

Aus der chirurgischen Klinik
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Der Einfluss des Magnetfelds eines klinischen
Magnetresonanztomographen auf Eisenpartikel-markierte
Leberzellen

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Martin Kluge

aus Oldenburg

Datum der Promotion: 23.06.2019

Inhaltsverzeichnis

1. Abstract	3
1.1 Abstract	3
1.2 Abstract	5
2. Eidesstattliche Versicherung	7
3. Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Promotion	8
4. Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of Knowledge)	10
5. Druckexemplar der ausgewählten Publikation	11
6. Lebenslauf	20
7. Vollständige Publikationsliste	22
8. Danksagung	24

1 Abstract

1.1 Abstract

Introduction: Cell based therapies - like the human hepatocyte transplantation - are a promising therapeutic option for various diseases and might present a future alternative to whole organ transplantation. However, several obstacles have to be overcome in order to improve those therapies. A major hurdle improving the hepatocyte transplantation is the mostly unclear fate of transplanted cells in the recipient's body after transplantation. Cell-labelling using silica-based micrometre-sized iron oxide particles (sMPIO) enables cell tracking through magnetic resonance imaging (MRI) and might help explaining the mechanisms of cell transplantation. Even though cell labelling with iron oxide particles is a widely used method in research, until now it is mostly unclear if iron oxide particles can provoke harmful side effects and cell damage under the influence of magnetic fields of MRI systems.

Methods: In order to investigate dose dependent effects HuH7 cells were incubated with increasing concentrations of sMPIO (40-160 particles/cell) and underwent MRI stimulation in a clinical 3.0 Tesla MRI with T1- and T2-weighted sequences immediately after incubation. As control, groups of labelled and native cells were kept at room temperature without exposure to a magnetic field. Viability was assessed 24 and 48 hours after MRI. Freshly isolated primary human hepatocytes were incubated with 100 particles/cell and underwent MRI as well. We assessed cell viability, formation of reactive oxygen species (ROS), aspartate and alanine aminotransferase leakage and urea and albumin synthesis for a culture period of 5 days. Light microscopy (Axiovert 40CFL; Zeiss, Oberkochen, Germany) was performed to analyse particle uptake and cell morphology before and after MRI.

Results: The dose finding study showed no adverse effects of sMPIO on labelled HuH7 cells independent from particle load or magnetic field. MRI showed no adverse effects on cell morphology on both, HUH7 and primary human hepatocytes. Furthermore, the magnetic field nor the sMPIO alone affected cell viability, formation of ROS, aspartate and alanine aminotransferase leakage and urea and albumin synthesis of primary human hepatocytes.

Conclusion: In this study we could show that sMPIO do not induce adverse effect on labelled cells, neither alone nor under the influence of magnetic field of clinical used MRI systems.

These results show that MRI-based cell tracking using sMPIO can be used to investigate the mechanism of cell transplantation and can contribute to the optimization of cell-based therapies.

Modified from:

Kluge M, Leder A, Hillebrandt KH, Struecker B, Geisel D, Denecke T, Major RD, Reutzel-Selke A, Tang P, Lippert S, Schmidt C, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N. The magnetic field of magnetic resonance imaging systems does not affect cells labeled with micrometer-sized iron oxide particles. *Tissue Eng Part C Methods*. 2017, 7, 412-421.

1.2 Abstract

Einleitung: Zell-basierte Therapien, wie beispielsweise die Transplantation humaner Hepatozyten, stellen vielversprechende Therapieoptionen für eine Vielzahl von Erkrankungen dar. Während die Transplantation von Hepatozyten vor allem als Überbrückung zur Lebertransplantation bei Neugeborenen mit schweren Stoffwechseldefekten der Leber eingesetzt wird, könnte sie künftig auch die Transplantation ganzer Organe ersetzen. Um Zell-basierte Therapien weiter zu verbessern ist, jedoch ein besseres Verständnis über das Schicksal der Zellen im menschlichen Körper nach der Transplantation notwendig. Die Markierung der Zellen mit superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln (sMPIO) ermöglicht es, die Hepatozyten auch nach Transplantation mittels Magnetresonanztomographie (MRT) im Körper des Empfängers nachzuverfolgen. Obwohl die Zellmarkierung mit sMPIO eine in der Forschung weit verbreitete Methode darstellt, ist bislang weitestgehend unklar, ob Eisenoxidpartikel im Magnetfeld eines klinischen MRT zelltoxische Effekte entwickeln.

Methoden: Um dosisabhängige Effekte zu studieren wurden Zellen einer HuH7-Zellreihe mit aufsteigenden Konzentration (40-160 Partikel/Zelle) inkubiert und anschließend dem Magnetfeld eines 3,0-Tesla MRT mit T1- und T2-gewichteten Sequenzen ausgesetzt. Die Zellviabilität wurde 24 und 48 Stunden danach bestimmt. Primäre humane Hepatozyten wurden mit einer Konzentration von 100 Partikeln pro Zell inkubiert und ebenfalls einer MRT-Untersuchung unterzogen. Über einen Zeitraum von 5 Tagen wurden Zellviabilität, reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), Aspartat- und Alaninaminotransferase und Urea- und Albuminsynthese gemessen. Als Kontrollen dienten in beiden Versuchsreihen sowohl native Zellen, die eine MRT-Untersuchung unterliefen, als auch native sowie Partikel-markierte, die ohne MRT-Untersuchung kultiviert wurden. Lichtmikroskopie wurde vor und nach der MRT-Untersuchung durchgeführt, um Partikelaufnahme und Zellmorphologie zu untersuchen.

Ergebnisse: Unabhängig von der Partikel-Konzentration ließen sich in den Versuchen mit HuH7-Zellen keine negativen Auswirkungen auf die Zellviabilität feststellen. Ebenso ließen sich keine Veränderungen der Zellmorphologie, sowohl bei den Versuchen mit der HuH7-Zellreihe, als auch mit primären humanen Hepatozyten nachweisen. Im Versuch mit primären humanen Hepatozyten fanden wir keine Veränderung der Sekretion von Aspartat- und Alaninaminotransferase, weder durch die Markierung mit sMPIO allein, noch durch sMPIO-Markierung und der Einwirkung des Magnetfelds des MRT. Gleichmaßen wurden auch die Bildung von ROS, die Albumin- und Harnstoffsynthese und die Zellviabilität, im Vergleich zu nativen primären Hepatozyten, nicht beeinträchtigt.

Schlussfolgerung: In dieser Studie konnten wir zeigen, dass die Zellmarkierung mit sMPIO keine negativen Effekte auf die Zellen ausübt, weder durch die Partikel alleine noch in Kombination mit dem Magnetfeld eines klinischen 3-Tesla MRT. Unsere Ergebnisse zeigen, dass sich sMPIO zur Markierung von Zellen und deren Nachverfolgung nach einer Zelltransplantation mithilfe einer MRT-Bildgebung, eignen. Diese Methode kann in Zukunft helfen, die bislang zu großen Teilen unbekannt Mechanismen der Zelltransplantation im Körper des Empfängers zu entschlüsseln.

Modifiziert nach:

Kluge M, Leder A, Hillebrandt KH, Struecker B, Geisel D, Denecke T, Major RD, Reutzel-Selke A, Tang P, Lippert S, Schmidt C, Pratschke J, Sauer IM, Raschok N. The magnetic field of magnetic resonance imaging systems does not affect cells labeled with micrometer-sized iron oxide particles. *Tissue Eng Part C Methods*. 2017, 7, 412-421.

2. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Martin Kluge, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *„Der Einfluss des Magnetfelds eines klinischen Magnetresonanztomographen auf Eisenpartikel-markierte Leberzellen“* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet. Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben ist.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Berlin, den 07.04.2018

Unterschrift

3. Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Promotion

Publikation: Kluge M, Leder A, Hillebrandt KH, Struecker B, Geisel D, Denecke T, Major RD, Reutzel-Selke A, Tang P, Lippert S, Schmidt C, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N. The magnetic field of magnetic resonance imaging systems does not affect cells labeled with micrometer-sized iron oxide particles. Tissue Eng Part C Methods. 2017, 7, 412-421.

Beitrag im Einzelnen

Versuchsvorbereitung

Erlernen der humanen Leberzellisolierung.

Planung der Versuche und entsprechenden Analyseverfahren mit primären humanen Hepatozyten und an der HuH7-Zellreihe.

Ansetzen aller, für die Versuche und späteren Analyseverfahren, notwendigen Lösungen.

Versuche

Selbstständige Durchführung aller Experimente (n=6):

1. Versuche mit der HuH7 Zellreihe
 - Zellkultur und Zellexpansion von HuH7 Zellen.
 - Inkubation mit sMPIO zu Beginn jedes Versuchs, mit aufsteigenden Partikelkonzentrationen.
 - Regelmäßige Pflege der Zellkultur.
 - Überwachung des Transports zum MRT und der Durchführung der Stimulation im 3-Tesla MRT.
 - Entnahme von Proben an den entsprechenden Zeitpunkten zur Viabilitätsanalyse.
2. Versuche mit primären humanen Hepatozyten
 - Entnahme von Gewebeproben aus humanen Leberresektaten.
 - Durchführung der Leberzellisolierung zur Gewinnung primärer humaner Hepatozyten.
 - Zellkultur und Pflege der humanen Hepatozyten während der gesamten Versuchsdauer.
 - Inkubation der primären humanen Hepatozyten mit sMPIO (Konzentration 100 Partikel/Zelle).
 - Mikroskopische Kontrolle der erfolgreichen Partikelmarkierung.
 - Überwachung des Transports zum MRT und der Durchführung der Stimulation im 3-Tesla MRT.

- Entnahme von Proben an den entsprechenden Zeitpunkten zur Viabilitätsanalyse, Bestimmung der Formierung reaktiver Sauerstoffspezies, Transaminasenbestimmung, sowie Albumin- und Ureasythese.

Probenanalyse:

- Analyse der Zellviabilität mit Hilfe von Lumineszenz-Messungen an HuH7 Zellen und primären humanen Hepatozyten.
- Messung der Sekretion von Aspartataminotransferase und Alaninaminotransferase mit Hilfe von photometrischen Verfahren.
- Bestimmung der reaktiven Sauerstoffspezies durch Fluoreszenzmessung mit der Chloromethyl-2',7'-dichlorofluorescein-diacetate Nachweismethode.
- Bestimmung der Ureasythese durch photometrische Messungen.
- Messung der Albuminsynthese mit Hilfe eines ELISA-Tests.

Auswertung

- Statistische Auswertung der erhobenen Daten mit GraphPad Prism 6.0, sowie die Interpretation der Ergebnisse.

Manuskript

- Literaturrecherche, Anfertigung des Manuskripts, Mitarbeit bei der Erstellung der Abbildungen, selbstständige Bearbeitung der Revision.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

4. Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of Knowledge)

Tissue Engineering hat Rang 42 von 158 in der Kategorie „biotechnology & applied microbiology“. IF (2016): 3,485; Eigenfactor (2016): 0,02887

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2016** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **“BIOTECHNOLOGY and APPLIED MICROBIOLOGY”**
 Selected Category Scheme: WoS
Gesamtanzahl: 158 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY	28,750	57.000	0.060820
2	NATURE BIOTECHNOLOGY	53,992	41.667	0.169930
3	GENOME RESEARCH	36,644	11.922	0.114230
4	GENOME BIOLOGY	28,862	11.908	0.095240
5	TRENDS IN BIOTECHNOLOGY	13,211	11.126	0.020020
6	BIOTECHNOLOGY ADVANCES	14,128	10.597	0.023860
7	CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY	13,407	9.294	0.028300
8	METABOLIC ENGINEERING	5,665	8.142	0.015300
9	BIOSENSORS & BIOELECTRONICS	41,829	7.780	0.064430
10	PLANT BIOTECHNOLOGY JOURNAL	5,968	7.443	0.014100
11	BIOINFORMATICS	83,508	7.307	0.183610
12	MOLECULAR THERAPY	15,093	6.688	0.032410

....

36	Microbial Cell Factories	4,940	3.681	0.012890
37	Journal of Biological Engineering	637	3.660	0.001670
38	CANCER GENE THERAPY	2,756	3.652	0.003630
39	Biotechnology Journal	4,109	3.649	0.010380
40	Microbial Biotechnology	2,039	3.513	0.005380
41	Stem Cell Research	2,401	3.494	0.008070
42	TISSUE ENGINEERING	19,661	3.485	0.028870
43	APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY	36,332	3.420	0.051490
44	Current Opinion in Chemical Engineering	986	3.403	0.003710
45	FEMS YEAST RESEARCH	3,711	3.299	0.005830
46	BIOMASS & BIOENERGY	18,312	3.219	0.027960
47	CYTOTHERAPY	4,952	3.203	0.008800

Quelle:

https://intranet.charite.de/medbib/impact_faktoren_2016_fuer_zeitschriften_nach_fachgebiet_en/, abgerufen am 08.02.2018 um 19:29 Uhr

5. Druckexemplar der ausgewählten Publikation

Kluge M, Leder A, Hillebrandt KH, Struecker B, Geisel D, Denecke T, Major RD, Reutzel-Selke A, Tang P, Lippert S, Schmidt C, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N. The magnetic field of magnetic resonance imaging systems does not affect cells labeled with micrometer-sized iron oxide particles. *Tissue Eng Part C Methods*. 2017, 7, 412-421.

<https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2017.0118>

6. Lebenslauf

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

7. Vollständige Publikationsliste

1. Human Hepatocyte Isolation: Does Portal Vein Embolization Affect the Outcome?, **Kluge M**, Reutzel-Selke A, Napierala H, Hillebrandt KH, Major RD, Struecker B, Leder A, Siefert J, Tang P, Lippert S, Sallmon H, Seehofer D, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N. *Tissue Eng Part C Methods*, 2016, 22(1):38-48.
2. Hepatocyte Isolation After Laparoscopic Liver Resection. Horner R*, **Kluge M***, Gassner J, Nösser M, Major RD, Reutzel-Selke A, Leder AK, Struecker B, Morgul MH, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N. *Tissue Eng Part C Methods*, 2016, 22(9):839-46.

*both authors contributed equally to this work
3. Evolution of graft morphology and function after recellularization of decellularized rat livers. Butter A, Aliyev K, Hillebrandt KH, Raschzok N, **Kluge M**, Seiffert N, Tang P, Napierala H, Ashraf MI, Reutzel-Selke A, Andreou A, Pratschke J, Sauer IM, Struecker B. *Tissue Eng Regen Med*, 2016, E-published ahead of print.
4. Engineering an endocrine Neo-Pancreas by repopulation of a decellularized rat pancreas with islets of Langerhans. Napierala H, Hillebrandt KH, Haep N, Tang P, Tintemann M, Gassner J, Noesser M, Everwien H, Seiffert N, **Kluge M**, Teegen E, Polenz D, Lippert S, Geisel D, Reutzel Selke A, Raschzok N, Andreou A, Pratschke J, Sauer IM, Struecker B. *Sci Rep*, 2017, E-published ahead of print.
5. The magnetic field of magnetic resonance imaging systems does not affect cells labeled with micrometer-sized iron oxide particles. **Kluge M**, Leder A, Hillebrandt KH, Struecker B, Geisel D, Denecke T, Major RD, Reutzel-Selke A, Tang P, Lippert S, Schmidt C, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N. *Tissue Eng Part C Methods*, 2017, 23(7): 412-21.

6. Computed tomography-based survey of the vascular anatomy of the juvenile Göttingen minipig. Siefert J, Hillebrandt KH, **Kluge M**, Geisel D, Podrabsky P, Denecke T, Nösser M, Gassner J, Reutzel-Selke A, Strücker B, Morgul MH, Guel-Klein S, Unger JK, Reske A, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N. *Lab Animal*, 2017, 51(4):388-96.

7. The predictive value of the maximal liver function capacity test for isolation of primary human hepatocytes. Major DR*, **Kluge M***, Jara M, Nösser M, Horner R, Gassner J, Struecker B, Tang P, Lippert S, Reutzel-Selke A, Geisel D, Denecke T, Stockmann M, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N. Submitted to *Tissue Engineering Part C*.

*both authors contributed equally to this work

8. Danksagung

Zunächst möchte ich mich an dieser Stelle bei meinem Betreuer PD Dr. Nathanael Raschzok bedanken, der mich während der gesamten Dauer der Promotion jederzeit hervorragend beraten hat und stets für jedes Problem eine Lösung parat hatte. Ebenso gilt ein großer Dank meinem betreuenden Hochschullehrer Prof. Dr. Igor M. Sauer, der sich jederzeit für alle Projekte an denen ich während meiner Promotion gearbeitet habe mit großartiger Unterstützung und klugem Rat eingebracht hat. Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei unseren labortechnischen Assistenten Peter Tang und Steffen Lippert für die große Hilfe beim Erlernen von Analysemethoden und bei der Durchführung von Versuchen bedanken. Ebenso danke ich Dr. Anja Reutzel-Selke für die Unterstützung bei der statistischen Analyse und die große Geduld die sie mir und allen anderen Doktoranden unserer Arbeitsgruppe entgegen gebracht hat. Außerdem danke ich den Doktoranden und Doktorandinnen Karl Hillebrandt, Jeffrey Siefert, Joseph Gassner, Rebeka Major und Rosa Horner, die durch ihre Freundschaft und die gegenseitige Unterstützung bei der Arbeit die Promotion zu einer sehr schönen Zeit gemacht haben.

Außerdem möchte ich unserem Kooperationspartner Dr. Christian Schmidt von Microparticles Berlin für die freundliche Bereitstellung der Eisenoxidpartikel danken.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und Freunden für ihre Unterstützung, Aufmunterung und auch gelegentliche Ablenkung danken. Ein ganz besonderer Dank gilt hierbei meiner Freundin Rebeka Major, die mich zu jeder Zeit sowohl privat als auch im Labor unterstützt, aufgemuntert und immer wieder motiviert hat und immer für mich da war.