1616.
70. Aleem Khan A, Parveen N, Habeeb MA, Habibullah CM. Journey from hepatocyte transplantation to hepatic stem cells: a novel treatment strategy for liver diseases. *Indian J Med Res* 2006;123:601-614.
71. Habibullah CM, Syed IH, Qamar A, Taher-Uz Z. Human fetal hepatocyte transplantation in patients with fulminant hepatic failure. *Transplantation* 1994;58:951-952.
72. Shafritz DA, Dabeva MD. Liver stem cells and model systems for liver repopulation. *J Hepatol* 2002;36:552-564.
73. Ferry N, Hadchouel M. Liver regeneration: with a little help from marrow. *J Hepatol* 2002;36:695-697.
74. Bonavita AG, Quaresma K, Cotta-de-Almeida V, et al. Hepatocyte xenotransplantation for treating liver disease. *Xenotransplantation* 2010;17:181-187.
75. Terry C, Dhawan A, Mitry RR, Hughes RD. Cryopreservation of isolated human hepatocytes for transplantation: State of the art. *Cryobiology* 2006;53:149-159.
76. David P, Alexandre E, Audet M, et al. Engraftment and albumin production of intrasplenically transplanted rat hepatocytes (Sprague-Dawley), freshly isolated versus cryopreserved, into Nagase analbuminemic rats (NAR). *Cell Transplant* 2001;10:67-80.
77. Arikura J, Kobayashi N, Okitsu T, et al. UW solution: a promising tool for cryopreservation of primarily isolated rat hepatocytes. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002;9:742-749.
78. Bilir BM, Guinette D, Karrer F, et al. Hepatocyte transplantation in acute liver failure. *Liver Transpl* 2000;6:32-40.
79. Terry C, Hughes RD, Mitry RR, Lehec SC, Dhawan A. Cryopreservation-induced nonattachment of human hepatocytes: role of adhesion molecules. *Cell Transplant* 2007;16:639-647.

80. Ito M, Nagata H, Yamamoto T, et al. Intrasplenic hepatocyte transplantation prolonged the survival in Nagase analbuminemic rats with liver failure induced by common bile duct ligation. *Cell Transplant* 2007;16:547-553.
81. Allen KJ, Mifsud NA, Williamson R, Bertolino P, Hardikar W. Cell-mediated rejection results in allograft loss after liver cell transplantation. *Liver Transpl* 2008;14:688-694.
82. Dagher I, Boudechiche L, Branger J, et al. Efficient hepatocyte engraftment in a nonhuman primate model after partial portal vein embolization. *Transplantation* 2006;82:1067-1073.
83. Koenig S, Krause P, Schmidt TK, et al. Irradiation as preparative regimen for hepatocyte transplantation causes prolonged cell cycle block. *Int J Radiat Biol* 2008;84:285-298.
84. Kosone T, Takagi H, Horiguchi N, et al. Transforming growth factor-alpha accelerates hepatocyte repopulation after hepatocyte transplantation. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;23:260-266.
85. Rozga J, Holzman M, Moscioni AD, et al. Repeated intraportal hepatocyte transplantation in analbuminemic rats. *Cell Transplant* 1995;4:237-243.
86. Lee LA. Advances in hepatocyte transplantation: a myth becomes reality. *J Clin Invest* 2001;108:367-369.
87. Grossman M, Raper SE, Kozarsky K, et al. Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Nat Genet* 1994;6:335-341.
88. Matas AJ, Sutherland DE, Steffes MW, et al. Hepatocellular transplantation for metabolic deficiencies: decrease of plasma bilirubin in Gunn rats. *Science* 1976;192:892-894.
89. Park SM, Vo K, Lallier M, et al. Hepatocyte transplantation in the Long Evans Cinnamon rat model of Wilson's disease. *Cell Transplant* 2006;15:13-22.
90. Yoshida Y, Tokusashi Y, Lee GH, Ogawa K. Intrahepatic transplantation of normal hepatocytes prevents Wilson's disease in Long-Evans cinnamon rats. *Gastroenterology* 1996;111:1654-1660.
91. Gupta S, Rajvanshi P, Lee CD. Integration of transplanted hepatocytes into host liver plates demonstrated with dipeptidyl peptidase IV-deficient rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:5860-5864.

92. Minato M, Houssin D, Demma I, et al. Transplantation of hepatocytes for treatment of surgically induced acute hepatic failure in the rat. *Eur Surg Res* 1984;16:162-169.
93. Sutherland DE, Numata M, Matas AJ, Simmons RL, Najarian JS. Hepatocellular transplantation in acute liver failure. *Surgery* 1977;82:124-132.
94. Mito M, Kusano M, Kawaura Y. Hepatocyte transplantation in man. *Transplant Proc* 1992;24:3052-3053.
95. Strom SC, Fisher RA, Rubinstein WS, et al. Transplantation of human hepatocytes. *Transplant Proc* 1997;29:2103-2106.
96. Gomez N, Balladur P, Calmus Y, et al. Evidence for survival and metabolic activity of encapsulated xenogeneic hepatocytes transplanted without immunosuppression in Gunn rats. *Transplantation* 1997;63:1718-1723.
97. Navarro-Alvarez N, Yamamoto T, Gutierrez AS, et al. Treatment of Acute Liver Failure in Mice by Hepatocyte Xenotransplantation. *Cell Transplant* 2010.
98. Kammer NN, Billecke N, Morgul MH, et al. Labeling of primary human hepatocytes with micron-sized iron oxide particles in suspension culture suitable for large-scale preparation. *Artif Organs* 2011;35:E91-E100.
99. Stephenne X, Najimi M, Sokal EM. Hepatocyte cryopreservation: is it time to change the strategy? *World J Gastroenterol* 2010;16:1-14.
100. Grimm J, Kircher MF, Weissleder R. [Cell tracking. Principles and applications]. *Radiologe* 2007;47:25-33.
101. Mas VR, Maluf DG, Thompson M, Ferreira-Gonzalez A, Fisher RA. Engraftment measurement in human liver tissue after liver cell transplantation by short tandem repeats analysis. *Cell Transplant* 2004;13:231-236.
102. Stephenne X, Najimi M, Sibille C, et al. Sustained engraftment and tissue enzyme activity after liver cell transplantation for argininosuccinate lyase deficiency. *Gastroenterology* 2006;130:1317-1323.
103. Puppi J, Modo M. Use of magnetic resonance imaging contrast agents to detect transplanted liver cells. *Top Magn Reson Imaging* 2009;20:113-120.
104. Landis CS, Yamanouchi K, Zhou H, et al. Noninvasive evaluation of liver repopulation by transplanted hepatocytes using ³¹P MRS imaging in mice. *Hepatology* 2006;44:1250-1258.

105. Tannous BA, Grimm J, Perry KF, et al. Metabolic biotinylation of cell surface receptors for in vivo imaging. *Nat Methods* 2006;3:391-396.
106. Blasberg RG, Gelovani J. Molecular-genetic imaging: a nuclear medicine-based perspective. *Mol Imaging* 2002;1:280-300.
107. Blocklet D, Toungouz M, Kiss R, et al. ¹¹¹In-oxine and ^{99m}Tc-HMPAO labelling of antigen-loaded dendritic cells: in vivo imaging and influence on motility and actin content. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003;30:440-447.
108. Gupta S, Lee CD, Vemuru RP, Bhargava KK. ¹¹¹Indium labeling of hepatocytes for analysis of short-term biodistribution of transplanted cells. *Hepatology* 1994;19:750-757.
109. Modo M. Noninvasive imaging of transplanted cells. *Curr Opin Organ Transplant* 2008;13:654-658.
110. Acton PD, Zhou R. Imaging reporter genes for cell tracking with PET and SPECT. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2005;49:349-360.
111. Zhao WD, Guan S, Zhou KR, et al. In vivo detection of metabolic changes by ¹H-MRS in the DEN-induced hepatocellular carcinoma in Wistar rat. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005;131:597-602.
112. de Vries IJ, Lesterhuis WJ, Barentsz JO, et al. Magnetic resonance tracking of dendritic cells in melanoma patients for monitoring of cellular therapy. *Nat Biotechnol* 2005;23:1407-1413.
113. Hoehn M, Wiedermann D, Justicia C, et al. Cell tracking using magnetic resonance imaging. *J Physiol* 2007;584:25-30.
114. Morgul MH, Raschzok N, Schwartlander R, et al. 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.
115. Brenner W, Aicher A, Eckey T, et al. ¹¹¹In-labeled CD34+ hematopoietic progenitor cells in a rat myocardial infarction model. *J Nucl Med* 2004;45:512-518.
116. De A, Lewis XZ, Gambhir SS. Noninvasive imaging of lentiviral-mediated reporter gene expression in living mice. *Mol Ther* 2003;7:681-691.
117. Bulte JW, Laughlin PG, Jordan EK, et al. Tagging of T cells with superparamagnetic iron oxide: uptake kinetics and relaxometry. *Acad Radiol* 1996;3 Suppl 2:S301-303.

118. Bulte JW, Ma LD, Magin RL, et al. Selective MR imaging of labeled human peripheral blood mononuclear cells by liposome mediated incorporation of dextran-magnetite particles. *Magn Reson Med* 1993;29:32-37.
119. Bulte JW, Zhang S, van Gelderen P, et al. Neurotransplantation of magnetically labeled oligodendrocyte progenitors: magnetic resonance tracking of cell migration and myelination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:15256-15261.
120. Engberink RD, van der Pol SM, Walczak P, et al. Magnetic resonance imaging of monocytes labeled with ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide using magnetoelectroporation in an animal model of multiple sclerosis. *Mol Imaging* 2010;9:268-277.
121. Josephson L, Tung CH, Moore A, Weissleder R. High-efficiency intracellular magnetic labeling with novel superparamagnetic-Tat peptide conjugates. *Bioconjug Chem* 1999;10:186-191.
122. Lewin M, Carlesso N, Tung CH, et al. Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. *Nat Biotechnol* 2000;18:410-414.
123. Arbab AS, Bashaw LA, Miller BR, et al. Intracytoplasmic tagging of cells with ferumoxides and transfection agent for cellular magnetic resonance imaging after cell transplantation: methods and techniques. *Transplantation* 2003;76:1123-1130.
124. Schafer R, Kehlbach R, Wiskirchen J, et al. Transferrin receptor upregulation: in vitro labeling of rat mesenchymal stem cells with superparamagnetic iron oxide. *Radiology* 2007;244:514-523.
125. Stroh A, Boltze J, Sieland K, et al. Impact of magnetic labeling on human and mouse stem cells and their long-term magnetic resonance tracking in a rat model of Parkinson disease. *Mol Imaging* 2009;8:166-178.
126. Schafer R, Ayturan M, Bantleon R, et al. The use of clinically approved small particles of iron oxide (SPIO) for labeling of mesenchymal stem cells aggravates clinical symptoms in experimental autoimmune encephalomyelitis and influences their in vivo distribution. *Cell Transplant* 2008;17:923-941.
127. Kalish H, Arbab AS, Miller BR, et al. Combination of transfection agents and magnetic resonance contrast agents for cellular imaging: relationship between relaxivities, electrostatic forces, and chemical composition. *Magn Reson Med* 2003;50:275-282.

128. Bernas LM, Foster PJ, Rutt BK. Magnetic resonance imaging of in vitro glioma cell invasion. *J Neurosurg* 2007;106:306-313.
129. Shapiro EM, Sharer K, Skrtic S, Koretsky AP. In vivo detection of single cells by MRI. *Magn Reson Med* 2006;55:242-249.
130. Hussain SP, Raja K, Amstad PA, et al. Increased p53 mutation load in nontumorous human liver of wilson disease and hemochromatosis: oxyradical overload diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:12770-12775.
131. Tong X, Kawabata H, Koeffler HP. Iron deficiency can upregulate expression of transferrin receptor at both the mRNA and protein level. *Br J Haematol* 2002;116:458-464.
132. Williams GM, Weisburger EK, Weisburger JH. Isolation and long-term cell culture of epithelial-like cells from rat liver. *Exp Cell Res* 1971;69:106-112.
133. Andriopoulos B, Hegedusch S, Mangin J, et al. Sustained hydrogen peroxide induces iron uptake by transferrin receptor-1 independent of the iron regulatory protein/iron-responsive element network. *J Biol Chem* 2007;282:20301-20308.
134. Hershko C, Peto TE. Non-transferrin plasma iron. *Br J Haematol* 1987;66:149-151.
135. Bulte JW. In vivo MRI cell tracking: clinical studies. *AJR Am J Roentgenol* 2009;193:314-325.
136. Louie AY, Huber MM, Ahrens ET, et al. In vivo visualization of gene expression using magnetic resonance imaging. *Nat Biotechnol* 2000;18:321-325.

Publikationsliste

Raschzok N, Muecke DA, Adonopoulou MK, Billecke N, Werner W, Kammer NN, Zielinski A, Behringer PA, Ringel F, Huang MD, Neuhaus P, Teichgräber U, Sauer IM. In vitro evaluation of magnetic resonance imaging contrast agents for labeling human liver cells: implications for clinical translation. Mol Imaging Biol 2011;13:613-22.