

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

DISSERTATION

*Evaluierung eines Silizium basierten Eisenoxidpartikels als
intrazelluläres Magnetresonanzkontrastmittel für die
Leberzelltransplantation*

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Carolin Marie Langer

aus Eisenhüttenstadt, Deutschland

Datum der Promotion: 12.09.2014

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Abstrakt	4
2. Einleitung	
2.1. Erworbenes und Hereditäres Leberversagen	6
2.2. Lebertransplantation und Leberersatzverfahren	7
2.3. Leberzelltransplantation	8
2.4. Darstellung transplanteder Zellen mittels nicht invasiven bildgebenden Verfahren	12
2.5. Zelldetektion mittels Magnetresonanztomographie	13
2.6. Eisenoxidpartikel als Intrazelluläres Kontrastmittel	15
2.6.1. Nanometerskalige Eisenoxidpartikel	16
2.6.2. Mikrometerskalige Eisenoxidpartikel	16
2.6.3. Problematik	17
2.7. Fragestellung	19
3. Material und Methoden	
3.1. Liste der Materialien	21
3.1.1. Silizium basierte mikrometerskalige Eisenoxidpartikel	21
3.1.2. Zellisolierung und Zellkultur	21
3.1.3. Fluoreszenzfärbung	23
3.1.4. Toxizitätsstudien	23
3.1.5. Magnetresonanztomographie	23
3.2. Silizium basierte mikrometerskalige Eisenoxidpartikel	23
3.3. Partikelcharakterisierung	24
3.4. Zellisolation und Zellkultur	25
3.4.1. Huh7 Zellen	25
3.4.2. Primäre humane Hepatozyten	25
3.4.3. Primäre Rattenhepatozyten	27
3.5. Zellmarkierung mit sMPIO	28
3.6. Untersuchung der Partikelaufnahme und Toxizitätsstudien	29
3.6.1. Quantifizierung der Partikelaufnahme	29
3.6.2. Verifizierung der intrazellulären Lokalisation der sMPIO	29
3.6.3. Toxizitätsstudien	30

3.7. Magnetresonanztomographie und T2 maps	30
3.8. Schädigungs- und Syntheseparameter sMPIO markierter Zellen	31
3.9. Statistik	32
4. Ergebnisse	
4.1. Morphologie der sMPIO	33
4.2. Toxizitätsstudien mit markierten Huh7 Zellen	33
4.3. Markierung von Huh7 Zellen	34
4.4. Detektion der markierten Huh7 Zellen mittels 3,0 Tesla MRT	35
4.5. Markierung und Detektion von humanen primären Hepatozyten	38
4.6. Toxizitätsstudien mit markierten primären Leberzellen	39
5. Diskussion	42
6. Abkürzungsverzeichnis	52
7. Literatur	54
8. Eidesstattliche Versicherung	62
9. Lebenslauf	63

1. Abstrakt

Einleitung: Die Einschätzung des Behandlungserfolges einer therapeutischen Leberzelltransplantation, welche anhand von laborchemischen Parametern nicht vollständig zu erfassen ist, macht eine nicht invasive Visualisierung der transplantierten Zellen notwendig. Mikrometerskalige Eisenoxidpartikel können im Gegensatz zu kleineren nanometerskaligen Eisenoxidpartikeln einen starken Kontrast in der Magnetresonanztomographie (MRT) generieren und sind daher als intrazelluläres Kontrastmittel zur Zelldetektion unter klinischen Bedingungen sehr gut geeignet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Silizium basierter mikrometerskaliger Eisenoxidpartikel (sMPIO) für die intrazelluläre Markierung von Leberzellen *in vitro* evaluiert.

Material und Methoden: Die Partikel wurden mit einem Magnetitgehalt von > 40 % mittels eines Sol- Gel Prozesses gefertigt. Die Oberfläche wurde mit Carboxygruppen (COOH) beschichtet, an welche kovalent Fluoreszin, Poly- L- Lysine (PLL) und Streptavidin (SA) gebunden wurden. Die monodispersen Partikel haben eine mittlere Größe von 1,18 µm und einen Eisengehalt von 1,0 pg Eisen/ Partikel. Die zelluläre Partikelaufnahme, die Bildgebung und die Effekte der Markierung auf die Zellen wurden an adhärennten Zellkulturen mit Huh7 Zellen, primären Rattenhepatozyten und primären humanen Hepatozyten untersucht.

Ergebnisse: Die zelluläre Aufnahme der Partikel erfolgte innerhalb einer Inkubationszeit von vier Stunden. Die PLL- modifizierten Partikel zeigten die größte intrazelluläre Aufnahme. In T2* gewichteten Bildern eines 3,0 Tesla MRT waren 1.000 markierte Zellen und in einer T1 gewichteten LAVA Sequenz 10.000 markierte Zellen nötig, um einen suffizienten Kontrast im MRT zu generieren. Die Markierung war über die Kultivierungsperiode stabil und zeigte keine schädigenden Einflüsse auf die markierten Zellen.

Diskussion: Silizium ist ein biokompatibles Material welches bereits für den klinischen Gebrauch zugelassen wurde. Die sMPIO sind nicht toxisch, sie ermöglichen eine rasche zelluläre Markierung und generieren einen suffizienten MR Kontrast. Daher sind sie besonders für eine klinische Applikationen und zur Generierung eines starken MR Kontrastes bei der zellulären Bildgebung geeignet. Die Oberfläche der sMPIO bietet die Möglichkeit zu einer variablen Partikelmodifikation und Entwicklung multifunktionaler theranostischer Partikel für die diagnostische Bildgebung und gezielte pharmazeutische Substratlieferung.

Abstract

Introduction: Cellular therapies require methods for noninvasive visualization of transplanted cells. Micron-sized iron oxide particles (MPIO) generate a strong contrast in magnetic resonance imaging (MRI) and are therefore ideally suited as an intracellular contrast agent to image cells under clinical conditions. However, MPIO were previously not applicable for clinical use. Here, we present the development and evaluation of silica-based micron-sized iron oxide particles (sMPIO) with a functionalizable particle surface.

Materials and Methods: Particles with magnetite content of > 40 % were composed using the sol- gel process. The particle surfaces were covered with COOH groups. Fluorescein, poly- L- lysine (PLL), and streptavidin (SA) were covalently attached. Monodisperse sMPIO had an average size of 1.18 μm and an iron content of about 1.0 pg iron/ particle. Particle uptake, toxicity, and imaging studies were performed using HuH7 cells and human and rat hepatocytes.

Results: sMPIO enabled rapid cellular labeling within 4 h of incubation; PLL- modified particles had the highest uptake. In T2*- weighted 3.0 Tesla MRI, the detection threshold in agarose was 1000 labeled cells, whereas in T1-weighted LAVA sequences, at least 10000 cells were necessary to induce sufficient contrast. Labeling was stable and had no adverse effects on labeled cells.

Conclusion: Silica is a biocompatible material that has been approved for clinical use. sMPIO could therefore be suitable for future clinical applications in cellular MRI, especially in settings that require strong cellular contrast. Moreover, the particle surface provides the opportunity to create multifunctional particles for targeted delivery and diagnostics.

2. Einleitung

Die Leber ist das zentrale Stoffwechselorgan des menschlichen Organismus. Zu den lebenswichtigen Stoffwechsellleistungen gehören die Synthese von Blut- und Gerinnungsproteinen für die Hämostase, die Speicherung von Glykogenen und Vitaminen und die Regulation des Säure-, Basen- und des Aminosäurehaushaltes. Daneben nimmt die Leber eine wichtige Monopolstellung bei dem Abbau, der Entgiftung und der Ausscheidung körpereigener und körperfremder Substanzen ein. Als exokrine Drüse produziert die Leber die Galle, welche aus konjugierten Gallensäuren, Bilirubin, Phospholipiden und ausscheidungspflichtigen Xenobiotika besteht und über Gallengänge in den Darm abgegeben wird, wo sie einen wichtigen Anteil an der Fettverdauung hat. Ein Leistungsverlust der Leber hat weitreichende Konsequenzen für den Metabolismus und die Funktionsfähigkeit des gesamten Organismus (1, 2).

2.1. Erworbenes und Hereditäres Leberversagen

Das akute Leberversagen ist die klinische Manifestation einer plötzlichen und schwerwiegenden Schädigung der Leber durch unterschiedliche virale, toxische oder idiopathische Ursachen. Der Verlust der metabolischen Funktion kann zu einer Koagulopathie, einer hepatischen Enzephalopathie mit veränderter Gehirnfunktion und veränderten Bewusstsein innerhalb weniger Wochen und in vielen Fällen durch einen progressiven Verlauf zu einer Sepsis mit multiplen Organversagen führen. Die Inzidenz des akuten Leberversagens beträgt weltweit in den Industriestaaten zwischen 1 und 6 Fällen pro Million Einwohner pro Jahr. Je nach Ätiologie versterben bis zu 80 Prozent der Patienten während eines akuten Leberversagens oder benötigen eine Transplantation. Dabei ist eine hohe Mortalität mit einem stark ausgeprägten Ikterus, mit steigender Transaminasenkonzentration im Blut, mit steigendem Patientenalter und mit der Entwicklung einer intrakraniellen Hypertension assoziiert (2, 3, 4, 5).

Das chronische Leberversagen stellt im Vergleich zu einem akuten Funktionsverlust eine andauernde Insuffizienz der Leber dar, welche jedoch exazerbieren und zu einem akuten Leberversagen führen kann („acute- on- chronic liver failure“) (2). Die Leberfibrose und Leberzirrhose aufgrund von chronischen Alkoholmissbrauch und viralen Hepatiditen repräsentieren eine häufige Pathogenese der chronischen

Lebererkrankungen (6). Patienten mit lebensbedrohlichen angeborenen leberbasierten Stoffwechseldefekten, in deren Pathogenese meist der Funktionsverlust eines einzelnen Enzymes oder Gens bei sonst physiologischer Organfunktion ausschlaggebend ist, sind ebenfalls abhängig von einer intensiven medizinischen Betreuung. So kann die Prognose von Kindern mit angeborenen Harnstoffzyklusdefekt zwar erheblich durch pharmakologische und diätetische Maßnahmen verbessert werden, dennoch können diese Verfahren eine metabolische Dekompensation nicht verhindern, welche zu Hirnschäden und bei einem Großteil der Patienten zum Tod führen kann (4, 7).

Alle diese Erkrankungen der Leber haben gemeinsam, dass sie unbehandelt zu einem akuten oder chronischen Leberversagen führen können und die Lebensqualität der Patienten stark einschränken oder sie dauerhaft nicht mit dem Leben vereinbar sind.

2.2. Lebertransplantation und Leberersatzsysteme

Der bisherige Therapieansatz bei einem Funktionsverlust der Leber ist im Allgemeinen kausaler und unterstützender Natur. Die orthotope Lebertransplantation, bei der ein Spenderorgan an die Stelle der erkrankten Leber transplantiert wird, gilt beim Ausbleiben des Erfolges durch konservative Methoden als therapeutischer Goldstandard und bietet bisher die einzige kurative Therapie bei akuten, chronischen oder angeborenen metabolischen Erkrankungen der Leber (2, 3).

Aktuell stehen in der Bundesrepublik Deutschland 12.000 Patienten auf der Warteliste für eine Organtransplantation. Statistischen Daten zufolge versterben täglich drei Patienten, ohne rechtzeitig ein passendes Organ zu erhalten. Im Jahr 2011 wurden bundesweit 1.792 Neuanmeldungen auf der Warteliste für eine Lebertransplantation registriert, jedoch nur 1.199 Transplantationen durchgeführt. 2012 ist die Zahl der Organspenden im Vergleich zum Vorjahr nochmals gesunken. Im Durchschnitt haben lediglich 12,8 Personen pro eine Million Einwohner ein Organ gespendet. Spenderorgane von Angehörigen eines Patienten stellen eine Alternative zu den Kadaverorganen dar. Dabei ist die Fünf- Jahres- Funktionsrate nach einer Leberteilspende mit 55 Prozent vorteilhafter als die von postmortal gespendeten Lebern (52,4 Prozent Fünf- Jahres- Funktionsrate). Jedoch können diese Teillebern nur in 30 Prozent der Fälle aufgrund von Blutinkompatibilitäten, Größendiskrepanzen oder multiplen Vorerkrankungen des Spenders genutzt werden. Die Invasivität der Transplantation, welche mit einem großen chirurgischen operativen Eingriff sowohl

für den potenziellen Lebendspender als auch für den Empfänger assoziiert ist, limitiert zusätzlich die Anwendung und trägt dazu bei, dass die Mortalität aufgrund eines Leberversagens weiterhin hoch bleibt (8, 9).

Temporäre Unterstützungssysteme, welche die Notwendigkeit einer Organersatztherapie verhindern beziehungsweise aufschieben können, sind in der klinischen Praxis bei Patienten mit terminalen Nierenversagen oder kardialer Insuffizienz etabliert. Als Alternative zur Organtransplantation bei Versagen der Leber wurden in der Vergangenheit zahlreiche Ersatzsysteme präklinisch und klinisch evaluiert. Dabei soll die Zeit bis zur geeigneten Transplantation überbrückt oder im Idealfall der akut erkrankten Leber die Möglichkeit zur *Restitutio at integrum* gegeben werden. Der Theorie zufolge tragen albumingebundene Toxine zur Pathogenese der hämodynamischen Instabilität und des Multiorganversagen bei einem Funktionsverlust der Leber bei. Die Fähigkeit solche Moleküle zu binden, ist die Basis für die Albumindialyse. Die entwickelten artifiziellen Verfahren (z.B. Molecular Absorbent and Recirculating System, MARS; Prometheus) die in der Lage sind, albumingebundene Toxine bei Patienten mit Leberversagen zu dialysieren, konnten jedoch keinen Benefit für das Überleben der Patienten zeigen. Dabei spielt das Unvermögen, die komplexen synthetischen und metabolischen Leberfunktionen durch ein künstliches Gerät zu substituieren eine große Rolle, was dazu geführt hat, dass sich die Nutzung von Leberunterstützungssystemen nicht in der klinischen Anwendung etablieren konnte (4, 10).

2.3. Leberzelltransplantation

Die Zelltherapie ist die Nutzung von transplantierten Zellen in der regenerativen Medizin. Das Feld der zellbasierten Therapie blüht immer mehr auf und könnte in naher Zukunft in vielen medizinischen Bereichen eine Standardbehandlung werden, welche sich beispielsweise mit Gewebeschäden, neurodegenerativen Erkrankungen oder Krebsbehandlungen beschäftigen. Das Ziel der Zelltherapie in der Transplantationsmedizin ist bei der Behandlung von akuten, chronischen oder metabolischen Erkrankungen die fehlende Funktion zu ersetzen, ohne das ganze Organ austauschen zu müssen (11, 12).

Potenziell unerwünschte Folgen und Risiken, hervorgerufen durch die Eröffnung der Bauchhöhle im Fall der Leber, können durch eine Zelltherapie reduziert werden. Zudem können durch eine Spenderleber mehrere Empfänger mit deren Zellen

versorgt werden. Bei der Leberzelltransplantation werden funktionsfähige Zellen durch eine minimal invasive perkutane Punktion in die Portalvene oder das Milzparenchym appliziert. Dieses Vorgehen ist mit weniger Risiken vor allem für schwer kranke und ältere Patienten verbunden und die Kosten sind geringer als bei einem abdominalen Eingriff (13,14). Darüber hinaus sind einige Patienten keine geeigneten Kandidaten für eine orthotope Lebertransplantation wegen zugrunde liegender medizinischer, technischer oder psychischer Kontraindikationen und erhalten daher nur schwer einen Zugang zu der Warteliste für eine Organtransplantation (5). Da die Empfängerleber bei einer Leberzelltransplantation nicht entfernt wird, müssen die transplantierten Zellen nur einige Funktionen der versagenden Leber unterstützen und nicht die gesamte Leberfunktion ersetzen.

Humane primäre Hepatozyten können durch verschiedene Perfusionstechniken aus Spenderorganen gewonnen werden, welche für eine orthotope Lebertransplantation aufgrund von zu langen kalten oder warmen Ischämiezeiten, zu hohen Fettanteilen, Schädigungen von Blutgefäßen, Gallengängen oder der Kapsel nicht für eine Organtransplantation geeignet sind. Nach der Perfusion des Organes mit einer Enzymlyse, bei der die Hepatozyten von dem umgebenden extrazellulären Gewebe durch Kollagenasen enzymatisch getrennt werden, können die Zellen nach einigen Reinigungsschritten *in vitro* kultiviert oder *in vivo* appliziert werden. Da maximal fünf Prozent der theoretischen Lebermasse als Zellsuspension transplantiert werden, kann die Anzahl der aus einer Spenderleber gewonnenen Leberzellen für mehrere Empfänger verwendet werden. Die Funktion der Zellen kann nach ihrer Gewinnung bei einer Lagerung von - 180°C für bis zu acht Monate beibehalten werden (5, 13, 14).

Die Aufbereitung der Zellen außerhalb des Organismus *in vitro* erlaubt im Bedarfsfall die immunologische oder genetische Manipulation vor der Transplantation. In einer 1992 und 1994 veröffentlichten Studie von Grossman et al. wurde zum ersten Mal der Versuch unternommen, Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie durch eine Transplantation von genetisch veränderten autologen Hepatozyten zu therapieren. Die autosomal dominant vererbte Erkrankung geht mit einem Defekt des Low Density Lipoprotein (LDL) Rezeptors einher und ist mit ausgeprägter Arteriosklerose und koronarer Okklusion bei besonders jungen Patienten assoziiert. Zur Gewinnung der autologen Hepatozyten erhielten die Patienten eine Lebersegmentresektion. Mittels einer retroviralen Genübertragung *in vitro* wurde der angeborene Rezeptormangel in

den Hepatozyten behoben und die Zellen intraportal in die Patienten transplantiert. Im Verlauf konnte der Serum- LDL Spiegel bei drei von den fünf Patienten für zwei Jahre nach dem Eingriff um 20 Prozent reduziert werden (15, 16).

Vor allem Kinder profitieren von einer minimalinvasiven Zelltransplantation, da kurz nach der Geburt ein hereditärer Enzymmangel schnell zu einer lebensbedrohlichen Situation für das Neugeborene werden kann und ein Spenderorgan nicht immer sofort verfügbar ist. Durch eine Leberzelltransplantation kann die Zeit bis zur Verfügbarkeit eines passenden Organes überbrückt werden, ohne dass irreversible Schäden durch die versagende Leberfunktion entstehen können, da die transplantierten Hepatozyten in der Lage sind, deren Stoffwechsellistung für diesen Zeitraum zu ersetzen. So konnte beispielsweise bei vier Kindern mit angeborener Hyperbilirubinämie durch Zelltransplantation von fünf Prozent der Lebermasse der Bilirubinspiegel um bis zu 50 Prozent gesenkt und somit das Risiko für die Entwicklung eines Kernikterus minimiert werden (17). Ein weiteres Beispiel zeigt die klinische Fallstudie von Meyburg et al. Hier wurden fünf Kinder mit einem angeborenen Harnstoffzyklusdefekt alternativ zur orthotopen Lebertransplantation erfolgreich mittels intraportaler Transplantation von konservierten humanen Leberzellen von einem einzigen Spender behandelt. Zur Einschätzung des Behandlungserfolges wurden der Plasmaspiegel von Ammoniak und Glutamin bewertet (7).

2011 gab es weltweit Berichte von mehr als 30 Patienten mit metabolischen Leberdefekten, welche mit einer Hepatozytentransplantation behandelt wurden. Zudem wurden bisher über 40 Patienten mit akutem Leberversagen durch eine Zelltransplantation therapiert (14). Ein Beispiel hierfür ist die Studie von Bilir et al. in der fünf Patienten mit einem akuten Funktionsverlust der Leber eine intrasplenische Applikation von primären Hepatozyten erhielten. Zwei Patienten erhielten zusätzlich eine intraportale Zellinfusion. Alle Patienten hatten verschiedene Kontraindikationen für eine Organtransplantation und wurden von der Warteliste ausgeschlossen. Dazu zählten eine hepatische Enzephalopathie und Nierenversagen mit einer statistischen Überlebenschance von unter 20 Prozent. Zwei der Patienten starben innerhalb der ersten 24 Stunden an Multiorganversagen und einer systemischen Virusinfektion. Bei den verbliebenen drei Patienten zeigten sich nach 48 Stunden erste klinische Veränderungen der Enzephalopathieparameter im Sinne einer Verbesserung von ursprünglich Grad IV auf Grad II, Grad I beziehungsweise Grad 0.

Nach 72 Stunden zeigten alle Patienten verbesserte EEG- Werte und eine Abnahme des Hirnödems. Die Prothrombinzeiten und die gestiegenen Albumin- und gesunkenen Bilirubinwerte entsprachen ebenfalls einer verbesserten Leberfunktion (5).

Die Entwicklung von Zelltherapien, welche auf die individuellen Ansprüche jedes einzelnen Patienten angepasst und optimiert werden können, bringt die Medizin näher an eine personalisierte Therapie. Dafür ist jedoch auch ein funktionierendes System erforderlich, welches die transplantierten Zellen überwachen und beobachten kann. Um den klinischen Wert und die Sicherheit von einer Zelltransplantation adäquat einschätzen zu können, ist es notwendig das Schicksal der transplantierten Zellen zu verfolgen und bewerten zu können. Die Demonstration einer erfolgreichen Zelltherapie und deren Effektivität im klinischen Alltag ist bisher auf die Messung metabolischer Synthese- oder Abbauprodukte, Proteine oder Enzyme angewiesen wie zum Beispiel ein reduzierter Bedarf von exogenem Faktor VII bei einem angeborenen Faktor VII Mangel (13).

Eine direkte Visualisierung der Spenderzellen gelingt im Tierversuch durch histologische Analysen aus Gewebeproben oder Gewebeschnitten des Organes mittels Immunhistologie oder *in situ* Hybridisierung. Im klinischen Alltag besteht diese Möglichkeit in Form einer Gewebebiopsie, welche als Nachweisverfahren für den Patienten jedoch unangenehm und im Fall der Leber mit einem erhöhten Morbiditätsrisiko durch Blutungen verbunden sein kann. Zudem können Biopsien nicht immer die Realität widerspiegeln, da hierfür randomisierte Gewebeproben verwendet werden und bei einer Ungleichverteilung der transplantierten Zellen im Organ falsch negative Ergebnisse entstehen können (11, 14). In der Studie von Quaglia et al. konnten in nur einer Leberbiopsie transplantierte Zellen nachgewiesen werden, wenngleich vier weitere Patienten klinisch signifikant von der Therapie profitierten. Es ist ungewiss, was mit den Zellen zwischen Applikation und Biopsie geschehen ist, ob sie ihre vermutete Position verlassen haben oder ob zum Nachweis lediglich zellleere Abschnitte der Leber bioptisch untersucht wurden (13). Fitzpatrick et al. berichteten in ihrem Review, dass Hepatozyten nach einer klinisch angewendeten Leberzelltransplantation nach circa 9 Monaten verloren gehen, ohne deren Ursache oder auslösende Faktoren evaluieren zu können (12).

Eine nicht invasive und longitudinale Beobachtung der Zellen *in vivo* ist wichtig, um deren Lokalisation im Organismus und deren funktionelle Lebensspanne zu

bestimmen. Wegen des möglichen gravierenden Ausmaßes, welche eine Leberdysfunktion für den Körper bedeuten kann, ist es erforderlich, dass die transplantierten Zellen sofort in der Lage sind, die Organfunktion zu ersetzen. Daher ist es notwendig ein optimales Behandlungsregime für jeden Patienten zu entwickeln und den Therapieerfolg möglichst zu maximieren. Dabei spielt die Wahl des geeignetsten Applikationsweges für den Erfolg der Therapie genauso eine entscheidende Rolle wie die Menge der zu transplantierenden Zellen und die Frequenz der geplanten Behandlungen (4).

Das Ziel einer *in vivo* Bildgebung ist es, den Behandlungserfolg in Echtzeit einschätzen und bei Bedarf optimieren zu können und im weiteren Behandlungsverlauf eventuell auftretende Komplikationen früh zu erkennen. Dazu müssen die Zellen adäquat markiert werden, um sie durch entsprechende bildgebende Verfahren vom umgebenden Milieu zu unterscheiden. Es gibt einige generelle Voraussetzungen für den Gebrauch von Agentien für Verfolgung von Zellen. Um für die klinische Anwendung beim Patienten zugelassen zu werden, müssen diese Mittel nachweislich ungefährlich in einer Zellkultur und auch im Tiermodell sein. Außerdem sollten sie den Stoffwechsel und die Funktion der damit zu markierenden Zellen nicht beeinflussen und die Herstellung der Markierungssubstanz sollte im großen Maßstab reproduzierbar sein. Daher eignen sich aus Sicherheitsgründen, technischen und finanziellen Überlegungen nur wenige der zahlreich existierenden Markierungsmethoden um sie auf den klinischen Alltag zu übertragen (11).

2.4. Darstellung transplantierte Zellen mittels nicht invasiver bildgebender Verfahren

Die älteste Technik menschliche Zellen *in vivo* zu untersuchen ist die Szintigraphie. Die Szintigraphie ist eine Darstellungsmethode, bei der radioaktive Marker verwendet werden, welche je nach Fragestellung stoffwechselaktives Gewebe penetrieren oder direkt in die Zielzellen als Marker eingebracht werden können. Die Akkumulation von radioaktiv markierten Leukozyten in bestimmten Körpergebieten und deren emittierte Strahlung, detektiert durch eine Gammakamera, kann unter anderem zur Infektionslokalisation bei Patienten mit Fieber unklarer Genese genutzt werden. Die Halbwertszeit eines geeigneten radioaktiven Markers ist limitiert und rangiert von circa zwei Stunden bis zwei Tagen. Das schränkt die Zeitspanne ein, in der man die

damit markierten Zellen oder Strukturen detektieren kann (11). Ein zusätzlicher Nachteil ist das Fehlen von anatomischen Details in den Aufnahmen. Die Lage und die Migrationsbewegungen von transplantierten Zellen im Empfängermechanismus kann mittels Szintigraphie nur grob beurteilt werden. Bildgebungsmodalitäten wie Single- Photon Emission Computer Tomographie, Positron Emission Tomographie in Kombination mit einer Computertomographie sind in der Lage, die anatomische Präzision zu gewährleisten und das zelluläre Engraftment, also das Transplantateinwachsen durch eine entsprechende Markierung der Zellen, zu evaluieren. Jedoch sollte der Gebrauch von bildgebenden Verfahren, die auf radioaktiven Isotopen oder ionisierender Strahlung beruhen, wegen der Strahlenexposition nur eingeschränkt und mit strenger Indikation im menschlichen Organismus eingesetzt werden. Andere optische bildgebende Verfahren, wie Fluoreszenz oder Biolumineszenz, sind von unschätzbarem Wert für die Bildgebung im Kleintiermodell. Doch durch die limitierte Lichtpenetration durch Gewebe und das Fehlen einer Zulassung durch die U.S. Food and Drug Administration (FDA) sind sie als longitudinales Markierungsmittel für die klinische Anwendungen nicht geeignet (11, 18, 19).

2.5. Zelldetektion mittels Magnetresonanztomographie

Die Magnetresonanztomographie ist ein Schnittbildverfahren und basiert physikalisch auf der Kernspinresonanz. Das MRT wurde 1973 von Paul Christian Lauterbur entwickelt und die ersten präklinischen Studien und Konzepte der Zelldetektion mittels MRT wurden 1986 vorgestellt (20). Die Vorteile des MRT sind die Nutzung stabiler Kontrastmittel mit gleichzeitiger Abwesenheit einer radioaktiven Strahlenexposition, sowie eine exzellente Auflösung und Generierung von dreidimensionalen und hochauflösenden Ganzkörperaufnahmen (21).

Die Kernspintomographie beruht auf der Magnetisierung von Atomkernen durch ein magnetisches Feld. Das Signal ist abhängig von dem Gehalt unterschiedlicher Atomkerne in einem bestimmten Gewebe und ihren chemischen Interaktionen mit anderen Molekülen. Hier sind im Besonderen die Wasserstoffkerne hervorzuheben. Das Proton besitzt als Elementarteilchen neben seiner positiven Ladung zusätzlich einen Spin. Durch die Kombination der Eigenrotationsbewegung und der elektrischen Ladung des Protons entsteht ein magnetischer Moment. Der magnetische Moment induziert eine elektrische Spannung in einer Empfangsspule und kann gemessen

werden. Das bedeutet im Umkehrschluss, dass jedes Proton im menschlichen Körper von einem äußeren Magnetfeld oder einer elektromagnetischen Welle beeinflusst werden kann. Ein entsprechender Hochfrequenzimpuls führt dazu, dass sich alle Protonen wie Kompassnadeln entlang des externen Feldes auslenken. Die Rückbewegung von der Auslenkungsebene in den Ausgangszustand induziert eine Wechselspannung in einer Empfangsspule – das Magnetresonanz (MR) Signal. Die Spins kippen nach Beendigung des Hochfrequenzimpulses mit der Zeit T1 (Longitudinale Relaxation) und T2 (Transversale Relaxation) in Richtung des äußeren Magnetfeldes zurück. Zeitlich konstante, immer gleich starke Inhomogenitäten des äußeren Magnetfeldes, verursacht durch den Tomographen oder durch den Körper der zu untersuchenden Person, bewirken eine zusätzliche Dephasierung der Protonen, sodass das Signal nicht mit der Zeit T2, sondern mit einer schnelleren Zeitkonstante T2* zerfällt (22).

Um transplantierte Zellen zu identifizieren und zu detektieren, benötigt man ein Kontrastmittel, welches die T1, T2 oder T2* Relaxivität verändern kann (23). Je nachdem mit welchen Effekten die Kontrastmittel auf das Gewebe einwirken, werden sie in negative oder positive Kontrastmittel unterteilt. Die positiven Kontrastmittel werden durch paramagnetische Komplexe, die meistens Gadoliniumionen oder Manganionen enthalten, repräsentiert und lassen das Gewebe im MR Bild heller erscheinen (24). Gadopentetat- Dimeglumin (Gd- DTPA), bestehend aus Gadoliniumionen und dem Chelatbinder Diethyltriaminepentaessigsäure, war das erste MR Kontrastmittel welches durch die FDA zugelassen wurde und ist das in der Klinik meist verwendete Präparat. Der Komplex aus Gadoliniumionen im Gd- DTPA führt dazu, dass sich die umgebenden Protonen der Wassermoleküle in einem Magnetfeld in kürzerer Zeit relaxieren als unter physiologischen Bedingungen und sie so in T1 und T2 gewichteten Bildern heller erscheinen. Als klinische Anwendungsgebiete gelten Untersuchungen von krankhaften oder verengten Blutgefäßen oder die Einschätzung der Durchblutung von Geweben. Als intrazelluläres Kontrastmittel ist Gd- DTPA nicht geeignet. In dem sauren Milieu der intrazellulären Verdauungsorganellen würde der Komplex schnell nach dem Markierungsprozess zerfallen und seine Kontrastfähigkeit im MRT verlieren (24, 25, 26).

2.6. Eisenoxidpartikel als intrazelluläres Kontrastmittel

Materialien wie Eisen und deren Oxide weisen einen permanenten magnetischen Moment auf, welcher ein starkes magnetisches Feld produzieren kann. Wenn diese superparamagnetischen Materialien in Form von Partikel in ein externes Magnetfeld platziert werden, erzeugen sie Störungen, welche sich als Spin Dephasierung und Beeinflussung von Nachbarprotonen manifestieren (23). Im Gegensatz zu Gadolinium ist Eisen ein natürlich vorkommendes Metall im menschlichen Körper. Die zusätzliche Dosis Eisen, die durch ein MR Kontrastmittel in den Organismus substituiert werden würde, entspricht nur einem geringen Bruchteil des Gesamteisen eines Erwachsenen von ungefähr 4 g (25). Der Gebrauch von Eisenoxid in Form von nanometer- oder mikrometerskaligen Partikeln ist ein besonders spannendes Konzept um Zellen zu markieren und sie im MRT zu untersuchen. Eisenoxidpartikel können die T2 und T2* Zeiten drastisch verkürzen, was zu einer Verdunklung auf den MR Bildern führt, weshalb sie als negative Kontrastmittel bezeichnet werden. Dieses resultierende hypointense Signal ist größer als die eigentliche Dimension des Partikels (23, 24).

Die erste klinische Studie, in der Eisenoxidpartikel zur Zelldetektion genutzt wurden, stammt von Vries et al. Hier wurden acht Melanompatienten unter Ultraschallkontrolle Dendritische Zellen (DZ) in einen Lymphknoten appliziert. Einige der DZ wurden zuvor mit Eisenoxidpartikeln, die Vergleichsgruppe mit ¹¹¹Indium markiert. So konnten die transplantierten Zellen mittels der Szintigraphie und auch mittels MRT sichtbar gemacht werden. Durch die höhere räumliche Auflösung und den exzellenten Weichgewebekontrast offenbarten die MR Aufnahmen mehr positive Lymphknoten im Vergleich zur Szintigraphie. Zusätzlich erschienen die in den MR Bildern beobachteten multiplen benachbarten Lymphknoten als eine zusammenhängende Struktur auf den Szintigraphie Bildern (18). Damit zeigte sich, dass die in der Szintigraphie erzeugten Bilder eine schlechtere Auflösung im Vergleich zum MRT haben. Die Resultate dieser ersten klinischen MRT Studie zeigen, dass die Visualisierung der nicht invasiven Zellmigration mittels MRT über einen Beobachtungszeitraum möglich und anderen Bildgebungstechniken überlegen ist.

2.6.1. Nanometerskalige Eisenoxidpartikel

Die Gruppe der nanometerskaligen Eisenoxidpartikel kann in ultra- kleine superparamagnetische Eisenoxidpartikel (ultrasmall iron oxide particle, USPIO, Durchmesser 30- 50 nm), kleine superparamagnetische Eisenoxidpartikel (small superparamagnetic iron oxide particle, SPIO, Durchmesser 50- 150 nm) und Monokristalline Eisenoxidpartikel (monocrytsalline iron oxid particle, MION, Durchmesser 100- 200 nm) eingeteilt werden (23).

Der SPIO Feridex® (Bayer HealthCare, Leverkusen, DE) von der Größe im Nanometerbereich (50- 180 nm) wurde 1996 als erstes eisenoxidbasiertes Kontrastmittel von der FDA zugelassen. In Europa wurde der Partikel unter dem Namen Endorem® verkauft. Die Oberfläche des Partikels besteht aus enzymatisch abbaubarem Dextran. Es war der einzige Partikel der als Pharmazeutikum eingestuft und zur Detektion von Zellen unter klinischen Bedingungen genutzt wurde. Die Produkte Feridex® und Endorem® werden seit Ende des Jahres 2008 nicht mehr produziert und sind nicht länger kommerziell erhältlich. Neuere Typen von Eisenoxidnanopartikeln sind der von BioPAL (Worcester, MA, USA) produzierte Nanopartikel FeREX (50- 150 nm) oder Molday ION products (30 nm), welche mit verschiedensten Oberflächenmolekülen erhältlich sind. Verschiedene andere Typen von SPIO wurden genutzt um Stammzellen zu markieren, so auch der von Bayer Schering (Berlin, Deutschland) auf den Markt gebrachte SPIO Resovist®, welcher mit Karboxydextran beschichtet ist, jedoch durch Fibrosierung der Partikel nach Applikation mittlerweile ebenfalls nicht mehr kommerziell erhältlich ist (27).

2.6.2. Mikrometerskalige Eisenoxidpartikel

Im Vergleich zu nanometerskaligen Partikel wurden größere superparamagnetische mikrometerskalige Partikel (micrometer sized iron oxide particle, MPIO) entwickelt und für die intrazelluläre Bildgebung genutzt. MPIO sind bei Bangs Laboratories (Fishers IN, USA) und Invitrogen (Paisley, UK) mit einem Durchmesser von 0,9 µm bis 8 µm erhältlich (28, 29). Die Oberfläche besteht aus biologisch nicht abbaubaren Polymeren oder Polystyrol-/ Divinylbenzolen. Diese Partikel werden seit 2003 in zahlreichen Studien beispielsweise zur Erforschung der Krebsprogression und Metastasenausbreitung von Prostata- und Brustkrebszellen (30) verwendet und um Hepatozyten (31), mesenchymale Stammzellen (32), Schwann Zellen (33), inflammatorische Zellen (34) und viele andere Zellarten zu markieren und deren

Lokalisation oder Migration im MRT zu untersuchen. Eine *in vitro* Markierung kann zu einer Eisenaufnahme von bis zu 60 pg Eisen pro Zelle führen. MPIO sind mit einer Menge an Eisenoxid beladen (typischerweise 0.1–10 pg Eisen/ MPIO), welche weitaus größer ist als die von nanometerskaligen Eisenoxidpartikeln. Dies resultiert in einem starken hypointensen Kontrast, der bis zu 50-fach größer ist als der eigentliche Durchmesser des Partikels. Dieser "blooming effect" ist für die hohe Sensitivität unter MR-Bedingungen und die Möglichkeit des Einzelzellnachweises durch eine kleine Anzahl von intrazellulären MPIO verantwortlich (29, 35, 36, 37).

2.6.3. Problematik

Die magnetische Markierung von Zellen beruht auf dem Transfer der Partikel von einer extrazellulären Umgebung in ein intrazelluläres Kompartiment. Dabei hängt die Effizienz der Markierung von Zellmembraneigenschaften und auch von der Größe der Zelle und des Partikels ab. Es existieren zahlreiche Strategien, um Zellen mit Eisenoxidpartikeln zu markieren. Die simpelste Methode ist die spontane Aufnahme der Partikel von phagozytierenden Zellen wie Makrophagen, Mikroglia oder dendritischen Zellen. Andere Zelltypen benötigen zusätzliche Methoden um die Markersubstanzen aufzunehmen. Für solche nicht-phagozytierenden Zellen werden Techniken der viralen Inkorporation oder Antikörper-vermittelte zelluläre Partikel Aufnahme angewendet. Weit verbreitet ist der Gebrauch von polykationischen (positiv geladen) Transfektionsagenzien um die anionische (negativ geladen) Oberfläche der Partikel zu beschichten (25). Dieses Verfahren wurde verbreitet genutzt um mit Hilfe von Protaminsulfat DNS-Moleküle in eine Zelle zu schleusen. Es existieren neben Protaminsulfat weitere Transfektionsagenzien wie Poly-L-Lysin (PLL), Lipofectamin und Transaktivatorproteinen, welche vor allem genutzt werden, um Zellen effizient mit Nanopartikeln zu markieren (38, 39, 40). Eine weniger spezifische aber ebenfalls effiziente Markierungsstrategie basiert auf der temporären Unterbrechung der Zellmembranstabilität mittels Elektroporation oder Ultraschall (27, 41).

Diese unterschiedlichen Transfektionsmethoden können die Zelldifferenzierung beeinflussen und zu einer unspezifischen Partikel Aufnahme führen (11). So konnte ein Zusammenhang zwischen der Nutzung von Transfektionsagenzien und der Abnahme der Migrationskapazität bei humanen mesenchymalen Stammzellen (MSC) und deren Fähigkeit Kolonien zu bilden gezeigt werden (42). Nach der Freisetzung

von Nanopartikeln aus markierten und transplantierten MSC *in vivo* beobachten Schäfer et al. eine lokale Inflammation und Exazerbation der autoimmunen Enzephalomyelitis durch freie und degradierte SPIO in Kombination mit den verwendeten nonlisopomalen Transfektionsagenzien (43).

Eine Markierung von humanen MSC mit SPIO kann außerdem zu inhibitorischen Effekten der osteogenen Differenzierung und deren Signalwege führen und eine dosisabhängige Inhibition der Chondrogenese durch die Partikel hervorrufen (44, 45, 46). Eine mögliche Erklärung für die schwerwiegenden potenziellen Auswirkungen auf den Metabolismus der Zellen durch Nanopartikel könnte neben den Gebrauch von Transfektionsagenzien auch eine andere Beobachtung liefern. Es zeigte sich, dass ein Großteil der zur Zellmarkierung genutzten SPIO lediglich an der Oberfläche der Zellen hafteten, statt in deren Zytoplasma zu gelangen (47). Einwirkende Scherkräfte auf SPIO welche sich lediglich auf der Oberfläche der Zelle befinden, können während oder nach der Zellapplikation in den Organismus zu einer unkontrollierten und möglicherweise toxischen Freisetzung des Eisenoxidkerns führen.

Zusätzlich kann die mit Dextran beschichtete Oberfläche der Nanopartikel von den markierten Zellen enzymatisch abgebaut und der eisenoxidhaltige Kern freigesetzt werden (48). Eine Studie von Raschzok et al. evaluierte die mögliche intrazelluläre Eisenfreisetzung durch Markierung von humanen primären Hepatozyten mit SPIO und mit MPIO. Dabei führte die Markierung der Zellen mit SPIO zu der Formation von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und zu einer nicht physiologischen Aktivierung des Eisenstoffwechsels *in vitro*. Die Markierungsgruppe mit den enzymatisch stabilen MPIO zeigte keine auffälligen ROS Werte (47).

Eine weitere Limitation in der Anwendung von Nanopartikeln für die Markierung von Zellen ist der progrediente Kontrastverlust in MR Bildern durch mögliche Mitose *in vivo*. Vor allem unreife Zellen, wie Progenitor- oder Stammzellen haben das Potenzial sich nach einer möglichen Applikation im Organismus zu teilen, da sie noch nicht vollständig differenziert sind oder sie durch exogene Faktoren zur Proliferation angeregt werden können. Jede Zellteilung *in vivo* würde die intrazelluläre Markierungssubstanz zwischen den Tochterzellen aufteilen und durch diese Verdünnung zu undetektierbaren Levels unter MR Bedingungen führen. Die typische asymmetrische Zellteilung von Stammzellen führt dabei zu einer schnelleren und weniger graduellen Verdünnung des Kontrastmittels als bei Zellen, die sich

symmetrisch teilen (27). Bei einer mit SPIO markierten Zelle (10- 30 pg Eisen pro Zelle) würde die Grenze der Detektierbarkeit bereits bei 7 bis 10 Zellteilungen liegen (36).

Im Gegensatz dazu konnten Hinds et al. zeigen, dass die größeren MPIO im Vergleich zu SPIO eine erhöhte magnetische Suszeptibilität im 11,4 Tesla MRT aufweisen. Trotz desselben Eisengehaltes der verwendeten SPIO und MPIO konnten die größeren Partikel dunklere Kontraste in T2* gewichteten MR Sequenzen erzeugen. Die Zellen wurden für drei Wochen kultiviert und verloren in dieser Zeit nicht ihre Fähigkeit mittels MRT detektiert zu werden (32). Um einem mit MPIO markierten Zellen vergleichbaren Bildkontrast durch SPIO markierte Zellen zu erzeugen, sind signifikant größere Zellmengen nötig (47).

Arbeiten von Shapiro et al. zeigten 2003 erstmals, dass diese in der Magnetfeldhomogenität hervorgerufene Störung einen einzelnen MPIO erzeugt werden kann (36). Kurz darauf gelang die erste *in vivo* Darstellung von einzelnen mit MPIO markierten primären Hepatozyten nach einer intrasplenischen Transplantation in einem Mausmodell. Durch diese Technik kann eine einzelne Zelle durch einen einzigen Partikel *in vitro* und *in vivo* repräsentiert werden und eine Teilung der Zelle würde die Detektion des Marker nicht beeinflussen (49).

Trotz der Vorteile, die MPIO gegenüber SPIO in der sichereren Anwendung und der sensitiveren Detektion im MRT bieten, gibt es bisher keinen mikrometerskaligen Partikel, der von der FDA für eine klinische Anwendung zugelassen wurde (37).

2.7. Fragestellung

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit soll ein mikrometerskaliger Silizium basierter Eisenoxidpartikel evaluiert werden, welcher die vorteilhaften Eigenschaften der bisher erwerblichen MPIO vereint, jedoch aus Materialien besteht, welche für eine klinische Anwendung geeignet sind. Die bisher entwickelten MPIO haben eine Oberfläche aus einer Polystyrol-/ Divinylbenzol oder Polymermatrix, welche biologisch stabil ist. Obwohl MPIO durch ihre Größe und ihren hohen Eisengehalt die am sensitivsten MR Kontrastmittel sind, konnten sie aufgrund der verwendeten Materialien noch nicht für den klinischen Gebrauch zugelassen werden.

Im Gegensatz zu Silizium, welches als Material für die Ummantelung von nanometerskaligen Eisenoxidpartikeln genutzt (50 - 54) und bereits für einen nanometerskaligen Eisenoxidpartikel (Cornell Dots, Ithaca, NY, USA) als

Oberflächenmaterial von der FDA zugelassen wurde (55). Das Element Silizium ist hitzestabil, biokompatibel und ermöglicht durch seine gute mechanische Belastbarkeit eine leichte Verarbeitung. Silizium verhindert die Degradation und Aggregation des inneren potentiell toxischen Eisenkerns des Partikels. Zudem kann die Oberfläche leicht mit Molekülen wie Proteinen, Peptiden oder Oligonukleotiden funktionalisiert und modifiziert werden.

Durch die Markierung von adhärennten HuH7 Zellen und adulten primären Leberzellen sollen mögliche toxische Schäden durch die Partikel untersucht und die Detektion markierter Zellen unter klinischen Bedingungen in einem 3,0 Tesla MRT *in vitro* evaluiert werden.

3. Material und Methoden

3.1. Liste der Materialien

3.1.1. Silizium basierte mikrometerskalige Eisenoxidpartikel

- Carboxy- sMPIO
(COOH- sMPIO) *microparticles GmbH, Berlin, DE*
- Fluoreszin- sMPIO *microparticles GmbH, Berlin, DE*
- Poly- L- Lysine- sMPIO
(PLL- sMPIO) *microparticles GmbH, Berlin, DE*
- Streptavidin- sMPIO
(SA- sMPIO) *microparticles GmbH, Berlin, DE*

3.1.2 Zellisolierung und Zellkultur

- Bovines Serum Albumin *SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE*
- Dexamethason/ Fortecortin *Merck KGaA, Darmstadt, DE*
- Dulbecco's Eagle Medium
(DMEM) *Biochrom AG, Berlin, DE*
- Epidermal Growth Factor (EGF) *Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*
- EGTA (Ethylenglycol- bis
(Aminoethylether)- N,N,N',N'-
Tetraessigsäure) *Fluka Chemie AG, Neu- Ulm, DE*
- Fetales Kälberserum (FCS) *Biochrom AG, Berlin, DE*
- Glucagon *Biochrom AG, Berlin, DE*
- HEPES (2- (4- (2- Hydroxyethyl)
1 Piperazinyl)
Ethansulfonsäure) *Biochrom AG, Berlin, DE*
- Humanes Albumin *Baxter GmbH, Unterschleißheim, DE*
- Insulin *Biochrom AG, Berlin, DE*
- Kaliumchlorid *Merck KGaA, Darmstadt, DE*
- Kalziumchlorid Dihydrat *Merck KGaA, Darmstadt, DE*
- Kollagen A *Biochrom AG, Berlin, DE*
- Kollagenase P *Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, DE*
- L- Glutamin Natriumpyruvat *Biochrom AG, Berlin, DE*
- Natriumazid *Merck KGaA, Darmstadt, DE*

- Natriumchlorid *Fluka Chemie AG, Neu Ulm, DE*
- Percoll- Lösung *Biochrom AG, Berlin, DE*
- Phosphate Buffered Saline (PBS) *PAA, Pasching, DE*
- Trypan Blau *Biochrom AG, Berlin, DE*
- Penicillin *Biochrom AG, Berlin, DE*
- Trypsin/ EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) *Biochrom AG, Berlin, DE*
- Wiliams´ Medium E glutamax *Biochrom AG, Berlin, DE*

- DMEM modified 500ml DMEM, 100 U/ ml Penicillin, 100 µg/ ml Streptomycin, 1 mM Natriumpyruvat, 4 mM L- Alanyl- L- Glutamine 10% FCS
- Leffert´s Buffer 100mM HEPES, 30mM KCl, 1,3mM NaCl, 10mM NaH₂PO₄, 100mM Glukose, Auqa dest.
- Perfusionslösung I 0,142M NaCl, 6,7 mM KCl, 10 mM HEPES, 2,4M EGTA
- Perfusionslösung II 67 mM NaCl, 6,7 mM KCl, 100 mM HEPES, 0,5 % Bovines Serum Albumin, 4,8 mM CaCl₂2H₂O, 100 mg Kollagenase P
- Stopplösung Perfusionslösung I ohne EGTA, 25 ml 20 % Humanes Albumin
- Wiliams´ Medium E modified 500ml Wiliams´ Medium E, 1 µM insulin, 1 µM Dexamethason/ Fortecortin, 100 U/ ml Penicillin, 100 µg/ ml Streptomycin, 1 mM Natriumpyruvat, 4 mM L- Alanyl- L- Glutamin, 15 mM HEPES, 10% FCS

- 6- Loch- Platten *Sarstedt, Newton, NC, USA*
- 12- Loch- Platten *Sarstedt, Newton, NC, USA*
- 50ml- Röhrchen *Sarstedt, Newton, NC, USA*
- 96- Loch- Platten *Sarstedt, Newton, NC, USA*
- Eppendorf- Gefäße *Sarstedt, Newton, NC, USA*
- Pipetten *Sarstedt, Newton, NC, USA*

3.1.3. Fluoreszenzfärbung

- 4% Paraformaldehyd *SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE*
- Methanol *Carl Roth GmbH + CO. KG, Karlsruhe, DE*
- Anti- Cytokeratin 18
Antikörper *Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz,
CA, USA*
- Indocarbocyanin *Jackson Immuno Research, Newmarket,
Suffolk, UK*
- 4',6-Diamidin-2-phenylindol
(DAPI) *Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA*

3.1.4. Toxizitätsstudien

- Eisencitrat *Merck KGaA, Darmstadt, DE*
- Triton X *Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*

3.1.5. Magnetresonanztomographie

- Agarose *SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE*
- Gadolinium *Dotarem; Guerbet, Frankreich*

3.2. Silizium basierte mikrometerskalige Eisenoxidpartikel

Für diese Arbeit wurden superparamagnetische Silizium basierte mikrometerskalige Eisenoxidpartikel (Silica- based micron- sized iron oxide particle, sMPIO) verwendet, welche von der Firma *microparticles GmbH* speziell angefertigt wurden. Die sMPIO haben einen Durchmesser von 1,18 μm und einen totalen Eisenoxidgehalt von über 40 Prozent. Die Siliziumoberfläche ist hydrophil und weist eine kolloidale Stabilität auf, welche vor einer möglichen Eisenfreigabe schützt.

Als Grundprinzip der Partikelherstellung wurde die Polykondensation verwendet. Bei der Polykondensationsreaktion von Alkoxysilanen entstehen unter basischer Katalyse monodisperse Siliziumpartikel. Durch Variation von Monomermenge, Temperatur, anionischer bzw. nichtionischer Tenside sowie Katalysatorart und Katalysatormenge sind die Produkte in einem weiten Durchmesserbereich einstellbar. Die Eisenoxidbeladung der entstandenen 1,18 μm großen Siliziumpartikel wurde durch anionische Modifizierung vorbereitet. Danach erfolgte die Beladung mit Eisen (III)- Salzen in mehreren Beladungszyklen und anschließender Reduktion von Hydrazin zu Magnetit. Auf diese Weise wurde schrittweise eine Magnetitbeladung

der Partikel von über 40 Prozent erreicht. Die folgenden Herstellungsschritte richteten sich auf die effektive Verkapselung der auch nach ausreichender Eisenoxidbeladung noch stark anionischen Magnetitpartikel. Daher wurde gelöst, indem die poröse Partikeloberfläche mit hydrophilen Polymeren beschichtet wurde. Die neu entstandene bis zu 500 nm dicke Polymerschicht wurde im weiteren Verlauf mit Carboxygruppen modifiziert ($> 50 \mu\text{mol/g}$). Die superparamagnetischen Eigenschaften des Eisenoxidkernes im Inneren des Partikels wurden dabei durch die Carboxyierung nicht beeinflusst. Die Carboxyfunktion ermöglicht eine Funktionalisierung der Partikel durch Anbindung aller möglichen chemischen Strukturen. So wurden die Partikel drei Stunden mit 1 mg N'- (3-Dimethylaminopropyl)- N- ethylcarbodiimid HCl und mit 1 mg Streptavidin (SA) beziehungsweise mit 1 mg Poly- L- Lysine (PLL) inkubiert. Danach wurden sie mit deionisiertem Wasser und PBS gewaschen. Zusammen mit der carboxylierten unmodifizierten Form stehen drei verschiedene superparamagnetische Siliziumbasierte mikrometerskalige Eisenoxidpartikel für die Anwendung zur Verfügung. Die jeweilige Stammlösung enthält 7.1×10^9 Partikel/ml. Die sMPIO mit COOH Gruppen (COOH- sMPIO) haben eine negativ geladene Oberfläche, Poly- L- Lysine-modifizierte Partikel (PLL- sMPIO) haben eine positive und Streptavidin- modifizierte Partikel (SA- sMPIO) eine annähernd neutrale Oberflächenladung jeweils bei physiologischen pH- Wert. Zusätzlich wurden Fluoreszenzfarbstoffe (Fluoreszin) an die COOH- Gruppen gebunden.

3.3. Partikelcharakterisierung

Die Oberflächeneigenschaften der Partikel wurden mittels eines Elektronenmikroskops (Carl Zeiss Nano Technology Systems, Oberkochen, Germany) untersucht. Die Partikelgröße wurde durch Impedanzmessungen verifiziert (Coulter Multisizer II, Beckman Coulter, Inc. Fullerton, CA, USA). Um den Eisengehalt der Partikel zu bestimmen, wurde eine continuum source atomic absorption spectrometry (CSAAS) durchgeführt (28). Hierbei werden verschiedene Proben mit 3×10^6 , 15×10^6 und 30×10^6 Partikel/ml mittels starker Erhitzung in ihre atomaren Bestandteile aufgespalten und die Eisenatome quantitativ mittels Absorptionsspektrometrie analysiert.

3.4. Zellisolation und Zellkultur

3.4.1. Huh7 Zellen

Die verwendete humane hepatische Zelllinie HuH7 stammt von einem 57-jährigen männlichen Spender aus dem Jahr 1982 und wird durch die JCRB Zellbank (Shinjuku, Japan, JCRB0403) angeboten. Die Zellen werden bei - 80 °C aufbewahrt und für die Zellkultur unter sterilen Bedingungen aufgetaut. Sie wurden als Monoschicht in Standard Kulturflaschen ausgesät und in DMEM bei 37 °C und 5 % CO₂ vermehrt.

3.4.2. Primäre humane Hepatozyten

Die primären humanen Hepatozyten wurden aus dem Lebergewebe von vier Patienten isoliert, welche sich einer therapeutischen Leberteileresektion aufgrund primärer oder sekundärer maligner Tumoren unterziehen mussten. Die Nutzung der Resektate für die Gewinnung der Leberzellen erfolgte nach Genehmigung der Ethikkommission der Charité und nach Einholung der Einverständniserklärung der Patienten, welche zuvor dementsprechend aufgeklärt wurden (EA 2/ 137/ 09). Die Proben wurden unter Einhaltung einer minimalen kalten Ischämiezeit unter sterilen Bedingungen in Williams' Medium E modified bei 4 °C aus dem Operationssaal in das Zellisolierungslabor der Experimentellen Chirurgie der Charité Universitätsmedizin Berlin - Campus Virchow transportiert. Nach Kanülierung des Resektates erfolgte die Zellisolierung nach einem bereits etablierten 2- Schritt- Perfusionsverfahren (47). Das Verfahren besteht aus einer Durchspülung des Gewebes mit Perfusionslösung I für 30 Minuten bei 37 °C und nachfolgender rezirkulierender Perfusion mit der Perfusionslösung II bei 37 °C, welche eine Kollagenase enthält. Die enzymatische Verdauung durch die Kollagenase löst die extrazellulären Matrix- Zell- Kontakte und die Zell- Zell- Kontakte auf. Nach 15 bis 20 Minuten wird die Enzymreaktion durch eine kalte (4° C) Stopplösung beendet und das Gewebe mechanisch zerkleinert und die Hepatozyten gelöst (Abb. 1). Die so gewonnene Zellsuspension wird mit der kalten Stopplösung weiter verdünnt und in eine Pipette aufgenommen. Eine sterile Gaze dient bei der Applikation der Suspension in 50 ml Röhrchen als Filter für grobe nicht verdaute Gewebestücke. Die Röhrchen werden anschließend bei 50 g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Die Flüssigkeit wird entfernt und das entstandene Zellpellet mit frischem Williams' Medium E modified resuspendiert. Mittels einer Probe aus der Zellsuspension wird die Zellzahl und die Zellvitalität durch Trypan Blau

Färbung und Auszählung in einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Berechnung erfolgt wie folgt:

Gesamtzellzahl = gezählte Zellen x 10^4 x Volumen der Zellsuspension

Vitalität [%] = Anzahl vitaler Zellen x 100 / Gesamtzellzahl

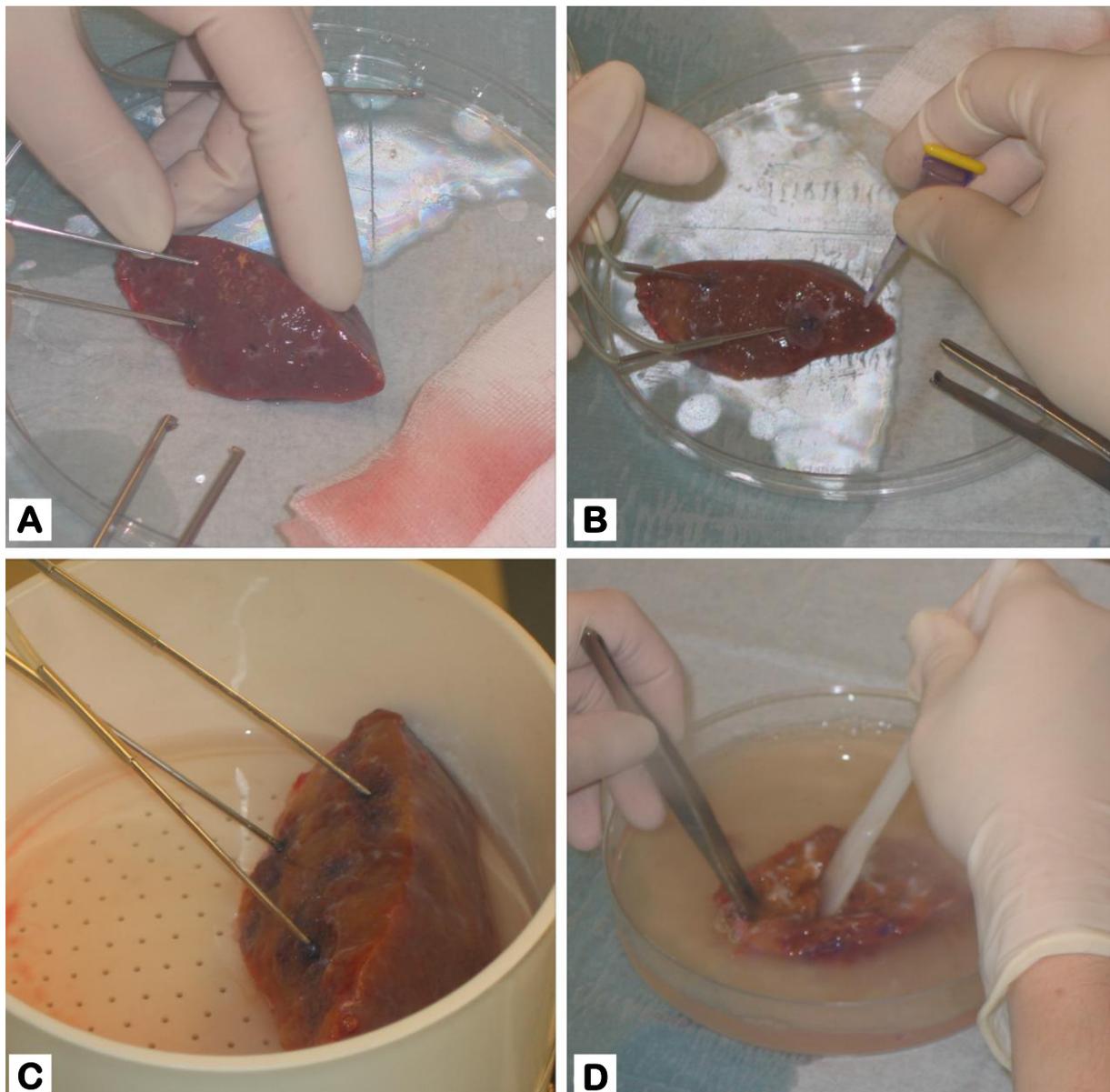


Abb. 1: Isolierung der primären humanen Hepatozyten. Die auf der Schnittfläche befindlichen Gefäße des Leberteilresektates wurden vor der Perfusion unter sterilen Bedingungen cannüliert (A). Kleinere Gefäße wurden mit Gewebekleber verschlossen um einen vorzeitigen Austritt der Perfusionslösung zu verhindern (B). Nach einer 2- Schritt-Perfusion (C) wurde das Stück mechanisch zerkleinert (D).

Um tote primäre humane Hepatozyten und Zellen anderer Zellarten von der Zellsuspension vor deren Kultivierung zu trennen, erfolgt ein weiterer Zentrifugationsschritt, bei welchem Percoll Lösung als Dichtegradient genutzt wird.

Die Percoll Lösung (Dichte: 1,124 g/ ml) wird mit PBS im Verhältnis von 1 : 4 in ein 50 ml Röhrchen gegeben und mit jeweils 5 ml der Zellsuspension überschichtet. Dabei muss eine Resuspension der Zellen mit der Percoll Lösung für eine erfolgreiche Auftrennung der Zellen vermieden werden. Nach der Zentrifugation (4 °C, 1474 g für 20 Minuten) befinden sich in dem Überstand die avitalen Zellen. Dieser wird verworfen und das Pellet mit den vitalen Hepatozyten mit kaltem PBS gewaschen. Auch nach diesem Schritt werden die Zellzahl und die Vitalität mittels Trypan Blau Färbung bestimmt.

$$\text{Überleben [\%]} = \frac{\text{Anzahl vitaler Zellen (vor Percoll)} \times 100}{\text{Anzahl vitaler Zellen (nach Percoll)}}$$

Die Zellen hatten nach dem Isolierungsvorgang eine durchschnittliche Vitalität von $86 \pm 7,2$ %. Die Hepatozytensuspension wurde im Verhältnis 1 : 1 mit Medium verdünnt und in Kollagen beschichtete 6- Loch und 12- Loch- Platten umgesetzt und bis zu 7 Tage in Williams' Medium E modified bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Das Medium wurde alle 24 Stunden gewechselt, die Proben aus dem Überstand gesammelt und für weitere Analysen bei - 80 °C gelagert.

6- Loch- Platten: 1 x 10⁶ Zellen in 1 ml Zellsuspension/ Loch

12- Loch- Platten: 0,5x10⁶ Zellen in 0,5ml Zellsuspension/ Loch

3.4.3. Primäre Rattenhepatozyten

Die primären Rattenhepatozyten wurden aus den Lebern von fünf männlichen Lewis Ratten mittels eines modifizierten 2- Schritt- Perfusionsverfahrens isoliert (56). Alle Experimente wurden in Übereinstimmung mit dem Tierschutzgesetz durchgeführt und wurden durch die örtlichen Behörden für Tierexperimentelle Forschung zugelassen (O 0459/ 09). Die Leber wurde *ex vivo* via Portalvene zuerst mit Leffert's Puffer ergänzt mit EGTA und anschließend mit einer Kollagenase durchspült. Die enzymatische Reaktion wurde nach 5 bis 10 Minuten durch eine kalte Calciumchlorid Pufferlösung gestoppt. Die nachfolgenden Reinigungs- und Zentrifugationsschritte sind identisch mit denen aus der humanen Hepatozytenisolation. Die Zellen hatten nach der Prozedur eine durchschnittliche Vitalität von $68,5 \pm 8,5$ %. Die Rattenhepatozyten wurden bis zu 7 Tage in 12- Loch- Platten mit DMEM modified ohne Natriumpyruvat ergänzt mit 2,5 ng EGF, 7 µL Glucagon, 1 µM Insulin und 1 µM

Dexamethasone/ Fortecortin bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Wie bereits beschrieben, wurde der Mediumüberstand alle 24 Stunden entnommen und entsprechend aufbewahrt.

3.5. Zellmarkierung mit sMPIO

Die Huh7 Zellen und die primären Hepatozyten wurden jeweils in Adhäsionskultur markiert. Nach der Zellisolation beziehungsweise nach dem Auftauen wurden die Zellen in 6- Loch- Platten beziehungsweise in 12- Loch- Platten ausgesät. Nach 18 Stunden waren die Zellen am Boden der Kulturplatte angewachsen und bildeten eine konfluente Monoschicht. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und das alte Medium durch frisches Medium ersetzt, welches die finale Partikelinkubationskonzentration enthielt. Nach 4 Stunden Inkubationszeit bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Zellen dreimal gründlich mit PBS gewaschen um freie oder nur lose an der Zelloberfläche gebundene Partikel zu entfernen. Nach dem Waschvorgang wurde partikelfreies Kulturmedium auf die Zellen gegeben.

Für die erste Evaluierung der Partikelinternalisierung wurden Huh7 Zellen mit COOH-sMPIO, PLL- sMPIO und SA- sMPIO mit einer Inkubationskonzentration von 100 Partikel/ Zelle inkubiert. Um die Aufnahmemechanismus zu untersuchen, wurden zusätzliche Huh7 Kulturen unter Hypothermie (4 °C) oder nach einer 30 minütiger Vorbehandlung mit Natriumazid (3 mM) markiert (57). Die Partikelkonzentration war in allen Versuchsgruppen identisch. Primäre humane Hepatozyten wurden jeweils mit PLL- sMPIO, COOH- sMPIO und SA- sMPIO in einer aufsteigenden Inkubationskonzentration von 10 bis 100 Partikel/ Zelle markiert, um die optimale Markierungskonzentration zu identifizieren. Nach den initialen Markierungsversuchen wurden primäre humane Hepatozyten mit einer finalen Inkubationskonzentration von 60 Partikel/ Zelle markiert.

Um eventuell schädigende Effekte der sMPIO auf die Zellen festzustellen, wurden primäre Rattenhepatozyten mit aufsteigenden Konzentrationen von PLL- sMPIO (20 bis 60 Partikel/ Zelle), COOH- sMPIO (40 bis 80 Partikel/ Zelle) und SA- sMPIO (60 bis 100 Partikel/ Zelle) markiert. Die Kontrollgruppen bestanden aus unmarkierten Rattenhepatozyten unter Standardkulturbedingungen und unmarkierten Rattenhepatozyten welche mit Eisenzitrat kultiviert wurden, um einen exogenen Eisenüberschuss (30 µg Eisen/ ml) zu simulieren.

3.6. Untersuchung der Partikelaufnahme und Toxizitätsstudien

3.6.1. Quantifizierung der Partikelaufnahme

Die intrazelluläre Aufnahme der Partikel in die Zellen wurde manuell ausgezählt. Die dazu generierten Bilder wurden ab dem 1. bis 7. Kulturtag mit Phasenkontrast- und Durchlichtmikroskopie (Axiovert 40CFL; Zeiss, Oberkochen, Deutschland) bei einer 200-fachen Vergrößerung aufgenommen. Randomisiert ausgewählte Fotoausschnitte der markierten Zellen in Form von quadratischen Feldern wurden für die manuelle Auszählung der aufgenommenen Partikel gewählt. Die Markierungseffizienz wurde wie folgt errechnet:

Markierungseffizienz = $\frac{\text{Nummer der markierten Zellen} \times 100}{\text{Totale Anzahl der Zellen}}$

3.6.2. Verifizierung der intrazellulären Lokalisation der sMPIO

Die intrazelluläre Lokalisation der Partikel wurde durch Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Dazu wurden primäre humane Hepatozyten mit Fluoreszin-sMPIO unter Standardbedingungen markiert, mit 4%igen Paraformaldehyd fixiert und durch eiskaltes Methanol permeabilisiert. Zelluläre zytoplasmatische Proteine und der Zellkern wurden durch sequentielle Inkubation mit Indocarbocyanine, DAPI und einem primären Antikörper gegen Cytokeratin 18 gefärbt. Die Aufnahmen wurden mittels eines Filtersets und einer Fluoreszenzlampe gemacht. Die intrazelluläre Lokalisation der sMPIO wurde außerdem durch den Gebrauch eines Elektronenmikroskops (EM 906; Zeiss, Oberkochen, Deutschland) untersucht. Dazu wurden Huh7 Zellen auf Glasplättchen unter Standardbedingungen kultiviert und mit 100 Partikel/ Zelle markiert. Die Bearbeitung der Proben nach der Zellmarkierung sowie die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden in der elektronenmikroskopischen Abteilung der Anatomie, Charité Universitätsmedizin Berlin - Campus Virchow durchgeführt. Die Zellen wurden in der Monoschichtkultur mit 2,5 % Glutaraldehyd und 2 % Osmium Tetroxid fixiert, mit aufsteigenden Alkoholkonzentrationen dehydratisiert und über Nacht in eine Eponhaltige Lösung filtriert. Die Plättchen wurden dann für 48 Stunden bei 60 °C in Kunststoffkapseln zur Polymerisierung platziert. Danach wurden sie wieder entnommen und ultradünne Schnitte wurden in ein Kupfergitter transferiert. Die Proben wurden mit 4 % wässriger Uranylazetat und Bleizitrat nach Reynolds gefärbt.

3.6.3. Toxizitätsstudien

Der cell- titer glow luminescent Test (Promega Corporation, Madison, WI, USA) wurde für die Toxizitätsuntersuchung der sMPIO genutzt. Dieses Assay basiert auf der Konversion von Luciferin durch eine rekombinante Luciferase in Anwesenheit von Adenosintriphosphat (ATP) und der Emission von Licht. Die Messungen wurden 18 Stunden nach der Markierung mit verschiedenen Konzentrationen von sMPIO Partikeln, nach Behandlung der Zellen mit Eisencitrat oder Triton X mit einem Fuostar Optima plate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany) durchgeführt.

3.7. Magnetresonanztomographie und T2 maps

Für die *in vitro* MRT Versuche wurde ein Agaroseblock (1 % Agarose und 0,5 mM/ ml Gadolinium) mithilfe einer speziell angefertigten Schablone gegossen. Die Schablone wurde auf die noch flüssige Agarosemasse aufgesetzt und die vertikalen, in ihrer Position variablen Stifte der Schablone dienten als Platzhalter (Abb. 2). So entstand

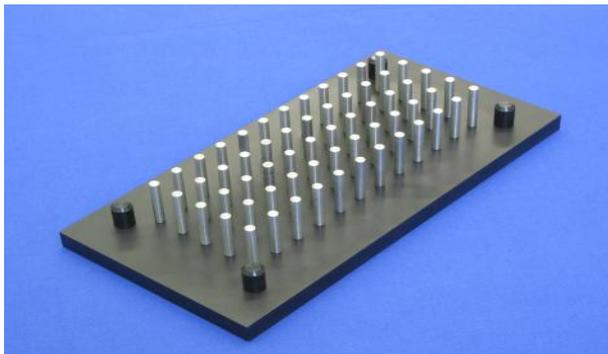


Abb. 2: Schablone zur Anfertigung eines Agarosephantommodells für die MR Messungen

ein Block mit 12 zirkulären Löchern, welche jeweils in 5 Reihen mit einer Tiefe von 10 mm und einem Durchmesser von 5 mm angeordnet waren. Markierte und native Huh7 Zellen und Hepatozyten wurden mittels

Trypsin/ EDTA von den Kulturplatten gelöst und resuspendiert. Eine Serie mit

aufsteigenden Zellanzahlen (500- 100000 Zellen) wurde in 100 μ l PBS verdünnt und in die Taschen des Agaroseblockes platziert. Danach wurden die Taschen vorsichtig mit PBS aufgefüllt um Verwirbelungen zu verhindern. Die MR Messungen wurden mit einem klinisch eingesetzten 3,0 Tesla MRT (Signa 3T94, GE Healthcare, Milwaukee, WI, USA) und einer 4 Phasen Kanal Rumpf Spule durchgeführt. Eine T2 gewichtete Fast- Spin- Echo- Sequenz, eine T2* gewichtete Sequenz und eine 3D T1 gewichtete LAVA Sequenz (Liver Acquisition with Volume Acceleration) wurden verwendet.

Details der LAVA Sequenz sind wie folgt: Repetitionszeit (Repetition Time, TR) 3,75 ms, Echozeit (Echo Time, TE) 1,756 ms, Inversionzeit (Inversion Time, IR) 5 ms, Anregungswinkel (Flip angle, FA) 12 °, Bildfeld (field of view, FOV) 296 mm, Schnittdicke (Slice Thickness, ST) 1,5 mm und 3 mm, 72,9 % Probe FOV, 90 % Phasen FOV, Rekonstruktionsmatrix 512 x 512. Um die T2 Querrelaxationszeit (T2

map) zu quantifizieren, wurde Relaxationsraten ($R2 = 1/T2$) und 2D fast spin echo Bildereigenschaften mittels einer Wiederholungsmessabfolge durchgeführt, in welcher alle Parameter bis auf die TE Zeit konstant gehalten wurden. Die TE Zeiten variierten wie folgt: TR 3,260 ms, TE 14,7/ 44,2/ 83,6/ 122,9/ 157,3 ms, FA 90 °, Echozuglänge 16, FOV 200 mm, ST 1 mm, 100 % Probe FOV, 60 % Phasen FOV, Rekonstruktionsmatrix 512 x 512.

Die T2 maps wurden Voxel für Voxel anhand der linearen Regression der logarithmierten Signalintensitäten errechnet. Das Berechnungsmodul ist in der Visualisierungs Software Amira, Version 5.22 (Visage Imaging, Berlin, Deutschland) implementiert. Die durchschnittliche T2 Relaxation Zeit wurde mithilfe der koronalen MRT Aufnahmen des Agaroseblockes, welcher die markierten Zellen enthielt, errechnet. Dazu wurden mittels der Software kreisförmige Volumina (Volume of interest, VOI) auf die Aussparungen des Blockes gelegt. In diesen festgelegten Bereichen wurde der Partialvolumeneffekt errechnet.

3.8. Schädigungs- und Syntheseparameter von sMPIO markierten Zellen

Leberzellenspezifische biochemische Zellschädigungsparameter (Asparat Aminotransferase, AST; Alanin Aminotransferase, ALT) und Syntheseparameter (Harnstoff) wurden aus den Überständen der kultivierten primären humanen Hepatozyten und der primären Rattenhepatozyten vom 1. bis zum 6 beziehungsweise 7. Kulturtag analysiert. Die Enzymaktivitäten der Asparat Aminotransferase und Alanin Aminotransferase wurden mittels der Spektrophotometrie basierten *NobiFlow- Kits* (NobiFlow GOT- IFCC, GPT- IFCC) gemessen. Die Harnstoffproduktion wurde durch einen enzymbasierten Detektionstest ermittelt (NobiFlow Harnstoff- UV, all HITADO, Mohnesee, Deutschland). Alle Tests wurden nach den Angaben des Herstellers verwendet.

3.9. Statistik

Die Daten werden als durchschnittliche \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Statistische Analysen (one- way ANOVA mit nachträglichen multiplen Vergleichen, Wilcoxon test) wurden mit Microsoft Excel für Mac 2004 (V11.3.6, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) und SPSS Version 13 für Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt. Ein p- Wert kleiner oder gleich 0,05 wurde als

statistisch signifikant berücksichtigt. Jedes Experiment wurde mindestens als Triplet durchgeföhrt und die Messungen mindestens zweimal wiederholt.

4. Ergebnisse

4.1. Morphologie der sMPIO

Die Elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten hochmonodisperse Partikel von annähernd einheitlicher Größe, absolut sphärischer Form und glatter Oberfläche (Abb. 3 A, B). Die Impedanzmessungen zeigten eine durchschnittliche Partikelgröße von $1,18 \mu\text{m}$ und einen Variationskoeffizientenwert unter 5 % für COOH- sMPIO, PLL- sMPIO und SA- sMPIO. Der mittels CSAAS ermittelte durchschnittliche Eisengehalt der COOH- sMPIO lag bei $1,13 \pm 0,02 \text{ pg Eisen/ Partikel}$, der Eisengehalt der PLL- sMPIO und der SA- sMPIO bei $0,86 \pm 0,08 \text{ pg Eisen/ Partikel}$ beziehungsweise $0,82 \pm 0,02 \text{ pg Eisen/ Partikel}$ (Abb. 3 C).

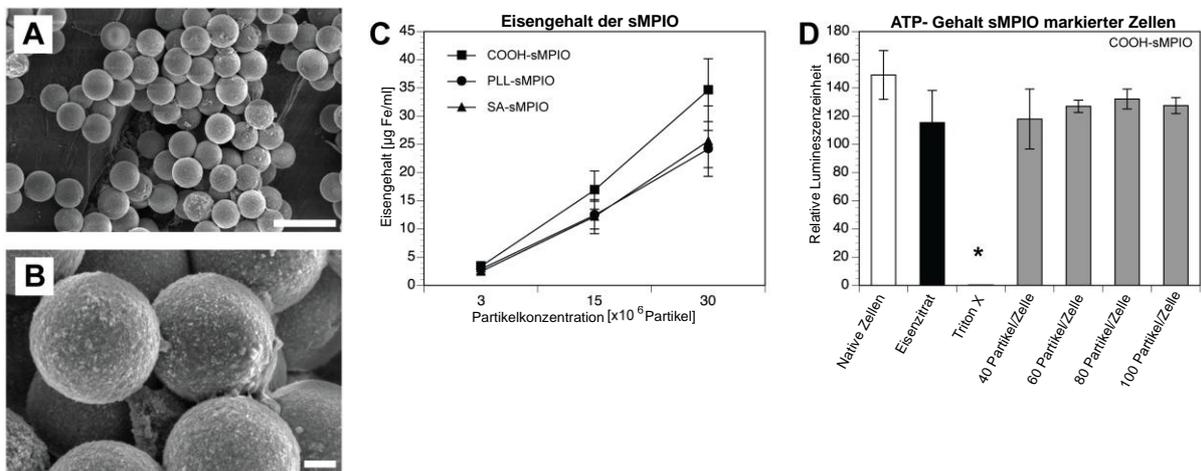


Abb. 3: Oberflächeneigenschaften und Eisengehalt der sMPIO. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von COOH- sMPIO zeigten monodisperse Partikel mit einer sphärischen Form (A, B). Die Eisenkonzentration wurde durch CSAAS ermittelt. Der Eisengehalt der Partikeldilution stieg linear mit der Partikelkonzentration an (C). Die Toxizitätsstudien zeigten keine signifikanten Unterschiede des ATP Gehaltes zwischen Huh7 Zellen, die mit aufsteigenden Konzentrationen von COOH- sMPIO markiert wurden, im Vergleich zu nativen Zellen. Zellen welche mit Triton X behandelt wurden, zeigten keine detektierbaren ATP Level (* $p < 0,05$ im Vergleich zu nativen Zellen). Maßstabbalken: $2 \mu\text{m}$ (A), 200 nm (B).

4.2. Toxizitätsstudien mit markierten Huh7 Zellen

Die Toxizitätsstudien mit HuH7 Zellen zeigten keine dosisabhängige Schädigung der Partikel. Native Zellen wiesen eine relative Lumineszenz Einheit (RLU) von 149 ± 17 auf, während die RLU von markierten Zellen (40 oder 100 COOH- sMPIO/ Zelle) einen Wert von 118 ± 21 beziehungsweise von 127 ± 6 aufwiesen. Die Behandlung mit Eisencitrat führte dagegen zu einer geringfügig stärkeren Abnahme des ATP Gehaltes in der Zelle. Eine Behandlung der Zellen mit Triton X führte zu einem

kompletten Abbau des ATP Gehaltes der Zelle ($p < 0,05$ im Vergleich zu nativen Zellen) (Abb. 3 D).

4.3. Markierung von Huh7 Zellen

Um die Möglichkeit der Zellmarkierung mit sMPIO zu untersuchen, wurden Huh7 Zellen mit einer Konzentration von 100 Partikel/ Zelle inkubiert. Nach vier stündiger Inkubationsperiode konnten die Partikel innerhalb der Zellen mittels Lichtmikroskopie detektiert werden (Abb. 4 A - C). PLL- sMPIO tendierten zur Bildung von Partikelagglomeration innerhalb der Zelle und auf der Kulturplatte. Bei den COOH- sMPIO und den SA- sMPIO konnten diese Ansammlungen nicht beobachtet werden. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen bestätigten die intrazelluläre Lokalisation der Partikel in adhärennten Huh7 Zellen (Abb. 4 E - G). Die Partikel waren lose in Zytoplasma verteilt und schienen von keiner Zellmembran umschlossen zu sein. Zwischen den verschiedenen Partikeln konnte keine unterschiedliche Lokalisation innerhalb der Zelle beobachtet werden. Die intrazelluläre Lokalisation der COOH- sMPIO in den humanen Hepatozyten konnte durch die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme demonstriert werden (Abb. 4 H). Die Quantifizierung der Partikelaufnahme in die Zellen zeigte Unterschiede zwischen den 3 Oberflächenmodifikationen der Partikel. Eine Inkubation mit 100 COOH- sMPIO/ Zelle resultierte in einer absoluten Internalisierung von 15 ± 4 Partikel/ Zelle mit einer Markierungseffizienz von 94 ± 4 %. Eine Inkubation mit der gleichen Menge an PLL- sMPIO führte zu einer signifikant höheren Partikelaufnahme von 23 ± 6 Partikel/ Zelle ($p = 0,006$) und einer signifikant höheren Markierungseffizienz von 98 ± 3 % ($p = 0,03$). Die Aufnahme von SA- sMPIO (5 ± 1 Partikel/ Zelle) und die Markierungseffizienz (72 ± 11 %) waren signifikant kleiner im Vergleich zu PLL- sMPIO und COOH- sMPIO ($p < 0,005$). Um den Partikelaufnahmemechanismus zu untersuchen, wurden Huh7 Zellen mittels zwei verschiedenen Kulturbedingungen mit sMPIO- markiert:

Eine Reduktion beziehungsweise Blockade des intrazellulären Energiestoffwechsels wurde durch Hypothermie ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) induzierte oder durch eine 30 minütige prä-Inkubation mit dem Zellgift Natriumazid induziert. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der absoluten Partikelaufnahme und in der Markierungseffizienz im Vergleich zu der Aufnahme und Markierung unter Standardkonditionen (Abb. 4 D). Dies suggeriert, dass die Partikelaufnahme in die Zellen durch energieunabhängige Mechanismen vermittelt wurde.

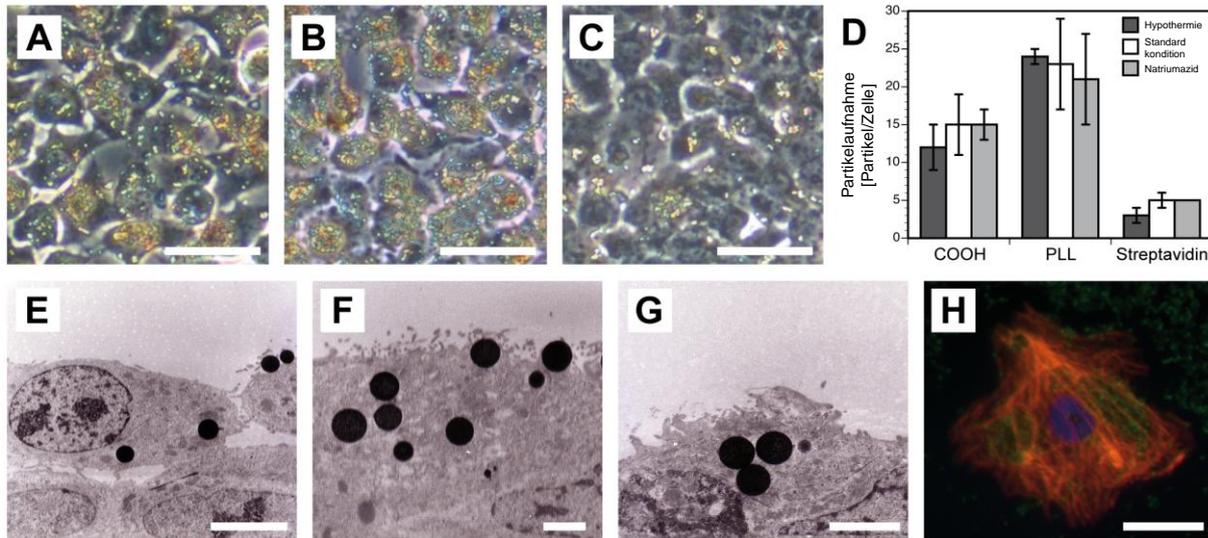


Abb. 4: Studien zur Partikelaufnahme. Markierung von HuH7 Zellen mit 100 Partikel/ Zelle (COOH- sMPIO: **A, E**; PLL- sMPIO: **B, F**; SA- sMPIO: **C, G**). Unter dem Lichtmikroskop sind die Partikel im Zytoplasma der Zelle sichtbar. Die Partikel Aufnahme wurde weder durch Markierung unter Hypothermie oder mit Natriumazid beeinflusst (**D**). Elektronenmikroskopische Aufnahmen demonstrierten die intrazelluläre Lokalisation der sMPIO in adhären Zellen (**E - G**). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden von markierten primären humanen Hepatozyten durchgeführt (**H**, rot: CK18; blau: Zellkern; grün: COOH- sMPIO). Maßstab Balken: 10 μ m (**A - C**), 2.5 μ m (**E - G**), 5 μ m (**H**).

4.4. Detektion der markierten Huh7 Zellen mittels 3,0 Tesla MRT

Um die Detektion von sMPIO in Zellen zu untersuchen, wurden *in vitro* MRT Messungen durchgeführt. Pure Partikel ohne Zellen induzierten eine homogene Signalauslöschung, ohne dass Unterschiede zwischen den drei Partikeltypen erkennbar waren. Huh7 Zellen, welche mit 100 Partikeln pro Zelle inkubiert wurden, induzierten im T1 und T2* gewichteten MRT eine Signalauslöschung, wobei das stärkste hypointense Signal in der T2* gewichteten MRT Sequenz zu sehen war. Unmarkierte Zellen verursachten keine detektierbaren Veränderungen im MRT Signal. Der Grad der Hypointensität stieg in Korrelation mit der Anzahl der inkorporierten Partikel pro Zelle und mit der Anzahl an Zellen in den Agarosetaschen (Abb. 5). In Messungen mit der T1 gewichteten LAVA Sequenz konnte der T2* Effekt von Huh7 Zellen, welche 23 ± 6 PLL- sMPIO/ Zelle enthielten ab einer Zellzahl von 5.000 Zellen in axialen und sagittalen Anschnitten detektiert werden. Mindestens 10.000 COOH- sMPIO markierte Zellen mit einer Partikelbeladung von 15 ± 4 Partikeln/ Zelle waren nötig um ein ähnliches Ergebnis zu erzielen. SA- sMPIO markierte Huh7 Zellen, welche 5 ± 1 Partikel pro Zelle enthielten, waren ab einer Zellzahl von mindestens 25.000 Zellen sichtbar (Abb. 5 C, D).

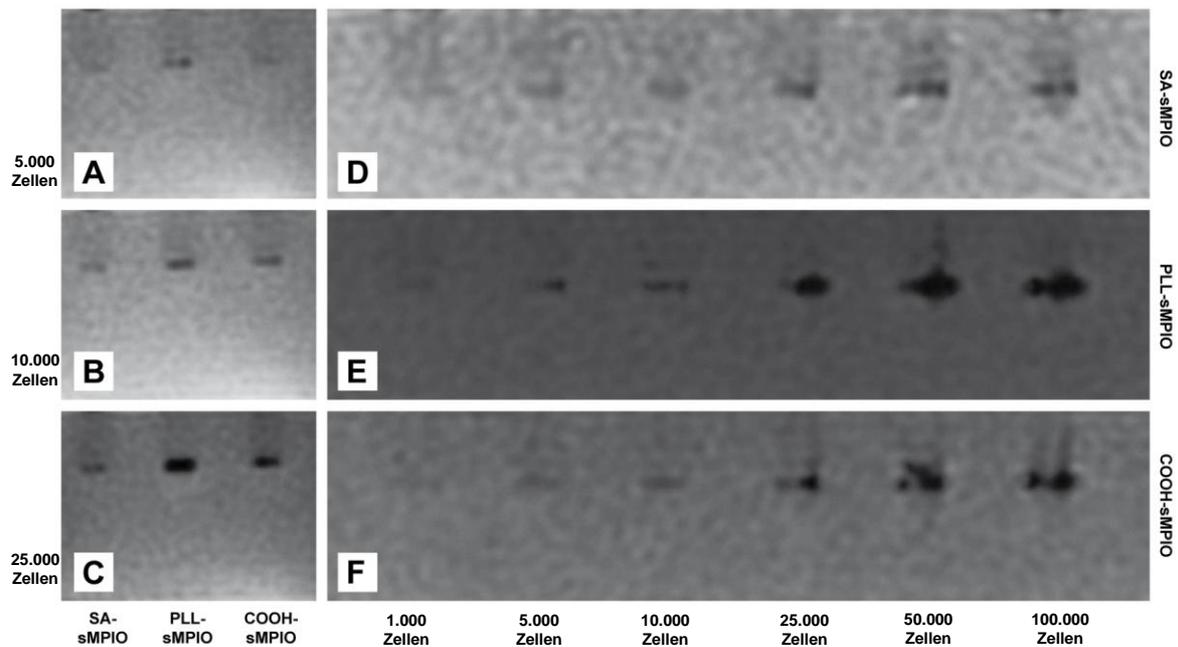


Abb. 5: Initiale MRT Studien mit HuH7 Zellen. Aufsteigende Mengen von markierten Zellen wurden in einem spezialangefertigten Agarosephantommodell in einem 3,0 Tesla MRT und mit einer Ganzkörperspule gemessen. Die Bilder zeigen axiale Schnitte mit ansteigenden Mengen von HuH7 Zellen (**A - C**). Die Zellen wurden mit PLL- sMPIO markiert und waren ab einer Konzentration von 5.000 Zellen (**A**) sichtbar. Die Detektion von COOH- sMPIO markierten Zellen und SA- sMPIO markierten Zellen gelang ab einer Konzentration von 10.000 Zellen (**B**) beziehungsweise 25.000 Zellen (**C**). Die sagittalen Schnitte zeigen die aufsteigende Anzahl an HuH7 Zellen (1.000; 5.000; 10.000; 25.000; 50.000; 100.000 Zellen) markiert mit SA- sMPIO (**D**), COOH- sMPIO (**E**) und PLL- sMPIO (**F**). Bildparameter: RT/ ET/ FA = 3,464 ms/ 1,6 ms/ 10 °; Schnittdicke: 3 mm; FOV: 34 × 32 mm; Matrix: 256 × 256.

Computer generierte T2 Maps aus den 2D fast Spin Echo Bildern bestätigten die bereits optisch beobachteten Differenzen der Signalauslöschung. PLL- sMPIO markierte Zellen, welche die höchste Anzahl von Partikeln enthielten, induzierten die größten Voxel Volumina (VOI) bei jeder untersuchten Zellverdünnung. Die R2 Relaxationsrate stieg nicht linear in Korrelation zu der aufsteigenden Zellmenge in den Agarosetaschen (Tabelle 1). Eine R2 Relaxationsrate von 11 pro Sekunde oder größer wurde durch 5.000 PLL- sMPIO markierte Zellen, 10000 COOH- sMPIO markierte Zellen und 25.000 SA- sMPIO markierte Zellen erreicht, was mit den morphologisch ausgewerteten Signal übereinstimmt.

Partikel	Partikelbeladung [Mittel \pm SD)	Anzahl der Zellen	R ₂ (1 / s)	
			Mittel	SD
COOH- sMPIO	15 \pm 4	1.000	9,91	0,77
		5.000	10,75	0,43
		10.000*	11,06	1,11
		25.000	12,80	0,70
		50.000	13,45	0,09
		100.000	14,23	1,13
PLL- sMPIO	23 \pm 5	1.000	10,55	0,49
		5.000*	11,15	0,73
		10.000	12,78	2,38
		25.000	13,08	0,18
		50.000	13,88	0,47
		100.000	14,90	0,06
SA- sMPIO	5 \pm 1	1.000	9,32	1,42
		5.000	9,23	0,70
		10.000	10,69	1,24
		25.000*	12,16	0,65
		50.000	12,50	0,85
		100.000	13,85	0,54

Tabelle 1: R₂ Relaxationsraten von sMPIO- markierten HuH7 Zellen. Die Relaxationsraten wurden voxelweise aus 2D fast spin echo MR Bildern kalkuliert, um die T₂ Relaxationzeit von sMPIO markierten Zellen zu quantifizieren. Die R₂ Relaxationsraten stiegen in Korrelation zu der steigenden Anzahl von markierten Zellen pro Tasche in dem Agarosephantommodell. PLL- sMPIO, welche die größte intrazelluläre Aufnahme bewirken, zeigten bei jeder Zellkonzentration die größte Änderung der Relaxationsrate. Eine Relaxationsrate von mindestens 11/ s wurde bei den morphologisch definierten detektierbaren Schwellen erzielt (*).

4.5. Markierung und Detektion von humanen primären Hepatozyten

Humane Hepatozyten wurden mit einer steigenden Anzahl der drei Partikeltypen (10 bis 100 Partikel) markiert, um die Abhängigkeit zwischen der Partikelaufnahme und der Inkubationskonzentration zu untersuchen. Die Ergebnisse von den initialen Studien mit Huh7 Zellen demonstrierten, dass eine absolute Aufnahme von mindestens 20 Partikeln/ Zelle nötig ist, um einen detektierbaren T2* Effekt eines Zellagglomerates mit einer T1 gewichteten MR Sequenz zu erzielen. Wie bei den Markierungsversuchen mit Huh7 Zellen hing die Aufnahme von der Partikeloberfläche ab. Die Partikelaufnahme stieg in linearer Korrelation zur Inkubationskonzentration (Tabelle 2).

Inkubations- konzentration [Partikel/ Zelle]	Partikelaufnahme [Mittlerer Partikelgehalt/ Zelle ± SD]		
	COOH- sMPIO	PLL- sMPIO	SA- sMPIO
10	10 ± 3	16 ± 6	10 ± 3
20	17 ± 0	19 ± 0	14 ± 1
40	22 ± 6	32 ± 6	17 ± 4
60	24 ± 12	41 ± 8	19 ± 1
80	43 ± 0	45 ± 8	28 ± 4
100	49 ± 18	62 ± 10	26 ± 4

Tabelle 2: Partikelaufnahme von primären humanen Hepatozyten. Die primären humanen Hepatozyten wurden mit einer aufsteigenden Partikelkonzentration inkubiert, um die Partikelaufnahme in Abhängigkeit zur Inkubationskonzentration zu untersuchen. Die Partikelaufnahme stieg linear zur Inkubationskonzentration. PLL- sMPIO zeigten die größte und SA- sMPIO die kleinste Menge aufgenommener Partikel.

Die MRT Messungen wurden mit humanen Hepatozyten durchgeführt, die mit einer Inkubationskonzentration von 60 Partikeln/ Zelle behandelt wurden. Bei T1 gewichteten LAVA Sequenzen waren die Hepatozyten, welche mit PLL- sMPIO (Partikelbeladung: 41 ± 8 Partikel/ Zelle) und SA- sMPIO (Partikelbeladung: 19 ± 1 Partikel/ Zelle) markiert wurden, ab einer Zellzahl von 7.500 Zellen detektierbar. COOH- sMPIO markierte Hepatozyten (Partikelbeladung: 24 ± 12 Partikel/ Zelle)

waren ebenfalls ab 7.500 sichtbar, jedoch generierten sie erst ab einer Zellzahl von 10.000 eine suffiziente Signalauslöschung (Abb. 6 A - D). In der T2* gewichteten MR Sequenz waren die mit den 3 Partikeltypen markierten humanen Hepatozyten bis zu einer minimalen Zellzahl von 1.000 Zellen detektierbar (Abb. 6 E - H).

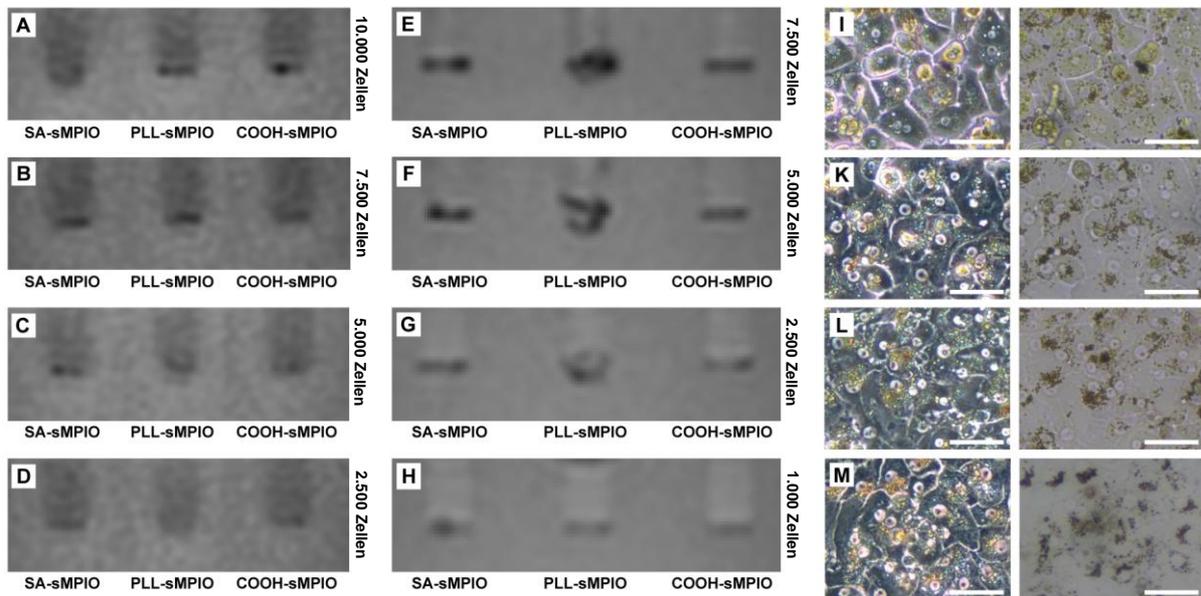


Abb. 6: Markierung und Abbildung von markierten humanen Leberzellen durch sMPIO. Die sMPIO markierten Zellen wurden durch ein T1 gewichtetes 3D LAVA (A - D) und T2* gewichtetes (E - H) MRT untersucht. Aufsteigende Mengen von markierten Zellen (A: 10.000 Zellen; B: 7.500 Zellen; C: 5.000 Zellen; D: 2.500 Zellen; E: 7.500 Zellen; F: 5.000 Zellen; G: 2.500 Zellen; H: 1.000 Zellen) wurden mit Hilfe eines Agarosephantoms untersucht. Markierte humane Hepatozyten wurden für 6 Tage in Adhäsionskultur kultiviert (I: Tag 1; K: Tag 2; L: Tag 4; M: Tag 6). Die Bilder wurden mittels Phasenkontrast- und Durchlichtmikroskopie bei einer 200 fachen Vergrößerung aufgenommen. Die Partikel sind im Zytoplasma der Zellen zu erkennen. Morphologische Änderungen wurden während der Kulturperiode nicht beobachtet. Maßstabsbalken: 10 µm (I - M).

4.6. Toxizitätsstudien mit markierten primären Hepatozyten

Primäre humane Hepatozyten und Rattenhepatozyten wurden genutzt um mögliche schädigende Effekte der sMPIO auf markierte Zellen zu untersuchen. Primäre Rattenhepatozyten wurden mit aufsteigenden Konzentrationen der drei Partikeltypen markiert. Wie erwartet stieg der intrazelluläre Partikelgehalt mit steigender Inkubationskonzentration (Abb. 7).

Die Partikelbeladung der Zellen tendierte zum Ende der Kulturperiode zum Anstieg. Der Austritt von Transaminasen in das Kulturmedium war über die gesamte Kulturperiode gering und nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zu nativen Zellen. Die Harnstoffproduktion stieg über die Kulturzeit an, zeigte aber keine

Unterschiede zwischen markierten und unmarkierten Zellen. Die aufsteigenden Inkubationskonzentrationen mit den drei verschiedenen Partikeltypen, welche in den Bereichen rangierten um eine suffiziente Detektion im MRT zu erzielen, hatten keine spezifischen negativen Effekte auf den Transaminasenaustritt oder die Harnstoffsynthese der Zellen.

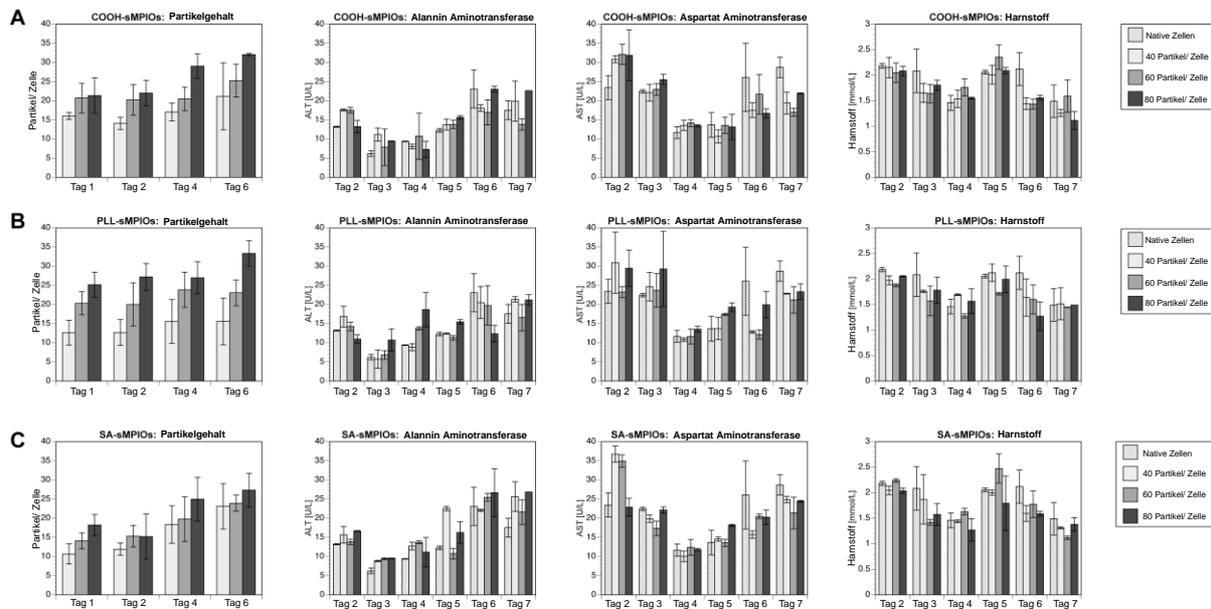


Abb. 7: *In vitro* Evaluation von markierten primären Rattenhepatozyten. Die Toxizitätsstudien wurden mit aufsteigenden Konzentrationen von COOH- sMPIO (A), PLL- sMPIO (B) und SA- sMPIO (C) durchgeführt. Der Austritt von Transaminasen (ALT und AST) und die Synthese von Harnstoff wurden gemessen. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen am gleichen Kulturtag wurden nicht beobachtet.

Um diese Ergebnisse mit humanen primären Hepatozyten zu bestätigen, wurden diese mit COOH- sMPIO bei einer finalen Inkubationskonzentration von 60 Partikeln pro Zelle markiert und kultiviert. Die markierten humanen Hepatozyten präsentierten eine polygonale Form, granuliertes Zytoplasma mit Vesikeleinschlüssen und einem oder mehrere Nuklei (Abb. 6 I - M). Die Markierung mit COOH- sMPIO resultierte in keiner Alteration der Zellmorphologie. Auch über die vollständige Kulturperiode konnte keine Änderung der Morphologie von den markierten und unmarkierten Zellen festgestellt werden. Die Markierung war über die Kulturperiode stabil (Abb. 8 A). Der AST und ALT Austritt von markierten und unmarkierten humanen Hepatozyten war am zweiten Kulturtag geringfügig erhöht (Abb. 8 B, C). Danach waren die Transaminaselevel der sMPIO markierten Zellen gering und unterschieden sich nicht signifikant von den Levels nativer Zellen. Die Harnstoffbildung war ähnlich der

nativen Kontrollgruppe (Abb. 8 D). Im Vergleich dazu war die AST Freisetzung von mit Eisen überstimulierten Zellen signifikant höher als die von nativen Zellen und sMPIO markierten Zellen am Kulturtag 3 bis 5. Der ALT Austritt von Eisen überstimulierten Zellen war am Kulturtag 3 signifikant höher als der von nativen und sMPIO markierten Zellen.

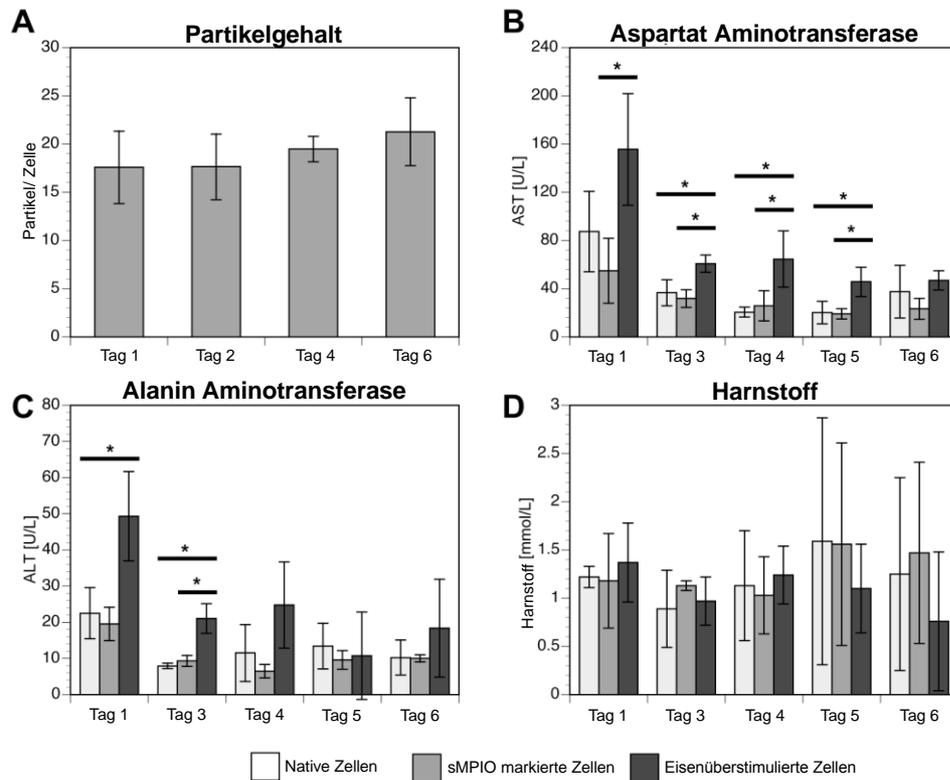


Abb. 8: *In vitro* Charakterisierung von COOH- sMPIO markierten primären humanen Hepatozyten. Partikelaufnahme (A) und biochemische Parameter (B - D) von COOH-sMPIO markierten primären humanen Hepatozyten. Die Zellen wurden mit einer Partikelkonzentration von 60 Partikel/ Zelle markiert. Eisenstimulierte Zellen wurden in Gegenwart von Eisenzitrat kultiviert. Die Daten sind wiedergegeben als Mittelwerte \pm SD. Signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen am selben Kulturtag: * $p < 0.05$.

5. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neuartiger auf Silizium basierter mikrometerskaliger Eisenoxidpartikel mit einer Carboxygruppenbeschichtung evaluiert, welcher Oberflächenmodifikationen ermöglicht. Fluoreszin, Poly- L- Lysin und Streptavidin wurden kovalent gebunden um die variable Funktionalisierbarkeit des sMPIO zu demonstrieren. Die Nutzung von COOH- sMPIO ermöglichen eine rasche Markierung von immortalen HuH7 Zellen und adulten primären Hepatozyten innerhalb von vier Stunden durch passive Aufnahmemechanismen. Nahezu 100 % der Hepatozyten haben die sMPIO während dieser kurzen Inkubationsperiode effizient aufgenommen. Um eine vergleichbare intrazelluläre Beladung mit Eisenoxid durch SPIO zu erzielen, sind höhere Partikelkonzentrationen und längere Inkubationszeiten nötig. Meist werden mehrere Millionen von nanometerskaligen Partikeln und Inkubationszeiten von 12 bis 48 Stunden benötigt um eine Zelldetektion unter MRT Bedingungen zu erreichen (48, 58). Eine Grundvoraussetzung für die erfolgreiche Transplantation von primären Zellen ist jedoch eine möglichst kurze *in vitro* Markierungsperiode, da die Zellqualität und die Zellvitalität in Abhängigkeit zur Kultivierungszeit sinkt, nachdem sie enzymatisch aus der adhärennten Kultur zur Gewinnung einer Zellsuspension gelöst werden.

Im Allgemeinen ist die intrazelluläre Aufnahme von Eisenoxidpartikeln abhängig von der verwendeten Zellart, der Partikelgröße und deren Oberflächeneigenschaften. Epitheliale, mesenchymale und hämopoetische Zellen internalisieren größere Partikeln intensiver als kleinere Partikel. Dabei treten Partikel mit einer positiv geladenen Oberfläche bevorzugt in Wechselwirkung mit der negativ geladenen Oberfläche der Zellen und werden vermehrt aufgenommen (54). Ein mehrfach oder sehr stark positiv geladener Partikel kann jedoch im Vergleich zu einfach positiv geladenen Partikeln das Potenzial haben, bei einigen Zelltypen die Aufnahme zu inhibieren (59). Im Gegenteil dazu suggerieren die Ergebnisse von Billotey et al. eine verbesserte Internalisierung von negativ geladenen Partikeln (60).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine kovalente Verknüpfung von positiv geladenen Poly- L- Lysin an der Partikeloberfläche in einer erhöhten intrazellulären Aufnahme resultiert. Diese Beobachtungen sind identisch mit den Ergebnissen aus Studien, welche sich Poly- L- Lysin als Transfektionmittel zur Effizienzsteigerung bei der intrazellulären Aufnahme von Nanopartikeln bedienen (6, 61). Eine Modifizierung

der sMPIO Oberfläche mit den neutral geladenen Streptavidin führte zu einer signifikanten Reduktion der aufgenommenen Partikelmenge. COOH- sMPIO, welche eine negative Oberflächenladung aufweisen, wurden moderater von den Hepatozyten internalisiert, als mit SA- sMPIO, jedoch nicht so stark wie durch PLL- sMPIO.

Die Methodik der Zellmarkierung mit sMPIO ist reproduzierbar und praktikabel. Die Menge der aufgenommenen Partikel ist konzentrationsabhängig und der Durchschnittsgehalt der Partikeln pro Zelle ist vorhersagbar und quantifizierbar. Dies sind grundlegende Voraussetzungen, um Rückschlüsse auf die Anzahl und die quantitative Entwicklung der Zellen *in vivo* anhand ermittelter MRT Daten zu ziehen. Der intrazelluläre Partikelgehalt steigt im Verlauf der Zellkultur progredient an ohne dass eine erneute Behandlung mit einer Partikelsuspension erfolgte. Eine Erklärung für diesen Effekt ist möglicherweise die beobachtete zunehmende Konfluenz und Ausdehnung der Zellen unter den *in vitro* Bedingungen. Die Freigabe der Partikel aus apoptotischen Zellen und deren Inkorporation von den verbliebenen Zellen kann so zu dem vermehrten Partikelgehalt der Zellen zum Ende der Kultivierungsperiode geführt haben.

Die Aufnahmekinetik der sMPIO wird weder durch Hypothermie noch durch die Blockade der zellulären Atmungskette beeinflusst. Diese Beobachtungen zeigen, dass die Internalisierung der sMPIO durch energieunabhängige Mechanismen vermittelt wird. Im Gegensatz dazu berichten Kunzman et al. dass die Aufnahme von nanometerskaligen Siliziumpartikel in Makrophagen und Dendritischen Zellen durch einen aktiven und vom Zytoskelett abhängigen Prozess stattfindet (62). Die in der Arbeit verwendeten Hepatozyten gehören zu der Familie der nicht phagozytierenden Zellen und sind nicht in der Lage große Moleküle oder Partikel durch aktive Phagozytose zu aufnehmen. Die Resultate der Endozytoseinhibitionsversuche suggerieren, dass die sMPIO an der Zelloberfläche der adhärennten Zellen haften und passiv mittels Gravitationskraft die Zellmembran penetrieren. Diese Hypothese wird durch elektronenmikroskopische Aufnahmen gestützt, welche die sMPIO um das perinukleare Zytoplasma ohne eine membranöse Umhüllung zeigen, wie sie typischerweise bei aktiv endozytierten Partikeln zu finden wäre. Einige Untersuchungen zu der potenziellen Aufnahmemenge in Abhängigkeit der Partikelgröße von Shapiro et al. zeigen ebenfalls, dass adhärennte Maushepatozyten in der Lage sind große mikrometerskalige Partikel (Partikeldurchmesser 0,96 µm bis

5,8 μm) ohne die Hilfe von Transfektionsagenzien oder sonstige Modifikationen der Oberfläche aufzunehmen (48).

Die bisher entwickelten MPIO waren zusammengesetzt aus Polymeren welche von der FDA nicht für eine humane Anwendung zugelassen sind. Silizium, welches für die Herstellung der sMPIO verwendet wurde, ist biologisch kompatibel, reaktionsträge, nicht toxisch und bereits von der FDA als Oberflächenmaterial eines Partikels für die klinische Anwendung zugelassen (55). Der Zellmarkierungsprozess mit sMPIO zeigte innerhalb der kompletten Kultivierungsperiode keine schädigenden Einflüsse auf die kultivierten Hepatozyten und die intrazellulären sMPIO blieben in der Form existent und stabil. Initiale Toxizitätsstudien mit HuH7 Zellen zeigten keine Veränderung im ATP Gehalt durch die Inkubation mit COOH- sMPIO im Vergleich zu nativen Zellen. Die *in vitro* Kultivierung von primären Hepatozyten, welche ein präziseres Modell für *in vivo* Konditionen darstellt, wurden für die weiteren Versuche genutzt. Die Markierung von primären Rattenhepatozyten mit aufsteigenden Partikelkonzentrationen der drei verschiedenen sMPIO führte zu keiner signifikanten AST oder ALT Abgabe in das Kulturmedium. Diese Resultate konnten mit primären humanen Hepatozyten bestätigt werden. Die Markierung war stabil und eine Freisetzung oder Degradation der Partikel wurde nicht beobachtet. Obwohl weitere Studien zur Langzeittoxizität und Stabilität erforderlich sind, deuten diese Daten darauf hin, dass die sMPIO biologisch inaktiv sind und keine toxischen Einflüsse in dem beobachteten Zeitraum induzieren. Die Zellen bleiben während und nach dem Markierungsvorgang vital und zeigen über den gesamten Verlauf dieselbe Morphologie wie nicht markierte Hepatozyten.

Für die Bildgebung in dieser Arbeit wurde ein 3,0 Tesla MRT genutzt, welches routinemäßig in den meisten Krankenhäuser verfügbar ist. Um die Zellen in einer mit der klinischen Bildgebung vergleichbaren Situation darzustellen, wurden keine speziellen Gradienten oder Hardwaremodifikationen eingesetzt. Die Partikel sind sehr stark monodispers, was ein vergleichbares Signal und damit ein reproduzierbares Bild von markierten Zellen garantiert.

Die MR Aufnahmen wurden mittels eines Agarosephantommodells unter Nutzung einer T2* gewichteten Sequenz durchgeführt und ermöglichen die Detektion eines Zellclusters bestehend aus 1.000 markierten Zellen, unabhängig von der Partikeloberflächenmodifikation. Die T2* Sequenz ist sehr sensitiv und spezifisch für die magnetischen Suszeptibilitätseffekte durch Eisenoxide, doch sie erweist sich als

ungeeignet für die klinische Bildgebung der Leber da lange Atempausen für ein befriedigendes Bild notwendig sind. Dies zeigte sich in einigen Vorarbeiten der Arbeitsgruppe (31). Daher wurde die 3D T1 gewichtete LAVA Sequenz konzipiert um den T2* Effekt von markierten Zellen im Abdomen unter klinischen Konditionen bestmöglich wiedergeben zu können. Diese Sequenz hat eine kurze Messungszeit, welche die potenziell erforderlichen Atempausen zwischen den Messungen erlaubt. Es können so mit dem verwendeten Sequenzprotokollen MR Bilder ohne respiratorische Bewegungsartefakte generiert werden. Die COOH- sMPIO markierten Zellen ermöglichten mittels 3D T1 gewichteter LAVA Sequenz die Detektion von mindestens 10.000 markierten Zellen. PLL- und SA- sMPIO markierte Zellen produzieren ab 7.500 Zellen einen sichtbaren MR Kontrast, obwohl die Partikelaufnahme zwischen den beiden Partikeln sehr unterschiedlich ist. Eine mögliche Erklärung könnte die starke intrazelluläre Clusterbildung von den PLL modifizierten sMPIO sein, welche das detektierbare Level beeinflussen könnte. Dazu kann die Genauigkeit der mikroskopischen Partikelanzahl durch die Clusterbildung beeinflusst sein, was mit den höheren Standardabweichungen in dieser Gruppe korreliert. Diese Vermutung wird zusätzlich durch den nicht linearen Anstieg der R2 Relaxationsrate von sMPIO markierten Zellen gestützt. Normalerweise würde man eine lineare Korrelation zwischen der Änderung der Relaxationsrate und dem Kontrastmedium, in diesem Fall dem Partikel, erwarten. Diese nicht lineare Beziehung kann durch eine Agglomeration der intrazellulären Partikel im Agarosephantom verursacht sein. Die Detektion wird durch diesen Effekt nicht beeinflusst. Jedoch ist es durch diese inhomogene Verteilung kaum möglich die Eisenbeladung der Zellen mittels der generierten MR Bilder und der Relaxationsraten quantitativ zu bestimmen.

Der Eisengehalt der sMPIO von ungefähr 1 pg Eisen/ Partikel ist mit den bisher kommerziell erwerblichen MPIO vergleichbar, doch die sMPIO generieren einen stärkeren MR Kontrast. Eine Studie von Raschzok et al., in der eine MR Detektion aufsteigender Konzentrationen von markierten primären Hepatozyten mit MPIO (Bangs Laboratories Inc., Fishers, IN, USA) unter Verwendung derselben humanen Ganzkörperspule und derselben Bildsequenzen wie in dieser Arbeit erfolgte, zeigte dass MPIO markierte Zellen im Gegensatz zu sMPIO markierten Zellen erst ab einer Zellzahl von 50.000 (3D T1 gewichteten LAVA Sequenz) beziehungsweise ab einer Zellzahl von 10.000 (T2* Sequenz) detektiert werden können.

Trotz der Zunahme der Detektionseffektivität durch die Nutzung von sMPIO im Gegensatz zu herkömmlichen MPIO war eine Einzelzelldarstellung von markierten Zellen unter klinischen MR Bedingungen bisher nicht realisierbar. Für die Generierung von abdominellen Schnittbildern eines Patienten sind im Gegensatz zum Kleintiermodell Spulen mit einem großen Durchmesser nötig. Die Auflösung des Bildes wird in Abhängigkeit der Größenzunahme der verwendeten Spule verringert und das Kontrastmittel weniger sensitiv wahrgenommen. Eine ausgleichende Zunahme der magnetischen Flussdichte erlaubt dabei die Akquisition von Bildern mit einer höheren räumlichen und zeitlichen Auflösung bei gleichzeitiger Minimierung der Scan Zeit. So weist beispielsweise ein 3,0 Tesla MR Scanner im Vergleich zu einem 1,5 Tesla MRT eine 2- fache Steigerung des Signal zu Rausch Verhältnisses auf (63, 64). Dennoch kann der Nutzen dieses physikalischen Zusammenhangs zwischen magnetischer Flussdichte und höherer Bildauflösung im klinischen Gebrauch nicht bis in das Unendliche gesteigert werden. Die Effekte des Magnetfeldes auf markierte Zellen wurde in einer Studie von Schäfer et. al. untersucht. Hierbei zeigte sich eine Hochregulation von CD93 und Cadherin 7 und eine Deregulation von Zinkfingerdomänen in SPIO markierten humanen mesenchymalen Stammzellen nach der Einwirkung des magnetischen Feldes. Auch unmarkierte Zellen zeigten eine veränderte Genexpression nach der 3,0 Tesla MRT Exposition. Die Eigenschaft Kolonien zu formen wurde 24 Stunden nach der Exposition aber nur bei den markierten Zellen signifikant beeinflusst. Jedoch konnten die markierten Zellen ihre kolonieformenden Fähigkeiten nach 12 Tagen komplett wiederherstellen (21). Eine Arbeit von Bae et al. über die Auswirkungen des statischen Magnetfeldes eines 1,5 Tesla MRT auf mit SPIO markierten Zellen, konnte eine verminderte Zellvitalität proportional zur einwirkenden Feldstärke und Dauer der Exposition aufzeigen (65). Demnach könnte ein statisches Magnetfeld einen synergistischen zytotoxischen Effekt haben, welcher die Vitalität reduzieren und Apoptose stimulieren kann. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass zur Detektion von markierten Zellen durch eine Exposition von ultrahohen Magnetfeldern, welche in experimentellen Studien verwendet werden, eine Zytotoxizität nicht ausgeschlossen werden kann. Solche möglichen Effekte müssen besonders bei der Transplantation von langlebigen Zellen, welche im Patienten persistieren und sich teilen, sorgfältig untersucht werden. Demnach ist das Ziel, die Kontrastmittel bestmöglich zu optimieren um deren Sensitivität auch bei geringen Feldstärken gewährleisten zu können. Eine Gefahr

welche auch bei hochsensitiven Markern existiert, ist dass zwar die Präsenz des Kontrastmittels detektiert werden kann, jedoch nicht, ob der Marker mit der relevanten Zelle assoziiert ist (11). In einer Studie in der SPIO markierte Epikardzellen in ein ischämisches Myokard einer Maus transplantiert wurden, konnten keine Unterschiede der Signalstärke oder deren Lokalisation und Größe im MRT im Bezug auf die Applikation markierter lebendiger oder markierter toter Zellen über einen Zeitraum von 6 Wochen beobachtet werden (66).

In einer anderen Studie in der durch Hitze getötete und mit MPIO markierte Hepatozyten in die Milz einer Versuchsm Maus injiziert und korrespondierende MR Bilder der Leber nach der Transplantation aufgenommen wurden, konnte zwischen den toten und lebenden Zellen unterschieden werden. Im Vergleich zu lebend applizierten markierten Zellen, welche punktförmige dichte Kontraste in der Leber produzierten, wurden nach Gabe der toten Zellen ein unscharfer, körniger und schwächerer Kontrast beobachtet. Lebern, in welche eine große Menge freier Partikeln über die Milz der Tiere und intravenös injiziert wurde, zeigten ebenfalls einen hypointenseren Kontrast als vergleichbare markierte Zellen mit intrazellulären dichten Partikelanhäufungen (49). Demnach konnte anhand der Verteilungsmuster der großen MPIO im Gegensatz zu den SPIO die differenten Entitäten voneinander unterschieden werden.

Da die Markierung der Zellen in einer *in vitro* Kultur erfolgt und deren Markierungserfolg evaluiert wird, gilt generell kurz nach der Transplantation der Erhalt eines Markers in der transplantierten Zelle als gewährleistet. Ein mögliches Problem entsteht erst, wenn die Zellen sich anfangen *in vivo* zu teilen, zu migrieren oder zu sterben. Die Kontrastmittel könnten in diesem Fall an Nachbarzellen, an die extrazelluläre Matrix oder an Zellen aus der Makrophagenfamilie übertragen werden und so zu potenziell unspezifischen Signalen führen. Veränderungen der Lokalisation von intrazellulären Markern in MR Bildern über einen Zeitraum können daher intakte lebendige und migrierende Zellen suggerieren oder aber Phagozyten mit aufgenommenen Partikeln und deren physiologischen Bewegungen im Körper reflektieren (11, 25). Eine andere Komplikation ist, dass gewisse endogene Konditionen ebenfalls ein hypointenses MR Signal hervorrufen können. So können Hämosiderin beladene Makrophagen in infarziertem Myokardgewebe gefunden werden, deren hypointenses Signal möglicherweise nicht von dem Signal einer mit Partikeln markierten Zelle unterschieden werden kann (27).

Diese Studien zeigen, dass trotz eines positiven MR Signals *in vivo* das Schicksal von Zellmarkern sehr gründlich charakterisiert werden muss, ehe Rückschlüsse über die Anzahl, die Lokalisation und damit über den Erfolg der Behandlung getroffen werden können. Aktive MR Kontrastmittel, welche nur ein Signal produzieren, wenn sie sich innerhalb einer vitalen Zelle befinden, könnte diese Einschränkungen umgehen. Auf diesem Gebiet gibt es bereits einige spannende Entwicklungen wie beispielsweise der Gebrauch von einem sogenannten nicht- Protonen MRT für die Zelldetektion. Dabei wird die Markierungssubstanz ¹⁹Fluor anstelle von einem metallbasierten Kontrastmittel genutzt. Da der lebende Organismus frei von endogenen Fluoratomen ist, können die Nanopartikel als „Hot Spots“ auf den ¹⁹Fluor MRT Bildern gesehen werden (11, 67).

Eine andere Methode ist der Gebrauch von optischen Reporter Genen. Dies sind Gene, welche sich in die Zelle integrieren und dessen Produkte leicht detektiert werden können. Die Hauptapplikation solcher künstlich in eine Zelle gebrachten Gene schließt das Überwachen von Genexpressionslevels, die Kontrolle von dynamischen Interaktionen in der Zelle und das Aufspüren von transplantierten Zellen im Organismus ein (68). Über die Jahre wurden viele Reporter Gene erzeugt, die in der Lage sind Licht via Biolumineszenz oder Fluoreszenz in multiplen unterschiedlichen Wellenlängen zu emittieren (69). Die ersten Reporter Gene, die einen intrazellulären MR Kontrast produzieren, sind enzymbasierte MR Reporter Gene. Die Manipulation der Eisenkonzentration in einer Zelle durch eisenbasierte Reporter Gene führt zu einer wahrnehmbaren Veränderung im MR Kontrast (70). Dies könnte eine zuverlässige Methode darstellen, sich schnell und asymmetrisch teilende Zellen ohne Signalverlust zu detektieren, da die Reporter Gene bei jeder Zellteilung auf die Tochterzelle übertragen werden. Aus klinischer Sicht ist die Transfektion von Genen in eine Zelle jedoch kritisch zu betrachten und so sind, trotz der vielversprechenden Erfolge, sicher noch einige Hürden zu überwinden ehe man Reporter Gene im menschlichen Körper als MR Kontrastmittel ohne Risiken einsetzen kann.

Eisenoxidpartikel sind durch ihre einfache Anwendung und Unschädlichkeit das am weitesten verbreitetste und sicherste intrazelluläre Kontrastmittel. Diese Partikel sind relevant für die Weiterentwicklung der Leberzelltransplantation bei der Therapie akuter oder hereditärer Lebererkrankungen. So kann der Patienten die Zeit bis zur Verfügbarkeit eines geeigneten Spenderorgans ohne neurologische Schäden

überbrücken. Bisher konnte nur eine temporäre Besserung jedoch keine Heilung durch eine Zelltransplantation induziert werden, da die Integration der transplantierten Zellen durch einen fehlenden Überlebensvorteil gegenüber den körpereigenen Zellen im Empfängerorgan trotz Immunsuppression zeitlich limitiert wird.

Ein Hepatozyt hat einen Durchmesser von 20 bis 40 μm , die Fenestrationen der Lebersinusoiden betragen jedoch nur 6 bis 9 μm . Diese Größendiskrepanz verursacht eine temporäre portale Hypertonie und einen ischämischen Reperfusionsschaden nach der Hepatozytentransplantation. Diese Effekte stimulieren ortsansässige Kupferzellen mit nachfolgender TNF α Freisetzung, und Steigerung der vaskulären Permeabilität. Dadurch „kleben“ die transplantierten Zellen an dem aktivierten Endothel und können in das Leberparenchym translozieren, wo sich gap junctions und Gallenkanälchen zwischen transplantierten und Empfängerleberzellen ausbilden. Über 70 % der transplantierten Hepatozyten verbleiben jedoch im komplexen Portalvenensystem der Leber und können sich nicht in das Organ integrieren. Tiermodelle haben gezeigt, dass nach einer Leberzelltransplantation von 3 bis 5 % der Empfängerlebermasse nur eine Zellmenge von 0,5 % der Empfängerlebermasse anwächst. Eine signifikante Leberrepopulierung durch Spenderzellen gelang bisher nur dann, wenn die ansässigen Hepatozyten zerstört oder ihr Metabolismus zuvor geblockt wurde (12, 71). Bei der tierexperimentellen Leberzelltransplantation wird oft das Alkaloid Retrorsine appliziert und ein Proliferationsstimulus durch eine Leberteilektomie induziert. Die Leberteilektomie führt zu einer kompensatorischen Proliferation der verbliebenen Hepatozyten bis zum Nachwachsen der Leber auf ihre ursprüngliche Größe. Die Applikation von Retrorsine führt in Ratten zu einer primären vaskulären Schädigung mit Ödembildung und Hämorrhagie. Sekundär kommt es zu einer hepatozellulären periportalen Nekrose in der Leber (72). Die nachfolgend transplantierten Zellen gelangen so in ein Milieu, welches die Zellproliferation und Zellteilung, ausgelöst durch die Leberteilektomie, selektiv für die Spenderzellen anregt, da die Empfängerleberzellen selbst durch das hepatotoxische Retrorsine teilungsunfähig sind. Moleküle aus der Retrorsinefamilie sind durch ihre toxische und kanzerogene Wirkung für den klinischen Gebrauch nicht zulässig. Eine weitere Strategie ist die direkte Bestrahlung der Leber vor der Zelltransplantation, welche erfolgreich im Kleintiermodell zur Korrektur angeborener metabolischer Defizite eingesetzt wurde. Die Bestrahlung inhibiert die Proliferation der körpereigenen

Leberzellen und führt zum Zelltod. In diesen „Raum“ haben die transplantierten Zellen die Möglichkeit sich zu teilen und die bestrahlte Leber zu repopulieren. In Gunn Ratten, einem Tiermodell für Crigler-Najjar-Syndrom assoziierter Hyperbilirubinämie, führte eine fokussierte Leberlappenbestrahlung vor einer Zelltransplantation zu einer kompletten Korrektur der leberbasierten metabolischen Erkrankung. Um einen verbesserten Therapieerfolg zu erzielen, befürworten einige Autoren die Teilbestrahlung der Leber mit geringen Strahlendosen, auch in der klinischen Anwendung. Jedoch sind die Langzeitfolgen einer solchen Anwendung nicht zufriedenstellend einzuschätzen und sollten vor allem bei jungen Patienten kritisch betrachtet werden (4, 12).

Eine im klinischen Alltag bereits angewendete Technik ist eine vaskuläre Embolisation eines Teiles der Leber beispielsweise im Rahmen eines malignen Krebsleidens. Eine Übertragung und Modifikation dieses Verfahrens zur Nutzung für die Zellapplikation ist die temporäre Ligatur der Portalvene durch resorbierbares Material. Durch die ischämische Schädigung der Embolie wird nach Wiederherstellung des Blutflusses eine regenerative Antwort ausgelöst und die im Anschluss transplantierten Hepatozyten in der Empfängerleber stimuliert (71). Doch auch in diesem Fall würden potenziell gesunde Hepatozyten geschädigt und der Körper einer enormen Stressreaktion durch die ischämischen Folgen ausgesetzt. Eine elegantere und ambitioniertere Lösung des Problems ist spezielle Wirkstoffe in die Partikelsysteme zu integrieren um einen Partikel zu erschaffen, welcher sowohl die medizinische Bildgebung und Diagnostik als auch eine simultane und gezielte Zustellung von therapeutischen Komponenten gewährleisten kann. Diese Kombination aus diagnostischen und therapeutischen Komponenten wird durch sogenannte „*Theranostics*“ realisiert. Solche multimodalen Partikel offerieren ein großes Feld in der personalisierten Medizin (73). In zahlreichen Studien wurden bereits funktionelle Eisenoxidpartikel entwickelt, welche mittels Konjugation von multiplen Komponenten wie Fluoreszenzfarbstoffen und Medikamenten an einer Siliziumoberfläche sowohl eine multimodale Bildgebung als auch eine gezielte intrazelluläre Wirkstoffinteraktion ermöglichen (53, 62, 74). Angelos et al. benutzen mesoporöse Silizium Nanopartikel mit inkorporierten molekularen Nanolaufräder und Nanoventilen in der Partikelstruktur um so hydrophobe Zytostatika an Krebszellen abzugeben (75). Wang et al. nutzen einen theranostischen Nanopartikel um das Überleben von Inselzellen nach Zelltransplantation zu steigern. Dabei werden die

Zellen mit SPIO markiert, an deren Oberfläche kleine Interferenz RNA Moleküle (small interfering RNA, siRNA) binden. Diese zielen auf β 2 Mikroglobulin ab, eine Schlüsselkomponente des Major Histokompatibilitätskomplexes (MHC) Klasse I Proteins. Eine verminderte Expression von beta 2 Mikroglobulin auf den Inselzellen führt zu einem dysfunktionalen MHC Klasse I Protein und resultiert in einer Beeinträchtigung der Immunantwort und Abstoßungsreaktion im Empfänger. Zusätzlich zur Funktion als siRNA- Träger können die theranostischen Partikel die nicht invasive Zelldetektion mittels MRT ermöglichen (76).

Das steigende Interesse an den Mechanismen der Leberregeneration und die zunehmende Identifikation der involvierten molekularen Botenstoffe, steht im Einklang mit dem Interesse derer potenzieller Beeinflussung. Aus der klinischen Perspektive ist das Verständnis der Leberregeneration essentiell für eine angemessene Therapie, beispielsweise ob ein Hepatozyt bei fortschreitender Zirrhose seine replikativen Fähigkeiten verliert oder ob die Proliferationsaktivität durch Faktoren wie Zytokine oder Transkriptionsfaktoren wieder hergestellt werden kann. Ein exogenes Substratangebot von Wirkstoffen, die auf zellulärer Ebene diese Regenerationsmechanismen selektiv für die Spenderzellen beeinflussen, könnten den transplantierten Zellen einen Überlebensvorteil gegenüber den nativen Zellen bieten und möglicherweise das Engraftment erhöhen. Die sMPIO können aufgrund ihrer Oberfläche durch kovalente Bindung von Proteinen oder Antikörpern mannigfaltig modifiziert werden und stellen so eine Basis für den Aufbau von spezifischen *Theranostics* dar.

6. Abkürzungsverzeichnis

ALT	Alanin Aminotransferase
AST	Aspartat Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
COOH	Carboxygruppe
CSAAS	continuum source atomic absorption spectrometry
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DZ	Dendritische Zellen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalografie
EGF	Epidermal Growth Factor
EGTA	Ethylenglycol- bis (Aminoethylether)- N,N,N',N'- Tetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskop
FA	Flip Angle
FDA	US Food and Drug Administration
FOV	Field of View, Bildfeld
Gd- DTPA	Gadopentetat- Dimeglumin
HEPES	2- (4- (2- Hydroxyethyl)- 1- Piperaziny)- Ethansulfonsäure
Huh7	hepato cellular carcinoma
IR	Inversion Time
LAVA	Liver Acquisition with Volume Acceleration
LDL	Low Density Lipoprotein
MHC	Major Histocompatibility Complex
MION	MonocrySTALLINE Iron Oxide Particle
MPIO	Micron- sized
MR	Magnetresonanz
MRI	Magnetic Resonance Imaging
MRT	Magnetresonanztomographie
MSC	Mesenchymale Stammzellen
PBS	Phosphate Buffered Saline
PLL	Poly- L- Lysin

ROS	Reactive Oxygen Species
SA	Streptavidin
SD	Standardabweichung
siRNA	Small Interfering RNA
sMPIO	Silizium basierter mikrometerskaliger Eisenoxidpartikel
SPIO	small superparamagnetic Iron Oxide Particle
ST	Slice Thickness
TE	Echo Time
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TR	Repetition Time
T1	Longitudinale Relaxation
T2	Transversale Relaxation
USPIO	Ultrasmall Iron Oxide Particle
VOI	Volume of Interest

7. Literatur

1. Benninghoff, Drenckhahn D. Anatomie Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Urban und Fischer, Band 1;16. Auflage 2003
2. Sgroi A, Serre- Beinier V, Morel P, Bühler L. What clinical alternatives to whole liver transplantation? Current status of artificial devices and hepatocyte transplantation. *Transplantation*. 2009 Feb 27;87(4):457- 66.
3. Bernal W, Auzinger G, Dhawan A, Wendon J. Acute liver failure. *Lancet*. 2010 Jul 17;376(9736):190- 201.
4. Soltys KA, Soto- Gutiérrez A, Nagaya M, Baskin KM, Deutsch M, Ito R, et al. Barriers to the successful treatment of liver disease by hepatocyte transplantation. *J Hepatol* 2010;53:769- 74.
5. Bilir BM, Guinette D, Karrer F, Kumpe DA, Krysl J, Stephens J, et al. Hepatocyte transplantation in acute liver failure. *Liver Transpl* 2000;6:32- 40.
6. Zhou B, Shan H, Li D, Jiang ZB, Qian JS, Zhu KS, Huang MS, Meng XC. MR tracking of magnetically labeled mesenchymal stem cells in rats with liver fibrosis. *Magn Reson Imaging*. 2010 Apr;28(3):394- 9.
7. Meyburg J, Das AM, Hoerster F, Lindner M, Kriegbaum H, Engelmann G, Schmidt J, Ott M, Pettenazzo A, Luecke T, Bertram H, Hoffmann GF, Burlina A. One liver for four children: first clinical series of liver cell transplantation for severe neonatal urea cycle defects. *Transplantation*. 2009 Mar 15;87:636- 41.
8. Deutsche Stiftung Organtransplantation (DSO); www.dso.de
9. Stockmann HB, IJzermans JN. Prospects for the temporary treatment of acute liver failure. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2002 Feb;14(2):195- 203.
10. Sauer IM, Kardassis D, Zeillinger K, Pascher A, Gruenwald A, Pless G, Irgang M, Kraemer M, Puhl G, Frank J, Müller AR, Steinmüller T, Denner J, Neuhaus P, Gerlach JC. Clinical extracorporeal hybrid liver support- - phase I study with primary porcine liver cells. *Xenotransplantation*. 2003 Sep;10(5):460- 9.
11. Srinivas M, Aarntzen EH, Bulte JW, Oyen WJ, Heerschap A, de Vries IJ, et al. Imaging of cellular therapies. *Adv Drug Deliv Rev* 2010;62:1080- 93.
12. Fitzpatrick E, Mitry RR, Dhawan A. Human hepatocyte transplantation: state of the art. *J Intern Med* 2009;266:339- 57.

13. Quaglia A, Lehec SC, Hughes RD, Mitry RR, Knisely AS, Devereaux S, et al. Liver after hepatocyte transplantation for liver- based metabolic disorders in children. *Cell Transplant* 2008;17:1403- 14.
14. Hughes RD, Mitry RR, Dhawan A. Current status of hepatocyte transplantation. *Transplantation*. 2012 Feb 27;93(4):342- 7.
15. Grossman M, Raper SE, Kozarsky K, Stein EA, Engelhardt JF, Muller D, Lupien PJ, Wilson JM. Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Nat Genet*. 1994 Apr;6(4):335- 41.
16. Grossman M, Rader DJ, Muller DW, Kolansky DM, Kozarsky K, Clark BJ 3rd, Stein EA, Lupien PJ, Brewer HB Jr, Raper SE. A pilot study of ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolaemia. *Nat Med*. 1995 Nov;1(11):1148- 54.
17. Fisher RA, Strom SC. Human hepatocyte transplantation: worldwide results. *Transplantation* 2006;82:441- 9.
18. de Vries IJ, Lesterhuis WJ, Barentsz JO, Verdijk P, van Krieken JH, Boerman OC, et al. Magnetic resonance tracking of dendritic cells in melanoma patients for monitoring of cellular therapy. *Nat Biotechnol* 2005;23:1407- 13.
19. Suzuki Y, Zhang S, Kundu P, Yeung AC, Robbins RC, Yang PC. In vitro comparison of the biological effects of three transfection methods for magnetically labeling mouse embryonic stem cells with ferumoxides. *Magn Reson Med*. 2007 Jun;57(6):1173- 9.
20. Renshaw PF, Owen CS, Evans AE, Leigh JS Jr. Immunospecific NMR contrast agents. *Magn Reson Imaging*. 1986;4(4):351- 7.
21. Schäfer R, Bantleon R, Kehlbach R, Siegel G, Wiskirchen J, Wolburg H, Kluba T, Eibofner F, Northoff H, Claussen CD, Schlemmer HP. Functional investigations on human mesenchymal stem cells exposed to magnetic fields and labeled with clinically approved iron nanoparticles. *BMC Cell Biol*. 2010 Apr 6;11:22.
22. Weishaupt D., Köchli V.D., Marincek B. *Wie funktioniert das MRI? Eine Einführung in Physik und Funktionsweise der Magnetresonanzbildgebung*. Springer, 3. Auflage 2001
23. 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- 33.

24. Aime S, Barge A, Delli Castelli D, Fedeli F, Mortillaro A, Nielsen FU, Terreno E. Paramagnetic lanthanide(III) complexes as pH- sensitive chemical exchange saturation transfer (CEST) contrast agents for MRI applications. *Magn Reson Med*. 2002 Apr;47(4):639- 48.
25. Bulte JW. *In vivo* MRI cell tracking: clinical studies. *AJR Am J Roentgenol* 2009;193:314- 25.
26. Sharma P, Brown S, Walter G, Santra S, Moudgil B. Nanoparticles for bioimaging. *Adv Colloid Interface Sci* 2006;123- 126:471- 85.
27. Cromer Berman SM, Walczak P, Bulte JW. Tracking stem cells using magnetic nanoparticles. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2011;3:343- 55.
28. Raschzok N, Billecke N, Kammer NN, Morgul MH, Adonopoulou MK, Sauer IM, 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- 6.
29. McAteer MA, Akhtar AM, von Zur Muhlen C, Choudhury RP. An approach to molecular imaging of atherosclerosis, thrombosis, and vascular inflammation using microparticles of iron oxide. *Atherosclerosis*. 2010 Mar;209(1):18- 27
30. Rodriguez O, Fricke S, Chien C, Dettin L, VanMeter J, Shapiro E, Dai HN, Casimiro M, Ileva L, Dagata J, Johnson MD, Lisanti MP, Koretsky A, Albanese C. Contrast- enhanced *in vivo* imaging of breast and prostate cancer cells by MRI. *Cell Cycle*. 2006 Jan;5(1):113- 9. Epub 2006 Jan 4.
31. Raschzok N, Teichgräber U, Billecke N, Zielinski A, Steinz K, Kammer NN, et al. Monitoring of liver cell transplantation in a preclinical swine model using magnetic resonance imaging. *Cell Med* 2010;1:123–135.
32. Hinds KA, Hill JM, Shapiro EM, Laukkanen MO, Silva AC, Combs CA, Varney TR, Balaban RS, Koretsky AP, Dunbar CE. Highly efficient endosomal labeling of progenitor and stem cells with large magnetic particles allows magnetic resonance imaging of single cells. *Blood*. 2003 Aug 1;102(3):867- 72.
33. Dunning MD, Kettunen MI, Ffrench Constant C, Franklin RJ, Brindle KM. Magnetic resonance imaging of functional Schwann cell transplants labelled with magnetic microspheres. *Neuroimage*. 2006 May 15;31(1):172- 80. Epub 2006 Jan 25.

34. Ye Q, Wu YL, Foley LM, Hitchens TK, Eytan DF, Shirwan H, Ho C. Longitudinal tracking of recipient macrophages in a rat chronic cardiac allograft rejection model with noninvasive magnetic resonance imaging using micrometer- sized paramagnetic iron oxide particles. *Circulation*. 2008 Jul 8;118(2):149- 56.
35. Shapiro EM, Medford- Davis LN, Fahmy TM, Dunbar CE, Koretsky AP. Antibody- mediated cell labeling of peripheral T cells with micron- sized iron oxide particles (MPIO) allows single cell detection by MRI. *Contrast Media Mol Imaging*. 2007 May- Jun;2(3):147- 53.
36. Shapiro EM, Skrtic S, Sharer K, Hill JM, Dunbar CE, Koretsky AP. MRI detection of single particles for cellular imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:10901- 6.
37. Nkansah MK, Thakral D, Shapiro EM. Magnetic poly(lactide- co- glycolide) and cellulose particles for MRI- based cell tracking. *Magn Reson Med* 2011;65:1776- 85.
38. Montet- Abou K, Montet X, Weissleder R, Josephson L. Transfection agent induced nanoparticle cell loading. *Mol Imaging* 2005;4:165- 71.
39. Zhang H. Iron oxide nanoparticles- poly- L- lysine complex. *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)* [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2004- 2012
40. Bhorade R, Weissleder R, Nakakoshi T, Moore A, Tung CH. Macrocyclic chelators with paramagnetic cations are internalized into mammalian cells via a HIV- tat derived membrane translocation peptide. *Bioconjug Chem*. 2000 May- Jun;11(3):301- 5.
41. Walczak P, Kedziorek DA, Gilad AA, Lin S, Bulte JW. Instant MR labeling of stem cells using magnetoelectroporation. *Magn Reson Med*. 2005 Oct;54(4):769- 74.
42. Schäfer R, Kehlbach R, Müller M, Bantleon R, Kluba T, Ayturan M, Siegel G, Wolburg H, Northoff H, Dietz K, Claussen CD, Wiskirchen J. Labeling of human mesenchymal stromal cells with superparamagnetic iron oxide leads to a decrease in migration capacity and colony formation ability. *Cytotherapy*. 2009;11(1):68- 78.

43. Schäfer R, Ayturan M, Bantleon R, Kehlbach R, Siegel G, Pintaske J, Conrad S, Wolburg H, Northoff H, Wiskirchen J, Weissert R. 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(8):923- 41.
44. Chen YC, Hsiao JK, Liu HM, Lai IY, Yao M, Hsu SC, Ko BS, Chen YC, Yang CS, Huang DM. The inhibitory effect of superparamagnetic iron oxide nanoparticle (Ferucarbotran) on osteogenic differentiation and its signaling mechanism in human mesenchymal stem cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010 Jun 1;245(2):272- 9.
45. Kostura L, Kraitchman DL, Mackay AM, Pittenger MF, Bulte JW. Feridex labeling of mesenchymal stem cells inhibits chondrogenesis but not adipogenesis or osteogenesis. *NMR Biomed*. 2004 Nov;17(7):513- 7.
46. Bulte JW, Kraitchman DL, Mackay AM, Pittenger MF. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells is inhibited after magnetic labeling with ferumoxides. *Blood*. 2004 Nov 15;104(10):3410- 2.
47. Raschzok N, Muecke DA, Adonopoulou MK, Billecke N, Werner W, Kammer NN, et al. *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.
48. Shapiro EM, Skrtic S, Koretsky AP. Sizing it up: cellular MRI using micron-sized iron oxide particles. *Magn Reson Med*. 2005 Feb;53(2):329- 38.
49. Shapiro EM, Sharer K, Skrtic S, Koretsky AP. In vivo detection of single cells by MRI. *Magn Reson Med*. 2006 Feb;55(2):242- 9.
50. Bumb A, Brechbiel MW, Choyke PL, Fugger L, Eggeman A, Prabhakaran D, et al. Synthesis and characterization of ultra- small superparamagnetic iron oxide nanoparticles thinly coated with silica. *Nanotechnology* 2008;19:335601.
51. Bumb A, Regino CA, Perkins MR, Bernardo M, Ogawa M, Fugger L, et al. Preparation and characterization of a magnetic and optical dual- modality molecular probe. *Nanotechnology* 2010;21:175704.

52. Tanaka K, Narita A, Kitamura N, Uchiyama W, Morita M, Inubushi T, et al. Preparation for highly sensitive MRI contrast agents using core/ shell type nanoparticles consisting of multiple SPIO cores with thin silica coating. *Langmuir* 2010;26:11759- 62.
53. Lee JE, Lee N, Kim H, Kim J, Choi SH, Kim JH, et al. Uniform mesoporous dye- doped silica nanoparticles decorated with multiple magnetite nanocrystals for simultaneous enhanced magnetic resonance imaging, fluorescence imaging, and drug delivery. *J Am Chem Soc* 2010;132:552- 7.
54. Zhang C, Wängler B, Morgenstern B, Zentgraf H, Eisenhut M, Untenecker H, et al. Silica- and alkoxy silane- coated ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles: a promising tool to label cells for magnetic resonance imaging. *Langmuir* 2007;23:1427- 34.
55. Benezra M, Penate- Medina O, Zanzonico PB, Schaer D, Ow H, Burns A, et al. Multimodal silica nanoparticles are effective cancer- targeted probes in a model of human melanoma. *J Clin Invest* 2011;121:2768- 80.
56. Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 1976;13:29- 83.
57. Teradaira R, Kolb- Bachofen V, Schlepper- Schäfer J, Kolb H. Galactose- particle receptor on liver macrophages. Quantitation of particle uptake. *Biochim Biophys Acta* 1983;759:306- 10.
58. van Tiel ST, Wielopolski PA, Houston GC, Krestin GP, Bernsen MR. Variations in labeling protocol influence incorporation, distribution and retention of iron oxide nanoparticles into human umbilical vein endothelial cells. *Contrast Media Mol Imaging*. 2010 Sep- Oct;5(5):247- 57.
59. Chung TH, Wu SH, Yao M, Lu CW, Lin YS, Hung Y, Mou CY, Chen YC, Huang DM. The effect of surface charge on the uptake and biological function of mesoporous silica nanoparticles in 3T3- L1 cells and human mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2007 Jul;28(19):2959- 66.
60. Billotey C, Wilhelm C, Devaud M, Bacri JC, Bittoun J, Gazeau F. Cell internalization of anionic maghemite nanoparticles: quantitative effect on magnetic resonance imaging. *Magn Reson Med*. 2003 Apr;49(4):646- 54.

61. Baeten K, Adriaensens P, Hendriks J, Theunissen E, Gelan J, Hellings N, Stinissen P. Tracking of myelin- reactive T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) animals using small particles of iron oxide and MRI. *NMR Biomed.* 2010 Jul;23(6):601- 9.
62. Kunzmann A, Andersson B, Thurnherr T, Krug H, Scheynius A, Fadeel B. Toxicology of engineered nanomaterials: focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. *Biochim Biophys Acta* 2011;1810:361- 73.
63. Lauzon ML, Mahallati H, Frayne R. Time- efficient breath- hold abdominal MRI at 3.0 T. *AJR Am J Roentgenol* 2006;187:649- 57.
64. Ramalho M, Herédia V, Tsurusaki M, Altun E, Semelka RC. Quantitative and qualitative comparison of 1.5 and 3.0 Tesla MRI in patients with chronic liver diseases. *J Magn Reson Imaging* 2009;29:869- 79.
65. Bae JE, Huh MI, Ryu BK, Do JY, Jin SU, Moon MJ, Jung JC, Chang Y, Kim E, Chi SG, Lee GH, Chae KS. The effect of static magnetic fields on the aggregation and cytotoxicity of magnetic nanoparticles. *Biomaterials.* 2011 Dec;32(35):9401- 14.
66. Winter EM, Hogers B, van der Graaf LM, Gittenberger- de Groot AC, Poelmann RE, van der Weerd L. Cell tracking using iron oxide fails to distinguish dead from living transplanted cells in the infarcted heart. *Magn Reson Med.* 2010 Mar;63(3):817- 21.
67. Srinivas M, Morel PA, Ernst LA, Laidlaw DH, Ahrens ET. Fluorine- 19 MRI for visualization and quantification of cell migration in a diabetes model. *Magn Reson Med.* 2007 Oct;58(4):725- 34.
68. Gilad AA, Ziv K, McMahon MT, van Zijl PC, Neeman M, Bulte JW. MRI reporter genes. *J Nucl Med.* 2008 Dec;49(12):1905- 8.
69. Weissman TA, Sanes JR, Lichtman JW, Livet J. Generating and imaging multicolor Brainbow mice. *Cold Spring Harb Protoc.* 2011 Jul 1;2011(7):763- 9.
70. Cohen B, Ziv K, Plaks V, Israely T, Kalchenko V, Harmelin A, Benjamin LE, Neeman M. MRI detection of transcriptional regulation of gene expression in transgenic mice. *Nat Med.* 2007 Apr;13(4):498- 503.

71. Dagher I, Nguyen TH, Groyer- Picard MT, Lainas P, Mainot S, Guettier C, Pariente D, Franco D, Weber A. Efficient hepatocyte engraftment and long-term transgene expression after reversible portal embolization in nonhuman primates. *Hepatology*. 2009 Mar;49(3):950- 9.
72. Van der Watt JJ. The acute toxicity of retrorsine, aflatoxin and sterigmatocystin in vervet monkeys. *Br J Exp Pathol*. 1970 Apr;51(2):183- 90.
73. Xie J, Chen K, Huang J, Lee S, Wang J, Gao J, et al. PET/ NIRF/ MRI triple functional iron oxide nanoparticles. *Biomaterials* 2010;31:3016- 22.
74. Liong M, Lu J, Kovichich M, Xia T, Ruehm SG, Nel AE, et al. Multifunctional inorganic nanoparticles for imaging, targeting, and drug delivery. *ACS Nano* 2008;2:889- 96.
75. Sarah Angelos, Monty Liong, Eunshil Choi, Jeffrey I. Zink. Mesoporous silicate materials as substrates for molecular machines and drug delivery. *Chemical Engineering Journal* 2008;137:4–13
76. Wang P, Yigit MV, Ran C, Ross A, Wei L, Dai G, Medarova Z, Moore A. A theranostic small interfering RNA nanoprobe protects pancreatic islet grafts from adoptively transferred immune rejection. *Diabetes*. 2012 Dec;61(12):3247- 54.

8. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Carolin Marie Langer, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Evaluierung eines Siliziumbasierten Eisenoxidpartikels als intrazelluläres Magnetresonanzkontrastmittel für die Leberzelltransplantation“ 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. Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Carolin Marie Langer hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Raschzok N, Langer CM, Schmidt C, Lerche KH, Billecke N, Nehls K, Schlüter NB, Leder A, Rohn S, Mogl MT, Lüdemann L, Stelter L, Teichgräber UK, Neuhaus P, Sauer IM. Functionalizable silica-based micron-sized iron oxide particles for cellular magnetic resonance imaging. Cell Transplant. 2013

Beitrag: Experimentelle Arbeit und Datenauswertung

Publikation 2: Rago G, Langer CM, Brackman C, Day JP, Domke KF, Raschzok N, Schmidt C, Sauer IM, Enejder A, Mogl MT, Bonn M. CARS microscopy for the visualization of micrometersized iron oxide MRI contrast agents in living cells. Biomed Opt Express

Beitrag: Experimentelle Arbeit und Datenauswertung

Beitrag: Experimentelle Arbeit und Datenauswertung

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

9. Lebenslauf

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