

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

DISSERTATION

*„Markierung primärer humaner Hepatozyten mit Eisenoxidpartikel zum
Nachweis mittels Magnetresonanztomographie“*

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Mehmet Haluk Morgül

aus Ankara, Türkei

Gutachter : 1. Priv.-Doz. Dr. med. I. M. Sauer
 2. Prof. Dr. med. S. Jonas
 3. Priv.-Doz. Dr. med. U. Teichgräber

Datum der Promotion: 19.03.2010

*Mit herzlichem Dank an
Handan, Zekiye
und Ergün Morgül*

Inhaltsverzeichnis

| | Seite |
|--|-------|
| 1. Einleitung | 6 |
| 1.1. Akutes und Chronisches Leberversagen | 6 |
| 1.2. Hereditäre Lebererkrankungen | 7 |
| 1.3. Lebertransplantation und Alternativmethoden | 7 |
| 1.4. Leberzelltransplantation | 9 |
| 1.5. Lokalisierung der transplantierten Zellen und Therapieüberwachung | 10 |
| 1.6. Intrazelluläre Kontrastmittel für MRT | 12 |
| 1.7. Inkorporationsverfahren | 13 |
| 1.7.1. Endozytose | 13 |
| 1.7.2. Rezeptor-, Antikörper- oder kombiniert vermittelte Aufnahme | 13 |
| 1.7.3. Transfektionsmedien | 13 |
| 1.7.4. Zelluläre Membran-Translokations-Signal-Peptide | 14 |
| 1.7.5. Mikrometerskalige Eisenoxidpartikel (MPIO) | 15 |
| 1.8. Fragestellung | 15 |
| 2. Material und Methoden | 17 |
| 2.1. Liste der Materialien | 17 |
| 2.1.1. Zellisolierung | 17 |
| 2.1.2. Zellkultur | 17 |
| 2.1.3. Sterilausrüstung für die Zellkultur | 17 |
| 2.1.4. Superparamagnetische Eisenoxidpartikel | 18 |
| 2.1.5. Fluoreszenzfärbung | 18 |
| 2.1.6. Analytik | 18 |
| 2.2. Isolierung primärer humaner Hepatozyten | 19 |
| 2.3. Superparamagnetische Eisenoxidpartikel | 21 |
| 2.3.1. <i>MagForce</i> [®] Partikel | 21 |
| 2.3.2. Mikrometerskalige Eisenoxidpartikel (MPIO) | 22 |
| 2.4. Markierung der Hepatozyten | 23 |
| 2.4.1. Inkubation mit Tat Peptid-modifizierten <i>MagForce</i> [®] Partikel | 23 |
| 2.4.2. Inkubation mit MPIO | 23 |
| 2.5. Resuspendierung der primären humanen Hepatozyten | 25 |
| 2.6. Nachweis der Partikelinkorporation | 25 |
| 2.6.1. Lichtmikroskopie | 25 |

| | | |
|--------|---|----|
| 2.6.2. | Fluoreszenzmikroskopie | 25 |
| 2.6.3. | Elektronenmikroskopie | 26 |
| 2.7. | Phantommodelle und <i>in vitro</i> MRT | 26 |
| 2.8. | Charakterisierung der Zellen | 27 |
| 2.9. | Statistische Auswertung | 28 |
| 3. | Ergebnisse | 29 |
| 3.1. | Isolierung | 29 |
| 3.2. | Markierung mit nanometerskaligen Partikel | 29 |
| 3.2.1. | Mikroskopie | 29 |
| 3.2.2. | MRT-Untersuchung | 31 |
| 3.3. | Markierung mit MPIO | 31 |
| 3.3.1. | Mikroskopie | 33 |
| 3.3.2. | MRT-Untersuchung | 33 |
| 3.3.3. | Stabilität der Zellmarkierung und Morphologie der markierten Zellen | 36 |
| 3.3.4. | Zellschädigung und Zellmetabolismus | 36 |
| 4. | Diskussion | 41 |
| 5. | Zusammenfassung | 53 |
| 6. | Abkürzungsverzeichnis | 54 |
| 7. | Literaturverzeichnis | 55 |
| 8. | Lebenslauf | 63 |
| 9. | Publikationsliste | 65 |
| 10. | Danksagung | 67 |
| 11. | Selbständigkeitserklärung | 68 |

1. Einleitung

Die Leber hat mit ihrem komplexen anatomischen und histologischen Aufbau eine besondere Bedeutung für den Organismus. Die Aufgaben dieses zentralen Organs kann man in drei Hauptgruppen zusammenfassen: Synthese von Aminosäuren, Vitaminen, Glukose, Lipiden, Koagulationsfaktoren, Galle und Albumin; Regulation des Säure-Base-, des Elektrolyt- und des Aminosäurehaushaltes, die Energieversorgung des Zentralnervensystems, sowie Entgiftung des Blutes von Ammoniak, Bilirubin, Toxinen und aromatischen Aminosäuren. Die Interaktion der Leber mit dem Blut- und Verdauungssystem wird durch ein hohes Herzzeitvolumen über die Arteria hepatica (20 %) und die Vena portae (80 %) sowie über das Gallengangsystem gewährleistet. Eine Funktionsstörung der Leber hat daher erhebliche Folgen für den menschlichen Organismus.

1.1. Akutes und Chronisches Leberversagen

In der Bundesrepublik Deutschland sterben jährlich circa 20.000 Menschen an einem akuten Leberversagen oder an der akuten Exazerbation eines chronischen Leberversagens („*acute on chronic liver failure*“). Das chronische Leberversagen führt weltweit bei mehr als 785.200 Patienten pro Jahr zum Tode [1]. Somit stellen sowohl das akute als auch das chronische Leberversagen eine der häufigsten Todesursachen und ein großes gesundheitsökonomisches Problem dar.

Die Hauptursachen des akuten Leberversagens in der westlichen Welt sind virale Hepatitis (65%), Hepatotoxine (30%) und andere Ursachen (5%) wie Schock oder das HELLP-Syndrom (*Haemolysis, Elevated Liver enzymes and Low Plateled count*). Das Krankheitsbild des Leberversagens kann weiterhin die Symptome eines gestörten Säure-Basen-Gleichgewichts, kardiovaskuläre Störungen mit pulmonaler Beteiligung, Nierenversagen, Koagulationsstörung und disseminierte intravasale Koagulopathie beinhalten. Das akute Leberversagen erfordert eine rasche Behandlung der Komplikationen und wenn möglich eine Lebertransplantation als kausale Therapie.

Das durch eine Zirrhose verursachte chronische Leberversagen ist ein progredient verlaufendes Krankheitsbild. Die Lebensqualität des Patienten ist stark eingeschränkt, der Patient ist durch erhebliche Komplikationen wie gastrointestinale Blutungen, Infektionen, hepatozelluläres Karzinom, und hepatische Enzephalopathie bedroht. Die Lebenserwartung von Patienten mit einem chronischen Leberversagen ist deutlich gemindert, und die Inzidenz des Neuauftretens eines hepatozellulären Karzinoms ist bei

diesen Patienten jährlich um 5 bis 6 % erhöht [2, 3]. Dabei stellt die Versorgung dieser Patienten eine enorme Belastung für deren Angehörige und auch für die Gesundheitsökonomie dar. Der häufigste Auslöser der Leberzirrhose ist in der westlichen Welt der Alkoholmissbrauch, in den Entwicklungsländern steht die virale Hepatitis als Ursache an der ersten Stelle.

1.2. Hereditäre Lebererkrankungen

Angeborene Erkrankungen der Leber mit metabolischen Konsequenzen basieren auf dem Fehlen eines Enzyms oder Rezeptors auf Grund eines defekten oder fehlenden Gens. Krankheitsbilder wie Familiäre Hypercholesterinämie, Crigler-Najjar Syndrom Typ I, Harnstoffzyklusstörung, Glykogenspeicherungserkrankung oder hereditärer Faktor VII-Mangel verschlechtern die Lebensqualität der Patienten von Geburt an und erfordern eine lebenslange, komplizierte und teure Therapie, bis eine kausale Heilung in Form einer Lebertransplantation möglich ist [4]. Weitere familiär vererbte Lebererkrankungen wie Hämochromatose, Wilson-Erkrankung oder Alfa1-Antitrypsin-Mangel erfordern eine intensive Versorgung der Patienten und führen im Verlauf zu einem Leberversagen. Obwohl metabolische Erkrankungen der Leber seltener vorkommen als das akute oder chronische Leberversagen, spielen sie aufgrund der enormen Behandlungskosten und dem jungen Alter der Patienten eine große Rolle im Gesundheitssystem.

1.3. Lebertransplantation und Alternativmethoden

Die erste erfolgreiche Lebertransplantation wurde im Jahre 1967 von Dr. Thomas Stazl am *Health Sciences Center der University of Colorado* durchgeführt, bis Ende der siebziger Jahre wurde dieses Therapieverfahren experimentell weiterentwickelt. Nach Optimierung der Immunsuppressionsregime wurde die Lebertransplantation zu einem erfolgreichen und etablierten Verfahren der modernen Medizin. So stieg die Überlebensrate des akuten Leberversagens von 6-25 % seit Etablierung der Lebertransplantation auf über 67 % [5]. Auf Grund optimierter Verfahren in der prä- und postoperativen Versorgung, der Evaluierung der Patienten durch moderne Diagnostik sowie optimierter Operationstechniken konnte das Indikationsspektrum für eine Lebertransplantation weit ausgedehnt werden. Dieses beinhaltet heute die Primäre und Sekundäre Biliäre Zirrhose, Sklerosierende Cholangitis, Biliäre Atresie, Hepatitis B, Hepatitis C, Autoimmune Hepatitis, Kryptogene Zirrhose, alkoholische Zirrhose,

Hämochromatose, Wilson Erkrankung, Alfa1-Antitrypsin Mangel, Glykogenspeicherungserkrankung, Crigler Najjar Syndrom Typ I, primäre Hypercholesterinämie, Harnstoffzyklusdefekt und das Hepatozelluläre Karzinom [6]. Während europaweit im Jahre 1991 insgesamt nur 715 Transplantationen registriert wurden, konnten 2007 in Europa 1.625 orthotope Lebertransplantationen und 101 Transplantationen von Lebendspendern durchgeführt werden [7].

Derzeit stellt die Lebertransplantation den Goldstandard in der Therapie der irreversiblen Lebererkrankungen dar. Bedauerlicherweise deckt aber die Anzahl der für eine Transplantation zur Verfügung stehenden Spenderorgane bei Weitem nicht den Bedarf. Ein zusätzliches Problem sind die enormen Kosten dieses Verfahren. Die reinen Interventionskosten, die Kosten für Diagnostik, Behandlung, Rehabilitation und Medikation in der Zeit vor und nach der Operation im Krankenhaus betragen pro Patient circa 85.514 bis 181.598 \$ [8]. Insbesondere die lebenslange Immunsuppression nach Organtransplantation ist kostenintensiv und birgt das Risiko infektiologischer und onkologischer Folgeerkrankungen mit erheblichen Behandlungskosten.

Als alternative Therapieverfahren zur Organtransplantation, welches die Funktion der Leber bis zu einer Transplantation oder im Idealfall zur *Restitutio at integrum* überbrücken kann, werden zahlreiche Methoden präklinisch und klinisch evaluiert. Eine relativ einfache Methode stellen die so genannten artifiziellen Unterstützungssysteme dar, welche die Toxine, die während des Lebensversagens im menschlichen Körper akkumulieren, aus dem Blut des Patienten entfernen. Albuminbasierte Dialyseverfahren wie „*Single Pass Albumin Dialysis (SPAD)*“, „*Molecular Adsorbents Recirculation System*“ (MARS®, Gambro GmbH, D) und „*Fractionated Plasma Separation and Adsorption System*“ (Prometheus®, Fresenius Medical Care, Bad Homburg, D), sind die am besten untersuchten Verfahren. In klinischen Studien wurde gezeigt, dass mittels dieser Detoxifikationsverfahren die Serumspiegel der im Leberversagen akkumulierenden Toxine wie Bilirubin, Fettsäuren und Ammoniak reduziert werden können [9]. Die ebenfalls lebensnotwendige Synthesefunktion der Leber kann mit einem reinen Entgiftungssystem jedoch nicht ersetzt werden.

Eine komplexere Variante der extrakorporalen Leberunterstützungssysteme stellen bioartifizielle, also zellbasierte Systeme dar. Hierzu zählen *HepatAssist*® (Arbios Systems, Inc. Pasadena, Kalifornien, USA), *VitaGen ELAD*® (Vital Therapies, Inc., San Diego, Kalifornien, USA), *AMC-BAL* (Academish Medical Centrum, Amsterdam, NL)

und *MELS CellModule* (Charité, Universitätsmedizin Berlin, D). Diese Systeme beinhalten einen Bioreaktor, welcher entweder mit immortalisierten humanen, primären porcinen oder mit primären humanen Leberzellen gefüllt ist. Das Patientenplasma wird entweder durch Kapillarmembranen oder direkt mit den Zellen in diesen Bioreaktoren in Verbindung gebracht. Somit erzielt man die globale Unterstützung der Leber in allen Funktionen und dabei auch für alle Indikationen der Lebererkrankungen. Allerdings keine der oben genannten Methoden konnte in einer prospektiven randomisierten multizentralen klinischen Studie eine signifikante Verbesserung in der Patientenüberlebensrate zeigen [10]. Eine Vergleichbarkeit dieser Verfahren mit der Lebertransplantation wurde aufgrund der geringen klinischen Effekte bis jetzt nicht untersucht.

1.4. Leberzelltransplantation

Die Transplantation von Leberzellen im Fall eines Leberversagens oder bei einer hereditären Lebererkrankung wird seit zwei Jahrzehnten als alternatives Therapieverfahren für die Lebertransplantation diskutiert [11, 12]. Das Prinzip dieses Verfahrens beruht auf der Isolierung von Leberzellen aus Leberteileresektaten (autologe Zellen) sowie aus abgelehnten Spenderorganen (allogene Zellen) [13]. Die aufgearbeiteten Leberzellen werden dem Patienten über einen Katheter in die Leber oder die Milz infundiert. Dort reorganisieren sich die Hepatozyten und unterstützen im Idealfall die Funktion der Leber. Im Vergleich zu einer orthotopen Lebertransplantation hat die Transplantation von Leberzellen zahlreiche Vorteile: Spenderorgane, welche für eine Transplantation aufgrund von Steatose, Trauma oder einer Kombination von unterschiedlichen Faktoren wie Alter, leichter Steatose oder Fibrose nicht geeignet sind, können als Zellquelle für eine Zelltransplantation verwendet werden [14]. Eine weitere Zellquelle stellen die Lebern von so genannten „*non-heart-beating donors*“ dar [15]. Darüberhinaus ermöglicht die Kryokonservierung eine langzeitige Lagerung von Leberzellen für die Zelltransplantation: Die eingefrorenen Zellen können bei Bedarf wieder aufgetaut und für eine Transplantation bereitgestellt werden. Dies ist bei Transplantationen einer vollständigen Leber bisher nicht möglich [16]. Die Zelltransplantation ist im Vergleich zur Organtransplantation zudem weniger invasiv und kann somit auch bei alten, komorbiden Patienten mit Kontraindikationen für eine Organtransplantation durchgeführt werden [17].

Zur Therapie hereditärer Lebererkrankungen eröffnet die Leberzelltransplantation eine weitere Dimension: die Genmanipulation und Transplantation autologer Zellen. Dafür muss bei den Patienten eine Leberteilektomie durchgeführt werden. Die Genmanipulation erfolgt durch *in vitro* Transfektion der isolierten Zellen mittels Vektoren (z.B. Viren), dadurch können die fehlenden Proteine nach der Transplantation der Zellen exprimiert werden [18]. Bei der Transplantation von autologen Zellen kann auf eine Immunsuppression verzichtet werden [17].

Weltweit wurden bisher insgesamt 85 Patienten, davon 39 Kinder und 46 Erwachsene, mit Zelltransplantation behandelt [19 – 24]. Aufgrund der positiven Ergebnisse zahlreicher kleiner Studien wurde Ende 2007 eine Phase II/III Multicenter-Studie zur Leberzelltransplantation im Akuten Leberversagen gestartet (*Safety and Efficiency of Liver Cell Application [SELICA I, Cytonet GmbH, Weinheim, D]*). Eine weitere Multicenter-Studie untersucht die Auswirkungen einer Zelltransplantation bei hereditären Lebererkrankungen im Kindesalter (*SELICA II, Cytonet GmbH*).

1.5. Lokalisierung der transplantierten Zellen und Therapieüberwachung

Bei der Transplantation von Zellen gestalten sich die Lokalisierung und Verfolgung der transplantierten Zellen im Empfänger sehr schwierig. Die einzelnen Schritte der Zelltransplantation, wie die Applikation der Zellen über den Katheter, die Adhärenz der Zellen an der Gefäßwand, das Eindringen in das Gewebe (*homing*), die Intergration ins Zielgewebe (*engraftment*) und deren Verbleib über längere Zeit ist mittels nicht-invasiver Verfahren nicht kontrollierbar. Darüber hinaus können seltene, unter Umständen aber klinisch erhebliche Komplikationen der Zelltransplantation, beispielsweise Thrombosierung von Blutgefäßen in anderen Organen, nicht zeitnah diagnostiziert und behandelt werden. Um die biologischen und physikalischen Prinzipien der Zelltransplantation zu verstehen und eine Qualitätskontrolle im Rahmen der klinisch-therapeutischen Anwendung zu ermöglichen, müssten die Zellen während und nach der Applikation im Empfänger detektiert werden können.

Die Standardmethode zur Detektion der Zellen bei den bislang klinisch durchgeführten Leberzelltransplantationen beruht auf stochastische Probenahmen mittels Biopsie. So können die Zellen nach der Transplantation in den Zielorganen histologisch und mittels molekularbiologischer Verfahren nachgewiesen werden [22]. Die Untersuchung von Gewebeproben stellt derzeit die selektivste und sensitivste Methode zum Nachweis der transplantierten Zellen dar. Allerdings kann diese Methode keine Aussage über die

Verteilung der Zellen im gesamten Organ sowie im Organismus liefern. Des Weiteren ermöglicht diese Methode weder eine Echtzeitdetektion der Zellen während der Transplantation im Sinne einer Qualitätssicherung noch eine zeitnahe Analyse zur Therapie möglicher Komplikationen während und nach Applikation. Darüber hinaus birgt die Probennahme mittels Biopsie eigene Komplikationen wie Infektionen oder Blutungen, welche aufgrund der Grunderkrankung sowie der den Körper zusätzlich schwächenden Immunsuppression dringend vermieden werden sollten.

Eine nicht-invasive Methode zur Detektion von Zellen in der Klinik stellt die Szintigraphie dar. *Mito et al.* konnten autologe Leberzellen sechs Monate lang nach der Transplantation in der Milz mittels Szintigrafie nachweisen [25]. Bei 10 Patienten mit chronischem Leberversagen wurden nach Leberteileresektion autologe Leberzellen isoliert. Nach deren Transplantation wurde den Patienten ^{99m}Tc injiziert, welches in der Milz nur von den Hepatozyten aufgenommen werden kann. So konnten die in die Milz integrierten Leberzellen durch die selektive Technetium-Aufnahme gezeigt werden. Diese Methode ist nur für ektople Applikation von Leberzellen anwendbar, da man mittels Szintigraphie das Signal der applizierten Zellen von dem Signal der eigenen Zellen der Patienten in der Leber nicht unterscheiden kann.

Bohnen et al. markierten allogene Leberzellen vor portaler Applikation bei einem fünfjährigen Patienten mit Indium-111 [26]. So konnten die transplantierten Zellen in der Leber des Kindes mittels Szintigraphie nachgewiesen werden. Die Aufnahmen nach zwei Stunden zeigten ein erhöhtes Signal im Bereich der Leber, welches nach 24 Stunden an Intensität verlor. In der Lunge, oder in den anderen Organen konnte kein Signal detektiert werden.

Die Anwendung der Szintigraphie als Methode zur Zelldetektion im Sinne eines so genannten „*celltracking*“ ist nicht geeignet, da die niedrige Auflösung der Szintigraphie sowie die zwei-dimensionale Darstellung dieses Bildgebungsverfahrens keine genaueren Angaben über die Verteilung und Dynamik der Zellen ermöglichen. Die kurze Halbwertszeit der Radioisotope (^{99m}Tc : 2,8 Tage, ^{111}In : 6 Stunden) und die Belastung der Patienten durch die Strahlenexposition begrenzen repetitive Untersuchungen [27].

Die Magnetresonanztomographie stellt derzeit eine der sichersten hochauflösenden bildgebenden Untersuchungsmethoden dar. Da hierzu keine radioaktive Strahlung benötigt wird, kann diese Untersuchung bei jedem Patient über einen längeren Zeitraum und mehrmals durchgeführt werden. Mit der hohen Auflösung der MRT lassen

sich kleinste Strukturen des Körpers detektieren. Die dreidimensionale Bildgebung ermöglicht eine hohe räumliche Darstellung und der hohe Weichgewebekontrast erlaubt die Differenzierung unterschiedlicher Strukturen auf zellulärer Ebene [28]. Eine MRT-Untersuchung könnte daher genaue und zeitnahe Informationen über die Verteilung der applizierten Zellen im Körper und auch innerhalb der Organe geben.

1.6. Intrazelluläre Kontrastmittel für MRT

Die Detektion von Zellen mittels MRT erfordert ihre Markierung mit intrazellulären Kontrastmitteln. Dabei wird das Kontrastmittel von den Zellen aufgenommen und verbleibt im Zytoplasma. Konventionelle, Gadolinium-basierte MRT-Kontrastmittel verkürzen die T1-Relaxivität im Magnetfeld und induzieren eine Hyperintensität (positive Kontrastmittel). Im Gegensatz dazu zeigen superparamagnetische Eisenoxidpartikel eine Hypointensität und damit ein negatives Signal bei T2-gewichteten Untersuchungen. Obwohl die Hyperintensität in einer *in vivo* MRT-Untersuchung spezifischere Informationen geben kann als die Hypointensität [29], werden superparamagnetische Partikel für die Zelldetektion bevorzugt. Paramagnetische Kontrastmittel wie zum Beispiel Gadolinium besitzen je Molekül nur ein Metallatom, so dass die für den Nachweis einzelner Zellen notwendigen Kontrastmittelkonzentrationen sehr hoch sein müssen. SPIO enthalten dagegen mehrere tausend Eisenatome pro Partikel und bewirken dadurch eine größere Signalstärke im Magnetfeld bei geringerer Anzahl an inkorporierten Partikel [30].

Superparamagnetische Eisenoxidpartikel bestehen aus beschichtetem Magnetit (Fe_3O_4) und besitzen in Abwesenheit eines Magnetfeldes keinen Magnetismus. Diese Eigenschaft ermöglicht, dass diese Teilchen ohne Klumpenbildung in Suspension gehalten werden können. In einem Magnetfeld aber zeigen sie eine starke magnetische Reaktion, so dass sie in der MRT ein starkes Signal auslösen.

Zu diagnostischen Zwecken eingesetzte superparamagnetische Partikel unterscheiden sich in erster Reihe in ihrer Größe: sie reicht vom Nanobereich (\varnothing : 10 nm) bis zum Mikrometerbereich (\varnothing : 4,5 μm). Zur Stabilisierung und Besserung der Biokompatibilität des Eisenoxids werden diese Partikel mit Dextran, Citrat oder Polymeren beschichtet [30]. Die daraus resultierende Varianz an spezifischen Eigenschaften der jeweiligen Partikel in Größe und Oberfläche führt zu unterschiedlichen Inkorporationsmechanismen in die Zellen.

1.7. Inkorporationsverfahren

1.7.1. Endozytose

Partikel ohne spezifische Oberflächencharakteristik können durch Endozytose aufgenommen werden. Ein Beispiel hierfür sind die klinisch zugelassenen, mit Karboxydextran umhüllten nanometerskaligen Partikel (*Resovist®* oder *Feridex®*). *Ittrich et al.* markierten humane mesenchymale Stammzellen mit 5 pg Eisen pro Zelle und konnten 5×10^4 Zellen/ml mittels klinischer MRT über einen Zeitraum von fünf Wochen nachweisen [31]. Hierfür waren jedoch eine hohe Inkubationskonzentration (933 µg Fe/ml) und eine lange Inkubationsdauer (24 Stunden) erforderlich. Auch T-Lymphozyten oder hämatopoetische Vorläuferzellen können bei ausreichend langer Inkubationsdauer (12 bzw. 40 Stunden) Karboxydextran-beschichtete Nanopartikel durch Endozytose aufnehmen [32, 33]. Vorteil der Markierung mittels Endozytose ist die Verwendung kommerziell verfügbarer und zum Teil bereits klinisch zugelassener Eisenoxidpartikel. Eine Modifikation der Kernhülle oder der Einsatz von Transfektionsmedien sind in dem Fall nicht erforderlich. Ein klarer Nachteil ist jedoch die lange Inkubationsdauer und eine mögliche Zytotoxizität bei hoher Eisenkonzentration. Für eine effiziente Markierung können native, Karboxydextran-beschichtete Nanopartikel daher nicht verwendet werden [34].

1.7.2. Rezeptor-, Antikörper- oder kombiniert vermittelte Aufnahme

Durch die Koppelung natürlicher Liganden wie zum Beispiel Transferrin oder die Bindung von monoklonalen Antikörper an quervernetzte eisenhaltige Nanopartikel kann die zur Markierung erforderliche Inkubationszeit stark verkürzt werden [35, 36]. Die Rezeptor- bzw. Antikörper-vermittelte Aufnahme superparamagnetischer Eisenoxidpartikel ermöglicht eine hocheffiziente Markierung der Zielzellen. Die komplexe Synthese zellspezifischer monoklonaler Antikörper und die damit einhergehende geringe Verfügbarkeit speziell aufbereiteter Nanopartikel stehen einer breiten Anwendung jedoch entgegen. Methodisch jedoch können zellbasierte therapeutische und diagnostische Verfahren im Rahmen der *in vivo* Markierung mittels spezifischer Antikörper realisiert werden.

1.7.3. Transfektionsmedien

Transfektionsmedien sind elektrostatisch geladene, kationische Lipid-Verbindungen wie Lipofektin. Sie wurden entwickelt, um DNA-Fragmente in den Zellkern der Zielzellen zu

inkorporieren. Unter geeigneten Bedingungen verbinden sich Transfektionsmedien über elektrostatische Wechselwirkungen mit der Oberfläche von superparamagnetischen Nanopartikel zu einem Komplex. Abhängig von der Stabilität der Verbindung und dem Verhältnis zwischen Transfektionsmedium und Partikel werden diese Komplexe intrazytoplasmatisch in die Endosomen der inkubierten Zellen aufgenommen [34].

Versuche zur Zellmarkierung mit kommerziell erhältlichen Transfektionsreagenzien wie zum Beispiel Lipofectamin, Poly-L-Lysin oder Protaminsulfat wurden bereits mit einer Vielzahl von Zellen durchgeführt [34, 37, 38]. *Himes et al.* konnten embryonale Stammzellen von Mäusen durch vierstündige Inkubation mit Lipofectamin und superparamagnetischem *Feridex*® erfolgreich markieren und bis zu 36 Tage nach Injektion in einem Maus-Modell mit einem 4,7 Tesla Magnetresonanztomographen nachweisen [38].

Die Verwendung von Transfektionsmedien stellt eine universale, nicht-spezifische Methode dar, mit der sowohl adhärente Zellen als auch Zellen in Suspension markiert werden können. Vorteile dieser Methode sind die einfache Handhabung und der Verzicht auf chemische Synthese- und Modifikationsverfahren. Allerdings wurden negative Effekte dieser Methode auf die Zelldifferenzierung beschrieben, welche deren Zulassung in der klinischen Anwendung begrenzen oder sogar verhindern [39].

1.7.4. Zelluläre Membran-Translokations-Signal-Peptide

Ebenso wie durch den Einsatz von Transfektionsmedien soll auch durch die Verwendung zellulärer Translokations-Signal-Peptide die Inkorporation der Eisenpartikel in die Zellen beschleunigt werden. Das aus dem „*Human immunodeficiency Virus*“ (HIV) isolierte Tat-Peptid kann zur Translokation eisenhaltiger Partikel über die Zellmembran durch „absorptive Endozytose“ verwendet werden.

In zahlreichen Studien wurden quervernetzte, Dextran-umhüllte superparamagnetische Eisenoxidpartikel mit kovalent verknüpften Tat-Peptiden verwendet. Es zeigte sich, dass das Verhältnis Tat-Peptid pro Partikel entscheidenden Einfluss auf die Internalisierungsgeschwindigkeit hat. *Josephson et al.* konnten bei einer Inkubationszeit von einer Stunde Karboxydextran-umhüllte Eisenoxidpartikel mit durchschnittlich 6,7 Tat-Peptiden pro Partikel erfolgreich in Maus-Lymphozyten einschleusen [40]. Die Menge der aufgenommenen Eisenpartikel war 100fach höher als bei Inkubation mit Partikel ohne Tat-Peptid. Nach Erhöhung auf 45 Tat-Peptide pro Partikel konnten

Garden et al. die Inkubationszeit bei humanen und murinen T-Zellen auf fünf Minuten reduzieren [41].

1.7.5. Mikrometerskalige Eisenoxidpartikel (MPIO)

In den letzten Jahren wurden „*micron-sized iron oxide particles*“, MPIO (\varnothing : 0,9 μm – 4,5 μm) für die Zellmarkierung gewonnen. Diese MPIO ermöglichen die Detektion der markierten Zellen mittels MRT auf Einzelzellniveau. Die Größe der Signalstärke im Magnetfeld, welche von einem superparamagnetischen Partikel verursacht ist, ist größer als die physikalische Größe des Partikels („*blooming artifact*“) [42]. So nimmt die Signalstärke der Partikel mit zunehmender Größe des Durchmessers des Eisenkerns logarithmisch zu. Mikrometerskalige Partikel zeigen im Vergleich mit nanometerskaligen Partikel stärkere Signalauslöschung bei T2*-gewichteten Untersuchungen bei ähnlichem Eisengehalt. Dieses höhere magnetische Moment ermöglicht in der MRT die Detektion MPIO-markierter Zellen auf Einzelzellniveau [43, 44]. Auch Zellen, welche nur ein einziges mikrometerskaliges Partikel enthalten, können mittels MRT dargestellt werden. Shapiro *et al.* konnten primäre murine Hepatozyten mit 50 pg Eisen pro Zelle markieren und einzelne Hepatozyten nach Transplantation in ein Mausmodell mittels MRT nachweisen [45]. Weitere Studien mit MPIO zeigten die Detektierbarkeit einzelner Zellen *in vitro* und *in vivo* im Kleintiermodell [46, 47].

MPIO sind mit einem bioresistenten Polymer umhüllt, welches den Abbau des Partikels verhindert. Der Mechanismus der Aufnahme der Partikel in die Zellen konnte bis jetzt noch nicht vollständig geklärt werden [48]. Auch der Verbleib dieser Partikel in den Zellen und die Effekte der internalisierten Polymerpartikel auf den Metabolismus der Zellen wurden bis jetzt nicht publiziert.

1.8. Fragestellung

Die Entwicklung zellbasierter Therapiemaßnahmen der Regenerativen Medizin zur Behandlung des Leberversagens erfordert eine weitere Aufklärung der Dynamik dieses Transplantationsprozesses sowie der Interaktion der transplantierten Zellen im Zielorgan. Diese hat eine große Bedeutung für die Optimierung des Verfahrens sowie für die Standardisierung klinischer Applikationen. Eine Methode zur Überwachung der implantierten Zellen, welche sowohl für die Grundlagenforschung als auch für die Qualitätssicherung in bereits durchgeführten klinischen Anwendungen angesetzt werden kann, wurde bis jetzt nicht etabliert. MRT als nicht-invasive klinisch etablierte

Untersuchungsmethode stellt das derzeit am besten evaluierte Verfahren zur *in vivo* Zelldetektion dar.

Das Ziel eines klinischen „*cell tracking*“ ist es, implantierte Zellen *in vivo* bei einer hohen Auflösung mittels klinischer MRT darzustellen. Derzeit ist ein breites Spektrum von Eisenoxid-basierten modifizierten und nicht modifizierten Partikel als Kontrastmittel für die zelluläre Bildgebung mittels MRT verfügbar. Obwohl es mehrere Studien über die Detektion unterschiedlicher Zellen gibt, wurde die Markierung und Detektion primärer humaner Hepatozyten mittels MRT bisher nicht gezeigt.

Im Rahmen dieser DiSSERTATIONSARBEIT soll eine Methode entwickelt und evaluiert werden, welche eine Detektion primärer humaner Hepatozyten mittels klinischer MRT bei 3,0 Tesla ermöglicht. Da bereits mehrere Markierungsprotokolle mit nanoskaligen Eisenoxidpartikel beschrieben wurden, wurden in der vorliegenden Arbeit zur Parameterfindung zunächst modifizierte nanoskalige Eisenoxidpartikel verwendet. Anhand von optimierten Behandlungs- und Nachweismethoden wurden in einer weiteren Versuchsreihe mikrometerskalige Eisenoxidpartikel für die Markierung der Leberzellen untersucht. Darüber hinaus wurde ein Konzept entwickelt, um die Markierung und anschließende Bereitstellung der Hepatozyten für die Transplantation zu ermöglichen. Die Effekte dieses Verfahrens wurden anhand von kultivierten Zellen *in vitro* untersucht.

2. Material und Methoden

2.1. Liste der Materialien

2.1.1. Zellisolierung

| | |
|-------------------------|--|
| Bovines Serum Albumin | <i>SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D</i> |
| EGTA | <i>Fluka Chemie AG, Neu-Ulm, D</i> |
| HEPES | <i>Sigma-Aldrich, Steinheim, D</i> |
| Histoacryl-Gewebekleber | <i>BIBraun, Melsungen, D</i> |
| Kaliumchlorid | <i>Merck KGaA, Darmstadt, D</i> |
| Kalziumchlorid Dihydrat | <i>Merck KGaA, Darmstadt, D</i> |
| Kollagenase P | <i>Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, D</i> |
| Natriumchlorid | <i>Fluka Chemie AG, Neu Ulm, D</i> |
| Percoll-Lösung | <i>Biochrom AG, Berlin, D</i> |
| PBS | <i>PAA, Pasching, D</i> |
| Trypan Blau | <i>Biochrom AG, Berlin, D</i> |
| 20% Humanes Albumin | <i>Baxter GmbH, Unterschleißheim, D</i> |

2.1.2. Zellkultur

| | |
|--------------------------|---------------------------------|
| Dexamethason/Fortecortin | <i>Merck KGaA, Darmstadt, D</i> |
| FCS | <i>Biochrom AG, Berlin, D</i> |
| HEPES | <i>Biochrom AG, Berlin, D</i> |
| Insulin | <i>Biochrom AG, Berlin, D</i> |
| Kollagen A | <i>Biochrom AG, Berlin, D</i> |
| L-Glutamin | <i>Biochrom AG, Berlin, D</i> |
| Natriumpyruvat | <i>Biochrom AG, Berlin, D</i> |
| Penicillin | <i>Biochrom AG, Berlin, D</i> |
| Trypsin/EDTA | <i>Biochrom AG, Berlin, D</i> |
| Williams´ Medium E | <i>Biochrom AG, Berlin, D</i> |

2.1.3. Sterilausrüstung für die Zellkultur

| | |
|-----------------|-------------------------------------|
| 6-Loch-Platten | <i>Sarstedt, Newton, NC, USA</i> |
| 8-Loch-Platten | <i>BD Biocoat, Bedford, MA, USA</i> |
| 15ml-Röhrchen | <i>Sarstedt, Newton, NC, USA</i> |
| 50ml-Röhrchen | <i>Sarstedt, Newton, NC, USA</i> |
| 96-Loch-Platten | <i>Sarstedt, Newton, NC, USA</i> |

| | |
|------------------|----------------------------------|
| Eppendorf-Gefäße | <i>Sartedt</i> , Newton, NC, USA |
| Kryoröhrchen | <i>Sartedt</i> , Newton, NC, USA |
| Pipetten | <i>Sartedt</i> , Newton, NC, USA |

2.1.4. Superparamagnetische Eisenoxidpartikel

| | |
|---|---|
| FITC | <i>Biosynthan Gesellschaft für bioorganische Synthese GmbH</i> , Berlin, DE |
| <i>MagForce</i> [®] - Partikel | <i>MagForce Nanotechnologies GmbH</i> , Berlin, D |
| MPIO | <i>Bangs Laboratories</i> , Fisher, IL, USA |
| N-Hydroxysuccinimid | <i>Sigma-Aldrich</i> , Steinheim, D |
| N,N`-Dicyclohexylcarbodiimid | <i>Sigma-Aldrich</i> , Steinheim, D |
| TRITC-Phalloidin | <i>Sigma-Aldrich</i> , Steinheim, D |

2.1.5. Fluoreszenzfärbung

| | |
|----------------------|---|
| anti CK18 Antikörper | <i>Santa Cruz Biotechnology</i> , Santa Cruz, CA, USA |
| Aqua-Poly/Mount | <i>Polysciences Inc</i> , Warrington, Pennsylvania, USA |
| Cy3 | <i>Jackson Immuno Research</i> , Newmarket, Suffolk, UK |
| DAPI | <i>Sigma-Aldrich</i> , Steinheim, D |
| Fischgelatine | <i>Sigma-Aldrich</i> , Steinheim, D |

2.1.6. Analytik

| | |
|--|----------------------------------|
| Albuwell II | <i>WAK-Chemie</i> , Steinbach, D |
| BCA-Assay Reagenz | <i>Uptima</i> , Montlucon, FR |
| CellTiter 96Aqueous One solution (Cell Proliferation Assay) | <i>Promega</i> , Mannheim, D |
| NobiFlow GOT (IFCC) | <i>HITADO</i> , Möhnese, D |
| NobiFlow LDH-L (IFCC) | <i>HITADO</i> , Möhnese, D |
| NobiFlow Harnstoff-UV | <i>HITADO</i> , Möhnese, D |

2.2. Isolierung primärer humaner Hepatozyten

Primäre humane Hepatozyten wurden aus Präparaten isoliert, welche bei Leberteileresektionen aufgrund primärer oder sekundärer maligner Tumoren sowie benigner Lebererkrankungen gewonnen wurden. Die Nutzung des humanen Gewebes für Forschungszwecke erfolgte mit Genehmigung der Ethikkommission der Charité und nach schriftlicher Einwilligung der Patienten. Proben mit einem Gewicht von 10-30 g mit intaktem Kapselabschnitt wurden aus gesunden, tumorfreien Arealen der Leberteileresektate entnommen. Das Gewebe wurde unter sterilen Bedingungen in Williams' Medium E bei 4 °C in das Zellisolierungslabor der Experimentellen Chirurgie der Charité - Campus Virchow transportiert. Drei homogen über die Resektionsfläche verteilte Gefäße wurden ausgewählt und unter sterilen Bedingungen cannuliert. Die verbleibenden Gefäße sowie Gallengänge wurden mit Histoacryl-Gewebekleber verschlossen.

Die Zellisolierung erfolgte nach einem bereits etablierten 2-Schritt-Perfusionsverfahren. Die Perfusionslösung I (500 ml, pH 7,4) enthielt 0,142 M NaCl, 6,7 mM KCl, 10 mM HEPES, und 2,4 M EGTA. Die Perfusionslösung II (pH 7,6) enthielt 67 mM NaCl, 6,7 mM KCl, 100 mM HEPES, 0,5 % Bovines Serum Albumin, 4,8 mM CaCl₂ 2H₂O und 100 mg Kollagenase P. Das Gewebe wurde zunächst bei 37°C mit Perfusionslösung I für 30 Minuten blutfrei gespült. Anschließend wurde das Gewebe mit 100 ml Perfusionslösung II mit Kollagenase P für 15-20 Minuten bei 37 °C rezirkulierend perfundiert um die Zell-Zell-Kontakte zu lösen. Nach Abschluss der Perfusion wurde das Lebergewebe in einer Stopplösung (Perfusionslösung I ohne EGTA, mit 25 ml 20 % Humanem Albumin, pH 7,4) bei 4 °C manuell mechanisch zerkleinert (Abb. 1).

Die aus der Zellisolierung gewonnene Zellsuspension wurde durch sterile Gaze in 50ml-Röhrchen auf Eis filtriert und bei 50 g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet im Kulturmedium bei 4 °C suspendiert. In einer 100 µl Probe wurden Zellzahl und Vitalität mittels einer Trypan Blau Färbung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Berechnung wurde folgendermaßen durchgeführt:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \text{gezählte Zellen} \times 10^4 \times \text{Volumen der Zellsuspension}$$

$$\text{Vitalität [\%]} = \text{Anzahl vitaler Zellen} \times 100 / \text{Gesamtzellzahl}$$

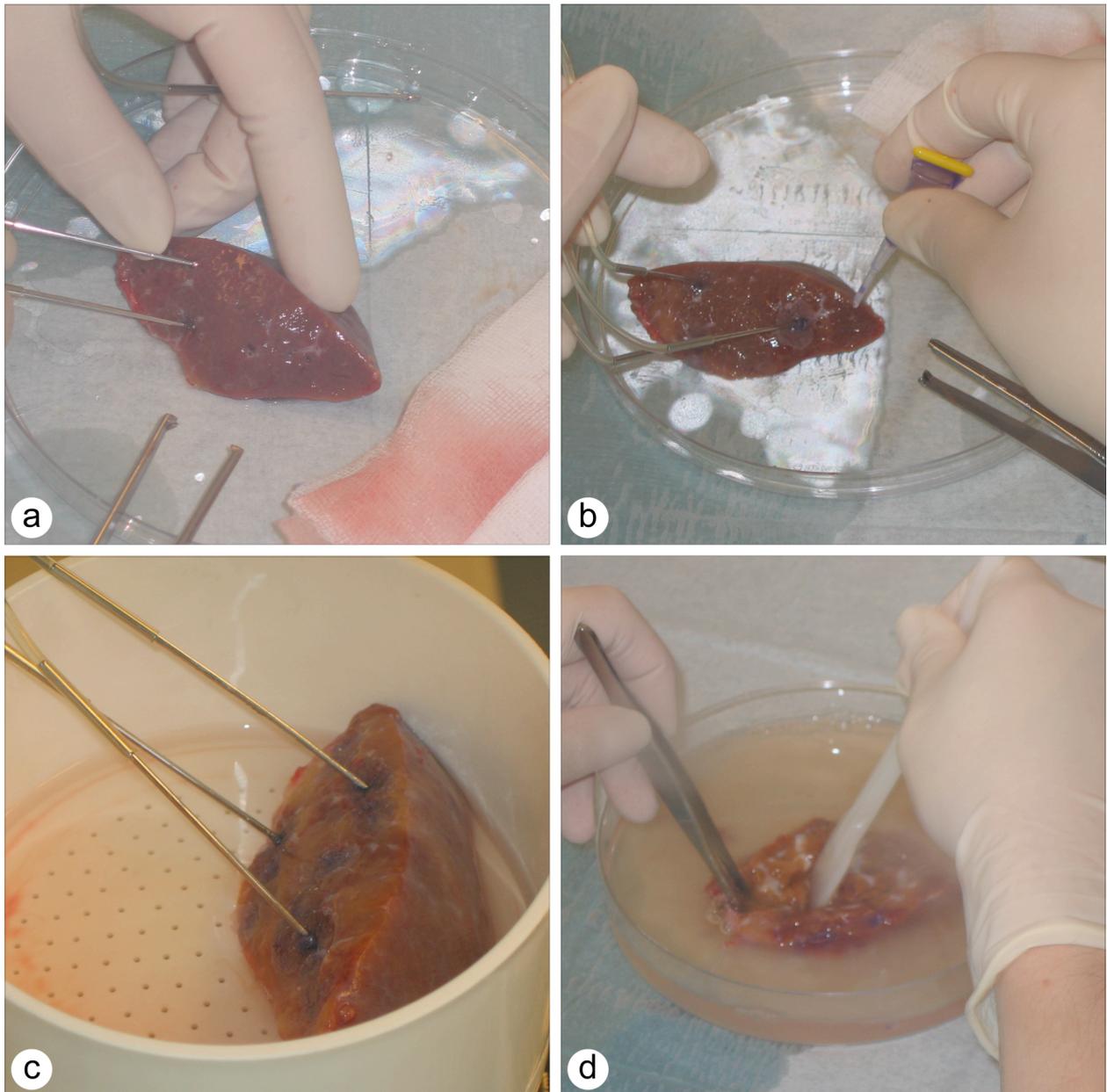


Abb. 1: Isolierung der primären humanen Hepatozyten. Das Gewebestück wurde unter sterilen Bedingungen cannuliert (a) und die Gefäße mit Gewebekleber verschlossen (b). Nach einer 2-Schritt-Perfusion (c) wurde das Stück mechanisch zerkleinert (d).

Um vitale primäre humane Hepatozyten von anderen Zelltypen und von toten Hepatozyten in der Suspension zu trennen, wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Dazu wurde Percoll-Lösung (Dichte: 1,124 g/ml) mit PBS im Verhältnis von 1:4 in einem 50ml-Röhrchen gemischt und mit jeweils 5 ml Zellsuspension sorgfältig überschichtet. Die Zentrifugation erfolgte bei 4 °C und 1474 g für 20 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und die Zellsuspension wurde einmal mit kaltem PBS gewaschen. Zellzahl und Viabilität wurden wiederum mittels Trypan Blau-Färbung

bestimmt und die Überlebensrate nach der Aufreinigung berechnet.

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

Für die Kultivierung primärer humaner Hepatozyten wurde Williams` Medium E mit 1 µM Insulin, 100 U/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin, 1 µM Natriumpyruvat, 15 µM HEPES, 4 µM L-Glutamin 10 % FCS und 1 µM Dexamethason/Fortecortin verwendet. Die Zellsuspension wurde im Medium auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml verdünnt.

Für die Markierungsversuche wurden die Zellen in Kollagen A-beschichteten 6-Loch-Platten, 8-Loch-Platten sowie 96-Loch-Platten ausgesät. Folgende Zellzahlen wurden verwendet:

| | |
|------------------|--|
| 6-Loch-Platten: | 1×10^6 Zellen in 1 ml Zellsuspension/Loch |
| 8-Loch-Platten: | 2×10^5 Zellen in 0,2 ml Zellsuspension/Loch |
| 96-Loch-Platten: | 1×10^5 Zellen in 0,1 ml Zellsuspension/Loch |

Die Zellsuspension wurde in jeder Platte im Verhältnis 1:1 mit Medium verdünnt. Die Zellen wurden im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) über Nacht inkubiert, nach 18-24 Stunden wurde die Konfluenz der Zellen mittels Lichtmikroskopie überprüft.

2.3. Superparamagnetische Eisenoxidpartikel

Für die Inkubationsversuche in Adhäsion wurden zwei unterschiedliche Partikel verwendet:

2.3.1. *MagForce*[®] Partikel

Die Synthese der Tat-Peptid- und Fluorochrom-gekoppelten nanometerskaligen Eisenoxidpartikel wurde im radiochemischen Labor der Klinik für Strahlenheilkunde der Charité durchgeführt.

Polyethylenglykol beschichtete *MagForce*[®] Partikel (0,7 mol/l Eisengehalt; *MagForce* Nanotechnologies GmbH, Berlin, Deutschland), mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 100 nm, wurden mit 50 mg des Transfektionsmittels HIV-1 Tat inkubiert. Um fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zu gewährleisten, waren die Tat-Moleküle zusätzlich mit dem Fluorochrom FITC markiert (Abb. 2). Nach Lösung der Suspension in 200 µl Dimethylsulfoxid wurden 10 mg N-Hydroxysuccinimid in 200 µl

PBS und 80 mg N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid hinzugefügt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Suspension über eine Gel-Chromatographie-Säule (PD-10, Amersham Biosciences AB, Uppsala, S) aufgereinigt. Das Endprodukt von 2,5 ml wies eine Gesamteisenkonzentration von 4 mg/ml auf. Für die weiteren Zellkulturversuche wurde die Partikelsuspension mittels Gammabestrahlung sterilisiert.

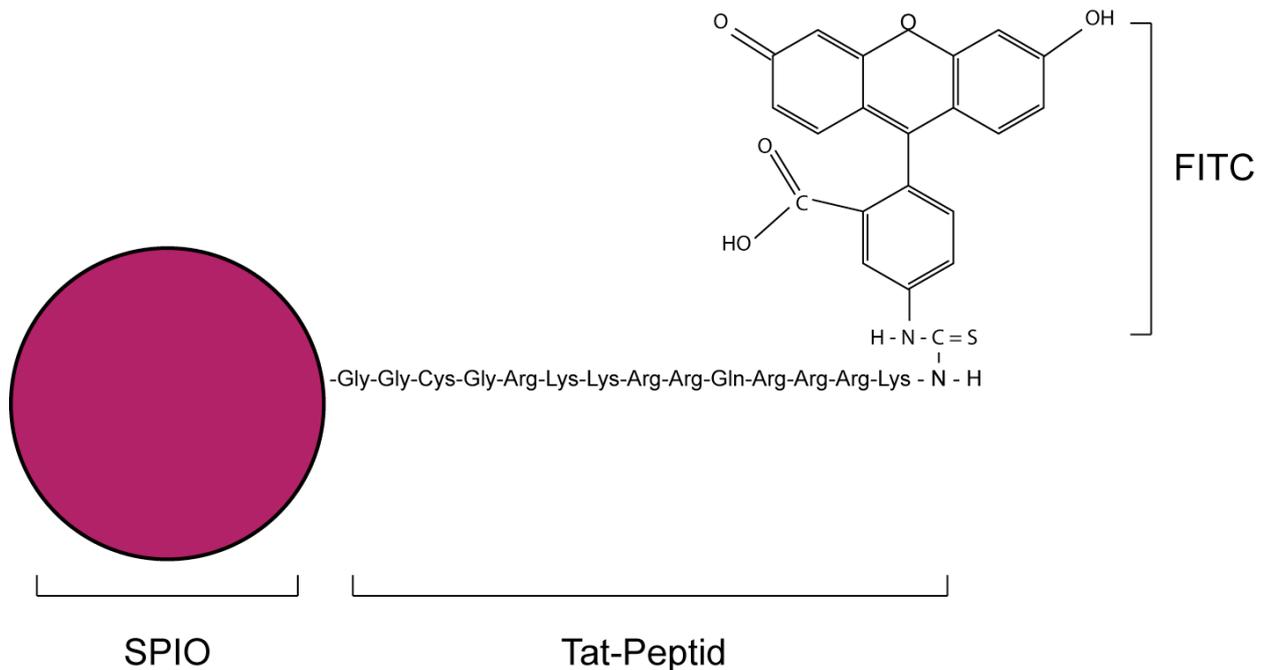


Abb. 2: Die chemische Struktur der Tat-modifizierten *MagForce*® Partikel (mit freundlicher Unterstützung von Dr. Lars Stelter, Klinik für Strahlenheilkunde, Charité, Campus Virchow-Klinikum).

2.3.2. Mikrometerskalige Eisenoxidpartikel (MPIO)

Die mikrometerskaligen Eisenoxidpartikel, *micron-sized superparamagnetic iron oxide particles* (MPIO), haben einen Durchmesser von 1,6 μm und einen Eisengehalt von circa. 42,5 % (*Bangs Laboratories*, Fisher, IL, USA). Der Eisenkern (ca. 1,1 pg Fe) ist in ein Polymer aus Divinylbenzenen enkapsuliert. Zusätzlich sind die Partikel mit dem Fluorochrom, *Dragon-Green* markiert (Abb. 3).

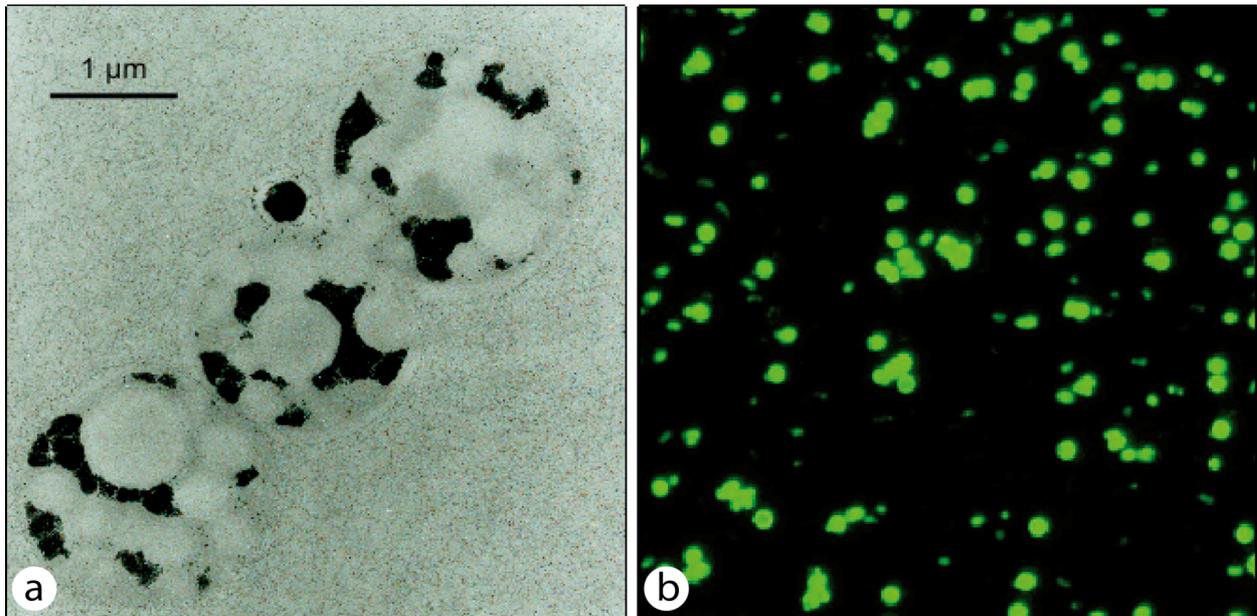


Abb. 3: Elektron- (a) und Fluoreszenzmikroskopische (b) Aufnahmen von MPIO. Die Partikel haben einen durchschnittlichen Durchmesser von 1,6 µm und enthalten grünes Fluorochrom, *DragonGreen*.

2.4. Markierung der Hepatozyten

2.4.1. Inkubation mit Tat Peptid-modifizierten *MagForce*® Partikel

Für die Inkubationsversuche mit SPIO wurden Zellen von 6 Spendern verwendet. Nach einer Adhäsionsphase von 24 Stunden wurde der Überstand über den Zellen in den 6-Loch-Platten abgesaugt und mit frischem Inkubationsmedium mit einer Eisenkonzentration von 100 µg Fe/ml/10⁶ Zellen ersetzt. Nach einer einstündigen Inkubation im Brutschrank wurde das Inkubationsmedium abgesaugt und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen sowie für die mikroskopische Untersuchungen mit 2 ml frischem Medium versehen. Die Zellen der Kontrollgruppe erhielten 24 Stunden nach Isolierung frisches Medium. Eine Stunde nach dem Mediumwechsel wurden diese Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit 2 ml frischem Medium versehen.

Die Inkorporation der *MagForce*®-Partikel wurde mittels Fluoreszenzfärbung untersucht (s. 2.6.2) und von den markierten Hepatozyten sowie von den Kontrollgruppen wurden Phantomproben für MRT-Untersuchung vorbereitet (s. 2.7).

2.4.2. Inkubation mit MPIO

Für die Inkubationsversuche mit MPIO wurden Zellen von 13 Spendern verwendet. Nach einer Adhäsionsphase wurde der Überstand über den Zellen abgesaugt, mit 1 ml

MPIO-Inkubationslösung ersetzt und mit Medium auf 2 ml aufgefüllt. Für die Optimierung der Inkubationsbedingungen wurden eine Reihe von Versuchen mit unterschiedlichen Partikelkonzentrationen und unterschiedlichen Inkubationszeiten durchgeführt. Als Basis für diese Versuche dienten die Zellmarkierungsprotokolle von *Shapiro et al.* [43].

Die Stammlösung der MPIO-Suspension hatte eine Konzentration von 3×10^9 Partikel/ml. In den Vorversuchen wurden Zellen von drei unterschiedlichen Spendern nach einer Adhäsionsphase von 24 Stunden in 6-Loch-Platten für 18 Stunden mit folgenden Partikelkonzentrationen inkubiert:

- Gruppe 1: 10 Partikel/Zelle
- Gruppe 2: 20 Partikel/Zelle
- Gruppe 3: 30 Partikel/Zelle
- Gruppe 4: 40 Partikel/Zelle

Nach der Inkubation wurden die Zellen drei Mal mit PBS (37 °C) gewaschen und mit frischem Medium überschichtet. Die Partikelaufnahme wurde mikroskopisch untersucht (s. 2.6) und von jeder Gruppe wurden Phantommodelle für MRT vorbereitet (s. 2.7). Die Inkubationskonzentration, welche eine optimale Signalauslöschung bei niedrigem Signal-zu-Rausch-Verhältnis ergab, wurde in den weiteren Versuchen verwendet.

Nach der Optimierung der Inkubationskonzentration wurden Versuche mit Zellen von drei unterschiedlichen Spendern für die Bestimmung der optimalen Inkubationsdauer durchgeführt. Nach einer Adhäsionsphase von 18 Stunden wurden die Zellen in 6-Loch-Platten mit einer Konzentration von 30 Partikel/Zelle für folgende Inkubationszeiten inkubiert:

- Gruppe 1: 2 Stunden
- Gruppe 2: 4 Stunden
- Gruppe 3: 6 Stunden
- Gruppe 4: 8 Stunden

Nach dem Waschen der Zellen mit PBS wurde die Partikelaufnahme der Zellen durch lichtmikroskopische Untersuchungen quantifiziert. Die Inkubationsdauer, welche eine ausreichende Partikelaufnahme der Zellen für die MRT Untersuchung ergab, wurde im weiteren Verlauf der Studie verwendet.

2.5. Resuspendierung der primären humanen Hepatozyten

Um die in Adhäsion markierten primären humanen Hepatozyten für eine Zelltransplantation bereitstellen zu können, müssen sie in ausreichender Menge und guter Qualität von den Kulturplatten abgelöst werden. Aufgrund klinischer Erfahrungen mit Trypsin wurde in dieser Studie für eine Resuspendierung der kultivierten Hepatozyten Trypsin/EDTA (0,25 %/0,02 %) verwendet [49].

In 6-Loch-Platten kultivierte Zellen wurden mit je 2 ml PBS gespült und mit 300 µl Trypsin/EDTA-Lösung für 5 Minuten im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert. Anschließend wurde der Verdauungsprozess mit 300 µl Williams` Medium E gestoppt und die Zellen durch vorsichtiges Pipettieren abgelöst. Zellzahl und Viabilität wurden mittels Trypan Blau-Färbung in einer Neubauer Zählkammer bestimmt.

2.6. Nachweis der Partikelinkorporation

2.6.1. Lichtmikroskopie

Die Beladung der primären humanen Hepatozyten mit MPIO wurde lichtmikroskopisch (Axiovert 40CFL; Zeiss, Oberkochen, D) überprüft und quantifiziert. An jedem Versuchstag wurden die Zellen lichtmikroskopisch untersucht und es wurden bei 200-facher Vergrößerung Phasenkontrastaufnahmen zur Beurteilung der Zellmorphologie und Durchlichtaufnahmen zur Analyse der Partikelaufnahme aufgenommen (QICAM FAST 1394; QIMAGING, Surrey, British Columbia, CDN). Jedes Bild wurde digital in 20 Felder geteilt (Graphic Converter X, Universal Binary V5.9; Lemkesoft GmbH, Peine, D). Fünf Felder wurden mit Microsoft Excel (Microsoft Excel for Mac 2004, V11.3.6; Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) randomisiert ausgewählt und die Anzahl der inkorporierten Partikel pro Zelle sowie die Effizienz der Markierung bestimmt.

2.6.2. Fluoreszenzmikroskopie

Für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurden in 8-Loch-Platten kultivierte Zellen unter den in den Vorversuchen optimierten Bedingungen unter Ausschluss von Licht mit SPIO oder MPIO inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit 4 % Paraformaldehyd für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurden die Zellen ein weiteres Mal mit PBS gewaschen und mit 80 % Methanol bei -20 °C für 20 Minuten inkubiert. Nach einem letzten Waschgang mit PBS wurden sie mit Blockpuffer (3 % Bovine Serum Albumin, 0,2 % Fischgelatine, 2 % FCS) für eine Stunde inkubiert. Für die Anfärbung von Zytokeratin18 wurden die Zellen zuvor

für eine Stunde mit dem Primärantikörper, anti-CK18 und anschließend für eine Stunde mit dem Sekundärantikörper Cy3 (anti-CK18), DAPI (Nukleus) und TRITC-Phalloidin (Aktinfilamente) inkubiert. Danach wurde die Kulturplatte mit PBS gespült und mit Aqua-Poly/Mount eingedeckelt. Die Aufnahmen erfolgten im Fluoreszenzmikroskop mit den entsprechenden Monochromatorfiltern.

2.6.3. Elektronenmikroskopie

Als weitere Methode zum Nachweis der MPIO-Inkorporation wurde Elektronmikroskopie durchgeführt. Die Bearbeitung der Proben sowie die Aufnahmen wurden in der Elektronenmikroskopieabteilung der Anatomie, Charité Campus Virchow bei Frau P. Schrade durchgeführt. Nach Inkubation der Zellen in 6-Loch-Platten unter optimierten Bedingungen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin (s. Punkt 2.5) resuspendiert. Die Zellen wurden danach in 15ml-Röhrchen überführt und bei Raumtemperatur über 30 Minuten sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 2,5 % Fixanz (Glutaraldehyd) resuspendiert und in 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Die Zellen wurden mit 2 % Osmium Tetraoxid fixiert, in 2 % Agar eingebettet und durch steigende Konzentration von Alkohol und Propylenoxid (50 %, 70 %, 90 %, 95 %) entwässert. Die Proben wurden über die Nacht mit Eponlösung infiltriert. Am nächsten Tag wurden die Proben in Kunststoffkapseln bei 60 °C für 48 Stunden polymerisiert. Ultradünne Scheiben (60 bis 70 nm) wurden mit einem Ultramikrotom (Ultracut S, Leica, Solms, D) geschnitten und auf Kupfer-Netze gelegt. Anschließend wurden die Schnitte mit 4 % wässriger Uranylazetat und Bleizitrat nach Reynolds gefärbt und mit einem Elektronmikroskop (EM 906, Zeiss, Oberkochen, D) untersucht.

2.7. Phantommodelle und *in vitro* MRT

MPIO markierte Zellen sowie native Zellen desselben Spenders wurden nach der Inkubationsphase mittels Trypsin/EDTA resuspendiert (s. Punkt 2.5) Zur Fixierung der Proben wurde 1 g Agarosepulver in 100 ml destilliertem Wasser bei 80 °C gelöst und 1,5 ml Kryoröhrchen wurden bis zur Hälfte mit diesem Agarosegel gefüllt. Nach Abkühlen wurden die Zellen mit definierter Anzahl (von 1×10^3 bis 1×10^6) in 250 μ l Agarosegel resuspendiert und auf die Bodenschicht pipettiert. Als Kontrolle wurden Agaroseproben mit freien Partikel vorbereitet. Nach Abkühlen der Zellschicht wurden die Röhrchen mit heißem Agarosegel aufgefüllt und im Wasserbad (37 °C) aufrecht stehend inkubiert, um Luftartefakte bei der Fixierung der Agarose zu vermeiden.

Phantommodelle wurden nach Fixierung mit einem klinischen MRT-Gerät (Signa 3T94, GE Healthcare, Milwaukee, WI, USA) bei einer Feldstärke von 3,0 Tesla und mit einer zirkulär polarisierten Oberflächenspule mit 2 cm Durchmesser (Rapid Biomedical, Würzburg, D) untersucht. Die Bildaufnahme erfolgte mittels einer T2*-gewichteten Gradienten-Echo-Puls-Sequenz. Das Bildfeld von 20 mm mit einer Matrix-Grösse von 256 x 256 mm und einer Schichtdicke von 0,8 mm führte zu einem nominalen Voxelvolumen von 78 x 78 x 800 μm . Die Repetitionszeit betrug 200 ms, die Echozeit 25 ms und der Flipwinkel 20 °. Die Untersuchung jeder Probe dauerte bei 12 Stimuli 5 Minuten und 10 Sekunden.

2.8. Charakterisierung der Zellen

Die in den Vorversuchen definierten Bedingungen für die MPIO-Markierung und Resuspendierung primärer humaner Hepatozyten wurden in einer Versuchsreihe mit Zellen von neun unterschiedlichen Spendern untersucht. Dazu wurden die Zellen 18 Stunden nach Isolierung in vier Gruppen geteilt und sechs Tage kultiviert:

Gruppe A: Nicht markiert – Adhäsion,

Gruppe B: Markiert – Adhäsion,

Gruppe C: Nicht markiert – Resuspension,

Gruppe D: Markiert – Resuspension.

Die Zellen der Gruppe B und D wurden am ersten Kulturtag mit MPIO markiert und anschliessend wurden die Zellen der Gruppe C und D trypsinisiert. Ab dem zweiten Kulturtag wurden die Mediumüberstände aus den 6-Loch-Platten täglich abgenommen, gesammelt und durch frisches Medium ersetzt. Die Mediumproben wurden bei 532 g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert und Aliquots bei -80 °C bis zur Messungen gelagert. Am letzten Kulturtag wurden die Platten dreimal mit PBS gewaschen und die Zellen wurden mit einem Zellspatel in 500 μl kaltem PBS abgelöst und in Eppendorfgefäße überführt. Die Proteinlösungen wurden bei 1×10^5 g und 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 μl PBS resuspendiert und für eine spätere Bestimmung des Proteingehaltes zur Quantifizierung der Zellmenge bei -80 °C eingefroren. Die Messung des Proteingehaltes erfolgte durch Inkubation der Proben in 96-Loch-Platten mit BC Assay Reagenz A und 4 % Kupfersulfat für 30 Minuten bei 37 °C. Die Absorption der Proben wurde mittels eines Spektrophotometers bei 562 nm gemessen, Bovines Serum Albumin wurde als Standard genutzt.

Als Zellschädigungsparameter wurden in den Überständen die Konzentrationen der Enzyme Aspartataminotransferase und Laktatdehydrogenase mittels Spektrophotometrie-basierter Kits (*NobiFlow GOT [IFCC]* und *NobiFlow LDH-L [IFCC]*) gemessen. Als Syntheseparameter dienten die Harnstoffkonzentration, gemessen mittels *NobiFlow Harnstoff-UV*, und die Albuminkonzentration, mittels *Albuwell-II Elisa* bestimmt. Alle Tests wurden nach Anleitung der Hersteller durchgeführt.

Für die Bestimmung der mitochondrialen Aktivität der Zellen mittels des MTT-Tests wurden in 96-Loch-Platten kultivierte Zellen genutzt. Die Zellen der Gruppen A, B, C und D wurden am zweiten Tag und am Ende der Kultur mit dem Reagenz des MTT-Kits (*CellTiter 96Aqueous One solution Cell Proliferation Assay*) für 4 Stunden inkubiert. Die Absorption wurde spektrophotometrisch bei 490 nm gemessen.

2.9. Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurden der *2-tailed Student's t-test* und *oneway ANOVA* mittels der Software *SPSS* (Version 13 für *Windows*, *SPSS Inc.*, Chicago, IL, USA) durchgeführt. Die Grafiken wurden mit *Deltagraph* (Version 5.0.1 für *Apple Macintosh OS X*, *SPSS Inc.*, Red Rock Software, Salt Lake City, UT, USA) erstellt. Die Angaben wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes angegeben und ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als signifikant erachtet.

3. Ergebnisse

3.1. Isolierung

Für die Studie zur Markierung primärer humaner Hepatozyten wurden Zellen von insgesamt 19 Patienten mit dem durchschnittlichen Alter von 57 ± 4 Jahren (im Bereich von 2 bis 81) verwendet. Bei sieben Patienten waren Lebermetastasen kolorektaler Tumoren, bei zwei Patienten Lebermetastasen anderer maligner Tumoren die Gründe für eine Leberteileresektion. Primäre maligne Tumoren der Leber waren bei fünf Patienten der Grund für eine Leberteileresektion. Vier Patienten wurden wegen benigner Tumoren operiert und bei einem Patienten konnte der Tumor präoperativ nicht identifiziert werden. Bei der Leberzellisolierung konnten durchschnittlich $172,1 \pm 43,9 \times 10^6$ lebende primäre humane Hepatozyten mit einer durchschnittlichen Viabilität von $75,7 \pm 1,4$ % gewonnen werden.

3.2. Markierung mit nanometerskaligen Partikel

3.2.1. Mikroskopie

Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigten die Inkorporation der Tat-Peptid gekoppelten *MagForce*®-Partikel in die primären humanen Hepatozyten nach einstündiger Inkubation. Sowohl licht- als auch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen ließen keinen morphologischen Unterschied zwischen markierten und nicht markierten Zellen erkennen. Die primären humanen mono- und polynukleären Hepatozyten zeigten eine charakteristische polygonale Form mit granuliertem Zytoplasma (Abb. 4).

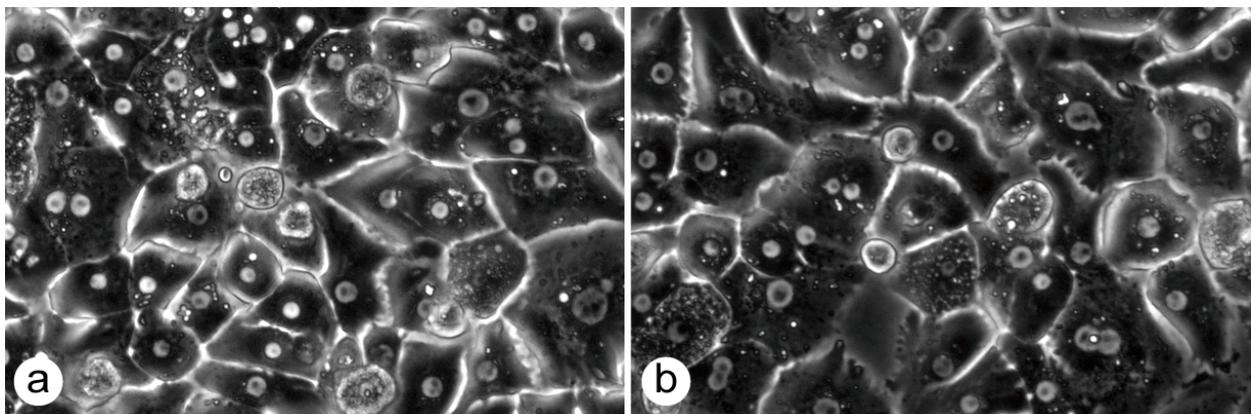


Abb. 4: Lichtmikroskopische Aufnahmen der nicht-markierten (a) und mit SPIO markierten (b) primären humanen Hepatozyten direkt nach der Inkubation. (200-fache-Vergrößerung)

Die FITC-markierten *MagForce*®-Partikel waren in den Fluoreszenzaufnahmen bei 200-facher Vergrößerung im gesamten Zytoplasma der Hepatozyten zu erkennen. Die Aktinfilamente und die Nuklei der markierten Zellen waren vergleichbar mit den der nicht-markierten primären humanen Hepatozyten. Die Immunfluoreszenzfärbung des hepatozytenspezifischen intrazellulären Proteins Zytokeratin18 identifizierte die kultivierten Zellen als primäre humane Hepatozyten (Abb. 5).

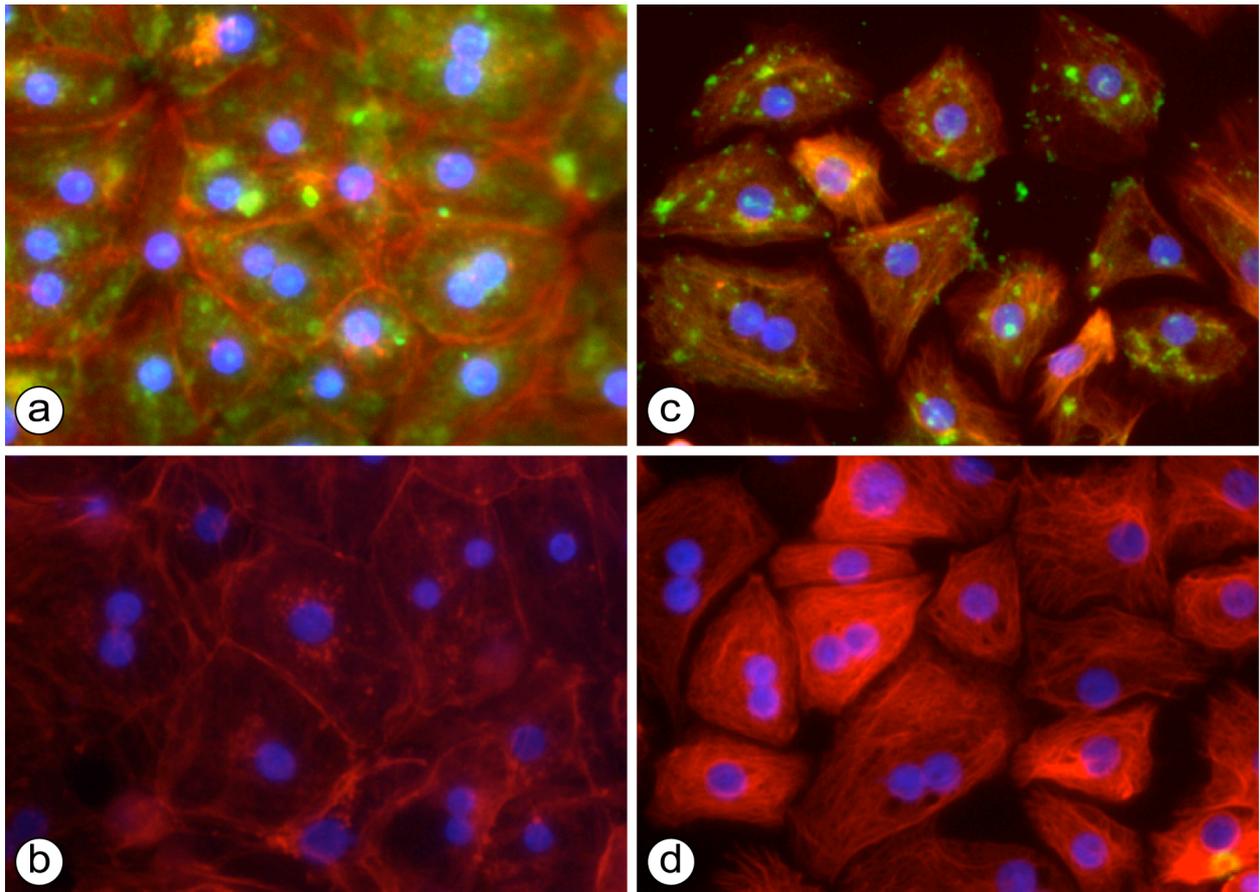


Abb. 5: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der mit FITC-gekoppelten Partikel (grün) markierten (a und c) und nativen (b und d) primären humanen Hepatozyten bei 200-facher Vergrößerung. Im Bild a und b sind die Aktinfilamente mit Phalloidin (rot) und die Nuklei mit DAPI (blau) dargestellt. Für die Bilder c und d wurde das zytoplasmische Protein CK18 mit primärem Antikörper markiert und dann mit Cy3 (rot) angefärbt. Die Darstellung der Nuklei erfolgte durch DAPI-Färbung (blau).

3.2.2. MRT-Untersuchung

Die T2*-gewichteten Untersuchungen mittels 3,0 Tesla Magnetresonanztomographen zeigten die *in vitro* Detektierbarkeit der SPIO-markierten Zellen in Phantomproben. In sagittalen und axialen Aufnahmen der Agaroseschichten von SPIO-markierten primären humanen Hepatozyten waren als inhomogene Signalauslöschungen auf dem signalreichen Hintergrund des Agarosegels deutlich zu erkennen. Die sagittalen MRT-Aufnahmen der nativen Zellen mit gleicher Zellzahl als Kontrollgruppe zeigte außer einzelnen runden Artefakten eine homogene signalreiche Struktur. Diese Artefakte wurden von Luftblasen während des Abkühlens des Gels verursacht (Abb. 6).

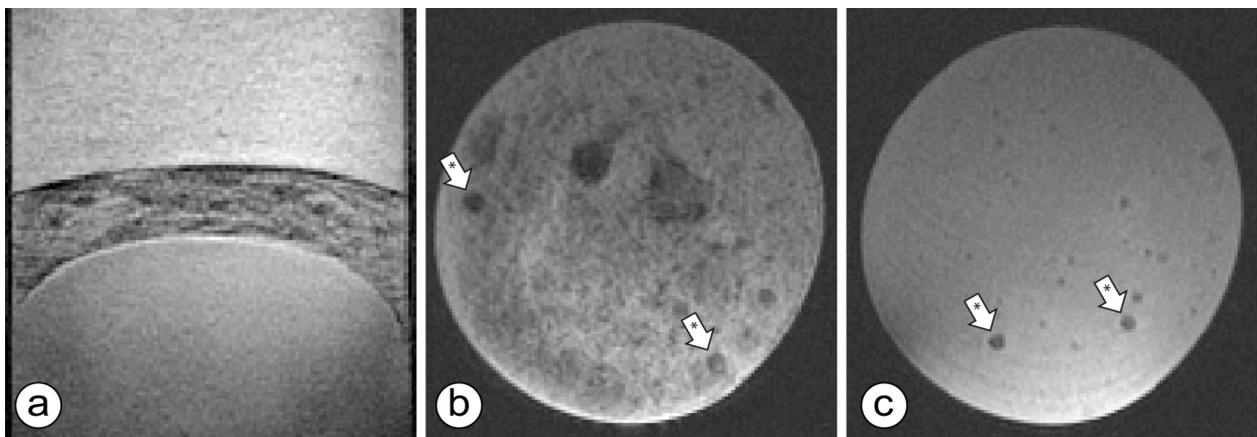


Abb. 6: MRT-Aufnahmen von primären humanen Hepatozyten im Agarose-Phantom (10^6 Zellen/250 μ l). In den sagittalen (a) und axialen (b) Schnitten der Agaroseproben der SPIO-markierten Hepatozyten sind deutliche Signalauslöschungen erkennbar. Der axiale Schnitt der Kontrollprobe (c) zeigt ein homogenes Signal. Die weißen Pfeile zeigen die Luftartefakte in den axialen Schnitten der Proben.

3.3. Markierung mit MPIO

Die ersten Vorversuche mit MPIO zeigten, dass die Inkorporation der MPIO in humane Hepatozyten von der Inkubationskonzentration abhängig ist. Die Inkubation nach 24-stündiger Präkultur mit zunehmender Partikelkonzentration (von 10 Partikel/Zelle bis 40 Partikel/Zelle) für 18 Stunden in Adhäsion führte zu einer steigenden Partikelbeladung von 10 auf 25 Partikel/Zelle, wobei die Markierungseffizienz der Zellen von 80 % auf 100 % zunahm (Abb. 7a). Die Partikelaufnahme der Zellen und die Zellintegrität wurden mittels Lichtmikroskopie untersucht. Nach der Inkubationsphase waren die Partikel sowohl einzeln als auch als Cluster im Zytoplasma der Hepatozyten lokalisiert. Im

Vergleich zu nativen Hepatozyten derselben Zellspender wurden bei den markierten Zellen keine morphologischen Unterschiede beobachtet.

Bei den Versuchen mit zunehmender Inkubationsdauer und einer Inkubationskonzentration von 30 MPIO pro Zelle wurde festgestellt, dass die Partikelaufnahme der primären humanen Hepatozyten von der Inkubationsdauer abhängig ist. Nach einer Präkultur von 18 Stunden wurde bei Inkubationsdauer von zwei Stunden und einer Konzentration von 30 MPIO/Zelle durchschnittlich 12 Partikel pro Zelle mit einer Effizienz von 83 % aufgenommen. Die Partikelaufnahme stieg nach 8 Stunden auf 22 MPIO/Zelle. Die Markierungseffizienz der Zellen erreicht nach einer achtstündigen Inkubation mit 30 MPIO/Zelle 100 % (Abb. 7b).

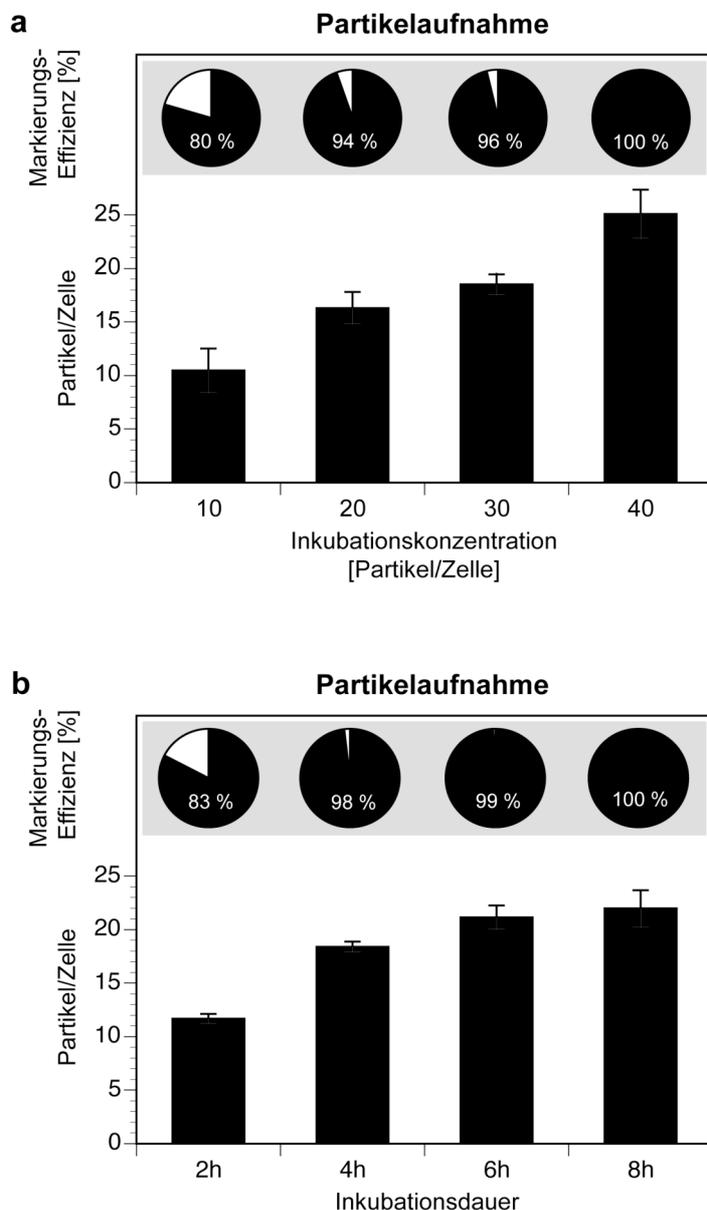


Abb. 7: Die Zellen wurden nach einer Adhäsionsphase von 24 Stunden mit den Konzentrationen von 10, 20, 30 und 40 MPIO pro Zelle für 18 Stunden inkubiert. Die Anzahl der inkorporierten Partikel stieg von 10 MPIO/Zelle auf 25 MPIO/Zelle an, wobei die Markierungseffizienz mit der höchsten Konzentration einen Wert von 100 % erreichte (a).

Die Anzahl der Partikel und die Markierungseffizienz stiegen ebenso mit zunehmender Inkubationszeit (von 2 auf 8 Stunden) nach einer Präkulturphase von 18 Stunden (b).

Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes, von je n = 3 Versuche.

In den Vorversuchen wurde darüber hinaus ein Effekt der Präkulturphase auf die Markierung der Hepatozyten beobachtet: Mit den Zellen, welche 24 Stunden nach dem Aussähen für 18 Stunden mit 30 Partikel/Zelle inkubiert wurden, wurde eine Markierung mit durchschnittlich 18 Partikel pro Zelle bei einer Markierungseffizienz von 96 % erreicht. Ähnliche Ergebnisse konnten mit Zellen nach einer 18-stündigen Präkultur und mit derselben Partikelkonzentration innerhalb von vier Stunden erreicht werden.

3.3.1. Mikroskopie

Die fluoreszenz- sowie die elektronenmikroskopischen Untersuchungen bestätigten die Aufnahme der MPIO durch die primären humanen Hepatozyten. In der 200-fachen Vergrößerung waren die *DragonGreen*-markierten Eisenoxidpartikel im Zytoplasma der primären humanen Hepatozyten lokalisierbar (Abb. 8a).

Die elektronmikroskopischen Aufnahmen bei 3597-facher Vergrößerung zeigten die Eisenoxidpartikel vereinzelt und als Cluster mit membranöser Umhüllung. Die Eisenkerne sind in den mikrometerskaligen Partikel als schwarze Areale zu erkennen, welche sich von Partikel zu Partikel in Größe unterscheiden. Dies zeigte die Polydispersität der Partikel (Abb. 8b).

3.3.2. MRT-Untersuchung

Um die nötige Anzahl an inkorporierten Partikel für eine optimale Darstellung der markierten primären Hepatozyten mittels klinischer MRT zu bestimmen, wurden Phantomproben von Zellen mit unterschiedlichen Partikelbeladungen vorbereitet und im klinischen MRT-Gerät untersucht. Die Mindestanzahl an inkorporierten Partikel, welche eine deutliche Einzelzelldetektion und ein niedrigeres Signal-zu-Rausch-Verhältnis erzeugte, wurde bestimmt und als Parameter für alle weiteren Versuche verwendet.

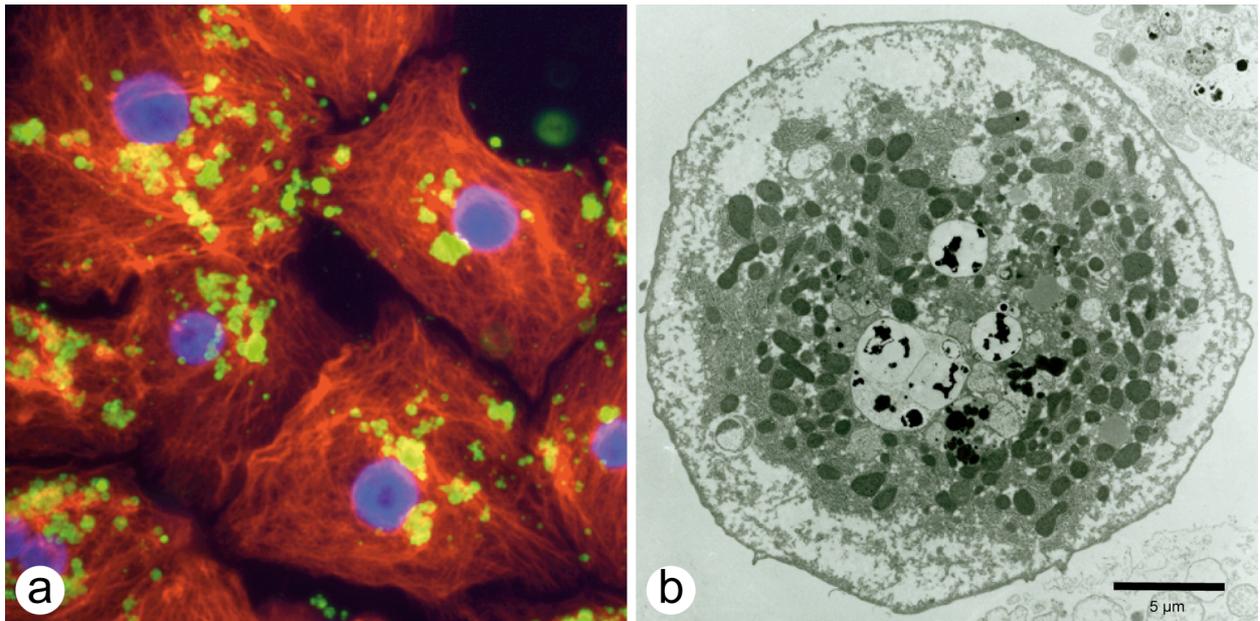


Abb. 8: Fluoreszenz- (a) und elektronenmikroskopische (b) Aufnahmen der primären humanen Hepatozyten. Zytokeratin18 wurde mit Cy3 (rot), Nuklei mit DAPI (blau) gefärbt. Die *DragonGreen*-haltigen mikrometerskaligen superparamagnetischen Partikel sind im Zytoplasma der Zellen zu sehen (grün).

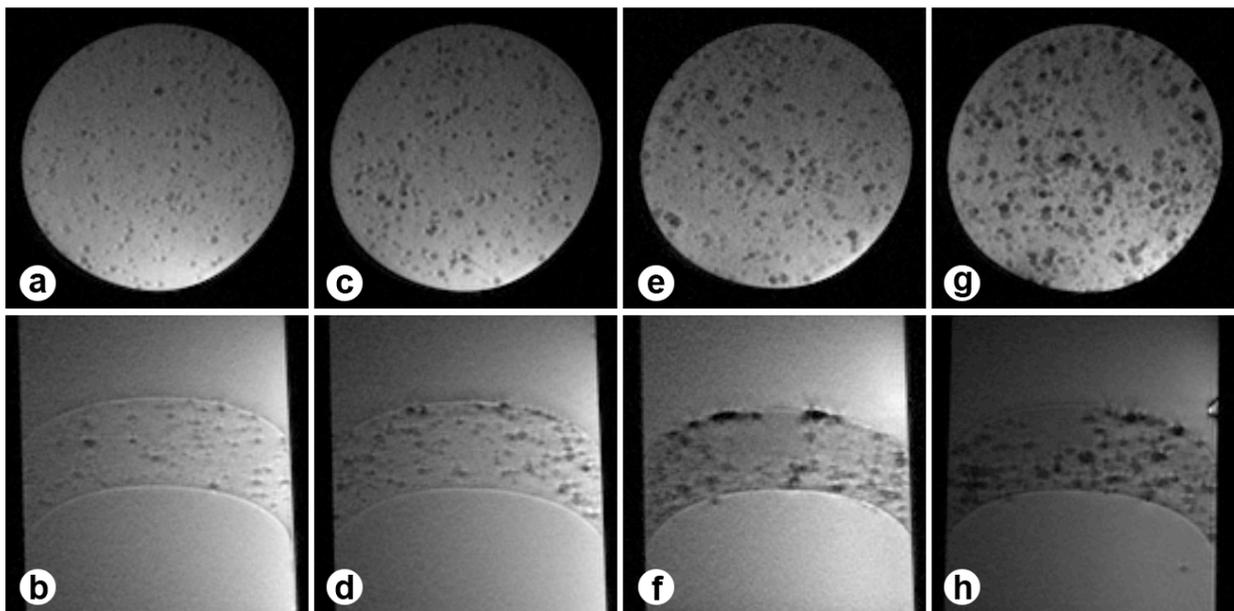


Abb. 9: Sagittale und axiale T2*-gewichteten Aufnahmen der Phantomproben (1000 Zellen/250µl). Die Hypodensität der markierten Zellen nahm mit steigender Partikelinkorporation zu. Die Proben von den Zellen mit je 10 ± 2 Partikel (a und b) und die Proben von den Zellen mit 16 ± 1 Partikel (c und d) zeigten ein schwach negatives Signal, wobei die Proben von den Zellen mit 18 ± 1 (e und f) oder 25 ± 2 Partikel (g und h) auf dem Agarosehintergrund deutliche Signalauslöschungen hervorrufen.

Die Abbildung 9 zeigt die MRT-Ergebnisse der Messungen von Phantommodellen unterschiedlich beladener Zellen. Die Untersuchungen der Phantomproben der Zellen mit durchschnittlich 10 ± 2 Partikel bzw. 16 ± 1 Partikel zeigten niedrigere Signalauslösungen mit höherem Signal-zu-Rausch-Verhältnis ($45,1 \pm 8,4$ und $38,4 \pm 7,1$), wobei die Proben mit 18 ± 1 Partikel/Zelle und 25 ± 2 Partikel/Zelle deutliche Signalauslösungen und ein niedrigeres Signal-zu-Rausch-Verhältnis aufwiesen ($28,1 \pm 5,3$ und $30,7 \pm 5,4$; Abb. 10).

Die axialen und sagittalen MRT-Aufnahmen zeigten einzelne Signalauslösungen, welche durch primäre humane Hepatozyten mit durchschnittlich 18 MPIO/Zelle verursacht wurden. Aufnahmen von Proben einer gleichen Zellzahl nativer Zellen zeigen keine Signalveränderungen. Die Aufnahmen der Partikelsuspension mit einer korrespondierten Anzahl an Partikel ergaben eine homogene Signalstörung auf dem Agarosehintergrund, aber keine deutlichen punktuellen Auslösungen (Abb. 11).

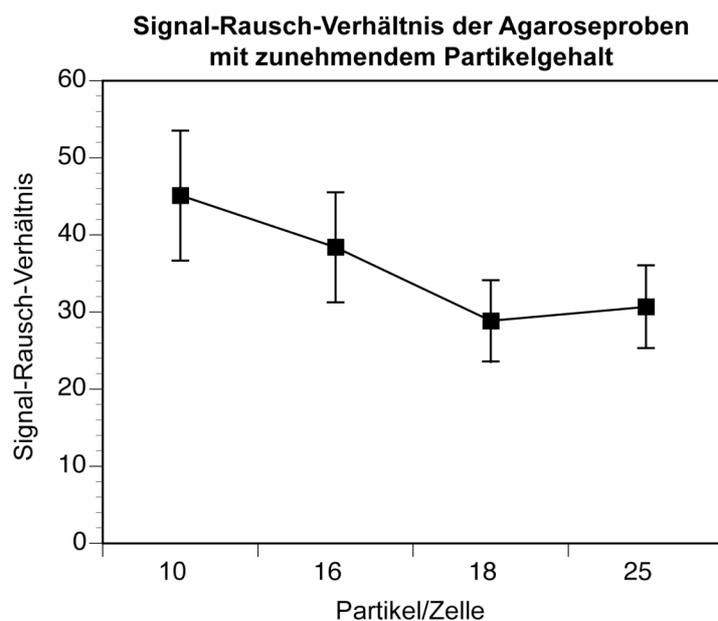


Abb. 10: Signal-Rausch-Verhältnis der markierten humanen Hepatozyten bei T2*-gewichteten Untersuchungen auf Agarosehintergrund.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die Inkubationskonzentration von 30 Partikel/Zelle und eine Inkubationsdauer von vier Stunden nach einer Präkulturphase von 18 Stunden für weitere Versuche verwendet.

3.3.3. Stabilität der Zellmarkierung und Morphologie der markierten Zellen

Die Inkubation der primären humanen Hepatozyten mit MPIO für vier Stunden führte zu einer Markierung mit durchschnittlich 18 ± 1 Partikel und einer Markierungseffizienz von 97 ± 1 %. Über einen Zeitraum von fünf Tagen nach der Markierung konnte lichtmikroskopisch kein Partikelverlust festgestellt werden. Die Partikelbeladung der Zellen der Gruppe B betrug am ersten Tag der Rekultur 19 ± 1 , die Beladung der Zellen der Gruppe D betrug 18 ± 1 Partikel pro Zelle. Am letzten Tag der Kultur betrug die Partikelanzahl für Gruppe B 19 ± 1 und für Gruppe D 18 ± 1 . Der Unterschied in der Partikelbeladung der resuspendierten und nicht-resuspendierten Zellen war statistisch nicht signifikant (Abb. 12).

Nach der Trypsinbehandlung konnten $52,2 \pm 4$ % der lebenden, nicht-markierten Zellen (Gruppe C) und $55,1 \pm 6,8$ % der lebenden, markierten Zellen (Gruppe D) resuspendiert werden. Die Viabilität der Zellen nach der Resuspendierung war $68,9 \pm 3,2$ % für Gruppe C und $72,5 \pm 3,5$ % für Gruppe D.

Die täglichen lichtmikroskopischen Untersuchungen während dieser Rekulturperiode zeigten anhand morphologischer Kriterien keine negativen Effekte von Markierung und Resuspendierung (Abb. 13). Die primären humanen mono- und polynuklearen Hepatozyten zeigten eine charakteristische polygonale Form mit granuliertem Zytoplasma. Die Partikel waren sowohl einzeln als auch als Aggregate im Zytoplasma zu sehen, wobei sich die Partikel an den ersten Kulturtagen eher an der Innenseite der Zellmembran befanden und mit weiterer Kulturdauer den Zellkernen näherten.

3.3.4. Zellschädigung und Zellmetabolismus

Die beiden resuspendierten Gruppen (C und D) hatten am ersten Tag nach Trypsinbehandlung statistisch höhere AST-Werte (C: 106,8 U/l und D: 113,4 U/l) im Vergleich zu den Adhäsionsgruppen (A: 49,5 U/l und B: 48,2 U/l). Bereits nach dem ersten Mediumwechsel erreichten die Werte jedoch wieder die Level der Kontrollgruppen (A: 27,7 U/l; B: 28,7 U/l; C: 36 U/l und D: 38,4 U/l). Im weiteren Verlauf der Kulturphase zeigten die AST-Werte sowohl in den jeweiligen Gruppen über die Zeit als auch die Werte der unterschiedlichen Gruppen an denselben Tagen keine signifikanten Unterschiede (14a).

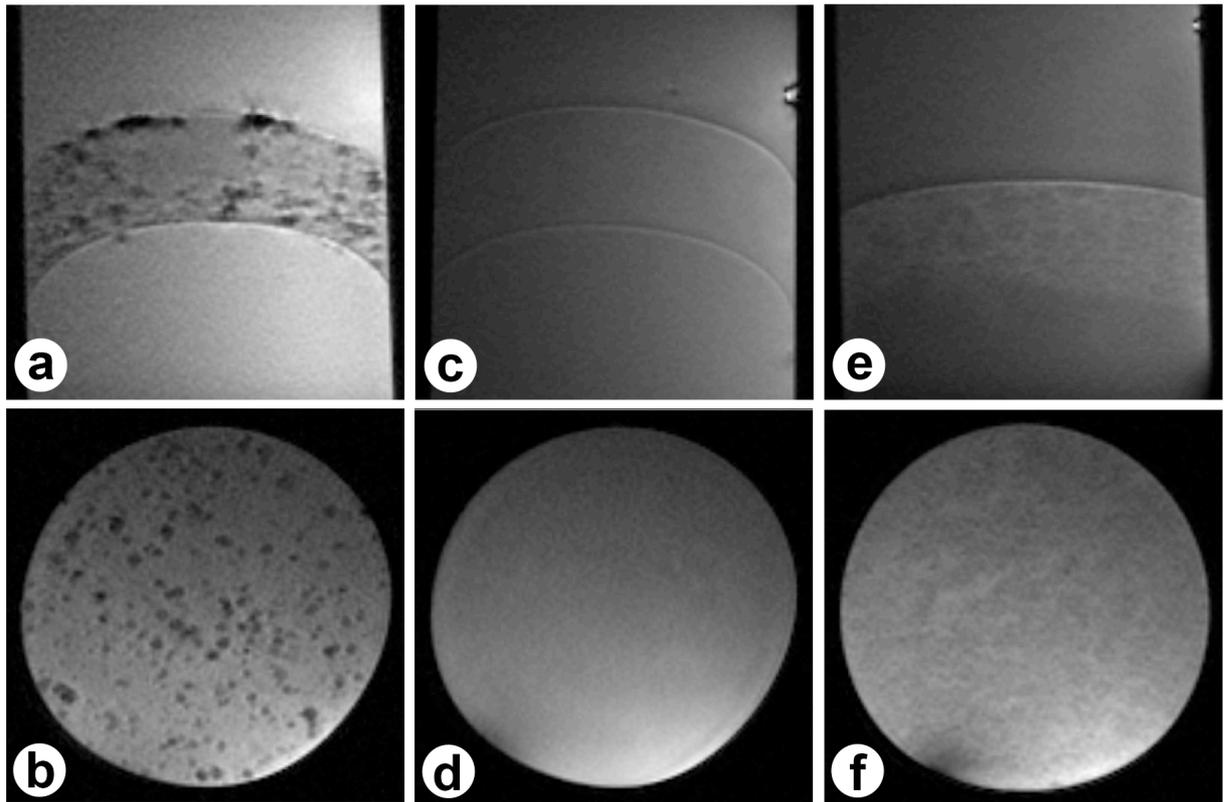


Abb. 11: MRT-Darstellung von in Agarose eingebetteten primären humanen Hepatozyten mittels einer T2*-gewichteten Gradienten-Echo-Puls-Sequenz. Zellen mit 18 MPIO sind bei einer Konzentration von 1000 Zellen/250 μ l in sagittalen und axialen Schnitten klar erkennbar (a, b). Die gleiche Konzentration unmarkierter Zellen (c, d) sowie die entsprechende Anzahl MPIO in Agarose (e, f) zeigen keine Signaländerungen.

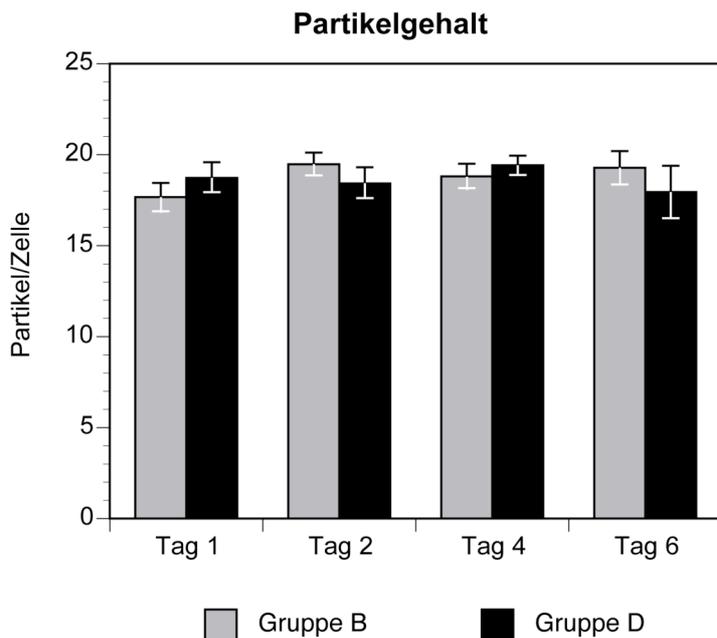


Abb. 12: Partikelgehalt der Inkubationsgruppen während der Kulturperiode.

Die LDH-Werte der resuspendierten Zellen waren am ersten Tag der Rekultur 11,2 U/l (Gruppe C) und 9,7 U/l (Gruppe D). Am nächsten Tag erreichten sie das Niveau der Adhäsionsgruppen (A: 13,4 U/l; B: 14,5 U/l; C: 14,6 U/l und D: 14,8 U/l). Bis zum Ende der Kulturphase gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen an den verschiedenen Zeitpunkten, wobei die LDH Werte der resuspendierten Zellen von Tag fünf auf Tag sechs im direkten Vergleich signifikant gestiegen sind (Abb. 14b).

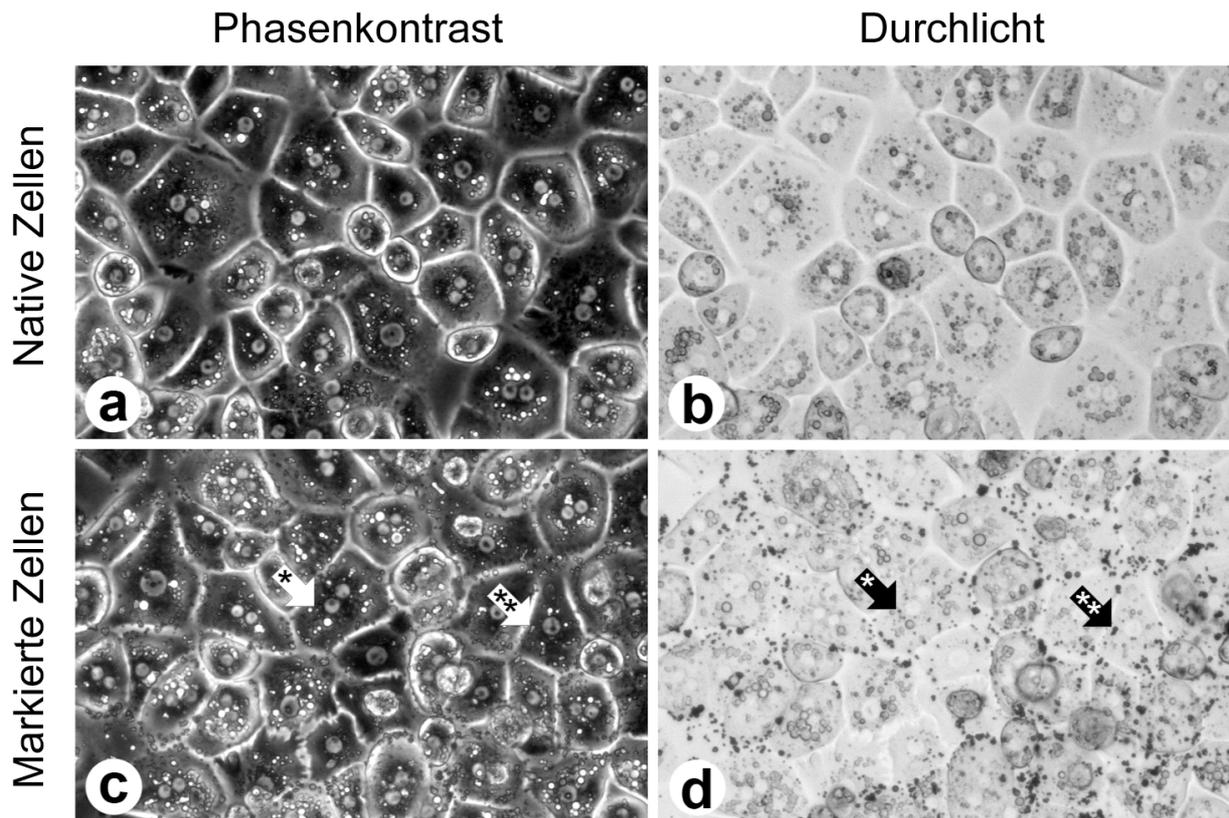


Abb. 13: Lichtmikroskopische Aufnahmen der markierten und nicht-markierten primären humanen Hepatozyten in 6-Loch-Platten. Die Phasenkontrastaufnahmen der markierten Zellen (c) sowie der nativen Zellen (a) zeigten die normale Charakteristik kultivierter primärer humaner Hepatozyten. In den Durchlicht-Aufnahmen der markierten Zellen sind die MPIO als schwarze Punkte erkennbar (d). Die nativen Zellen enthalten keine schwarzen Punkte in der Durchlichtmikroskopie (b). Die *-markierten Pfeile zeigen die einzelnen MPIO im Zytoplasma, und die Pfeile mit **-Markierung zeigen die MPIO-Aggregate.

Die mitochondriale Aktivität der Zellen wurde durch die Markierung mit MPIO und durch die Behandlung mit Trypsin nicht gestört. Die Absorption der Zellen der Gruppe A ($1 \pm 0,3$ und $1,6 \pm 0,3$) und Gruppe B ($1,1 \pm 0,3$ und $1,7 \pm 0,3$) waren am zweiten Tag sowie am letzten Tag der Kultur nicht signifikant unterschiedlich. Die resuspendierten

Gruppen zeigten an den beiden Tagen deutlich größere Absorption im Vergleich zu den Adhäsionsgruppen (Gruppe C: $2,5 \pm 0,1$ und $2,3 \pm 0,3$; Gruppe D: $2,3 \pm 0,3$ und $2,3 \pm 0,3$). Im Vergleich der Gruppen untereinander konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 14e).

Die Syntheseparameter der Zellen zeigten eine entsprechende Charakteristik wie die Schädigungsparameter. Die Harnstoffsynthese der resuspendierten Zellen waren am ersten Tag nach der Trypsinbehandlung im Vergleich zu den anderen Gruppen (A: 1,6 mmol/l; B: 1,6 mmol/l) signifikant niedriger (C: 1,1 mmol/l; D: 1,1 mmol/l). Die Gruppen C und D erreichten das Niveau der Gruppen A und B am dritten Tag der Kultur, die Werte aller Gruppen unterschieden sich im weiteren Verlauf nicht signifikant voneinander (14c).

Die Albuminproduktion der Zellen war am zweiten Tag der Kultur in allen Gruppen niedrig (A: 7,9 $\mu\text{g/ml}$; B: 7,1 $\mu\text{g/ml}$; C: 12,7 $\mu\text{g/ml}$ und D 7,9 $\mu\text{g/ml}$), stieg aber am Tag 3 in der Gruppe A auf 12,9 $\mu\text{g/ml}$, in der Gruppe B auf 9,5 $\mu\text{g/ml}$, in der Gruppe C auf 17,8 $\mu\text{g/ml}$ und in der Gruppe D auf 12,6 $\mu\text{g/ml}$. Während der gesamten Kultur nahm die Albuminproduktion in allen Gruppen zu (14d). Der Proteingehalt der Zellen am Ende der Kulturphase zeigte keinen signifikanten Unterschied (Gruppe A: 181,3 $\mu\text{g}/10^6\text{Zellen}$; Gruppe B: 156,2 $\mu\text{g}/10^6\text{Zellen}$; Gruppe C: 204,8 $\mu\text{g}/10^6\text{Zellen}$; Gruppe D: 154,1 $\mu\text{g}/10^6\text{Zellen}$) und wies auf eine gleiche Menge an kultivierten Zellen hin.

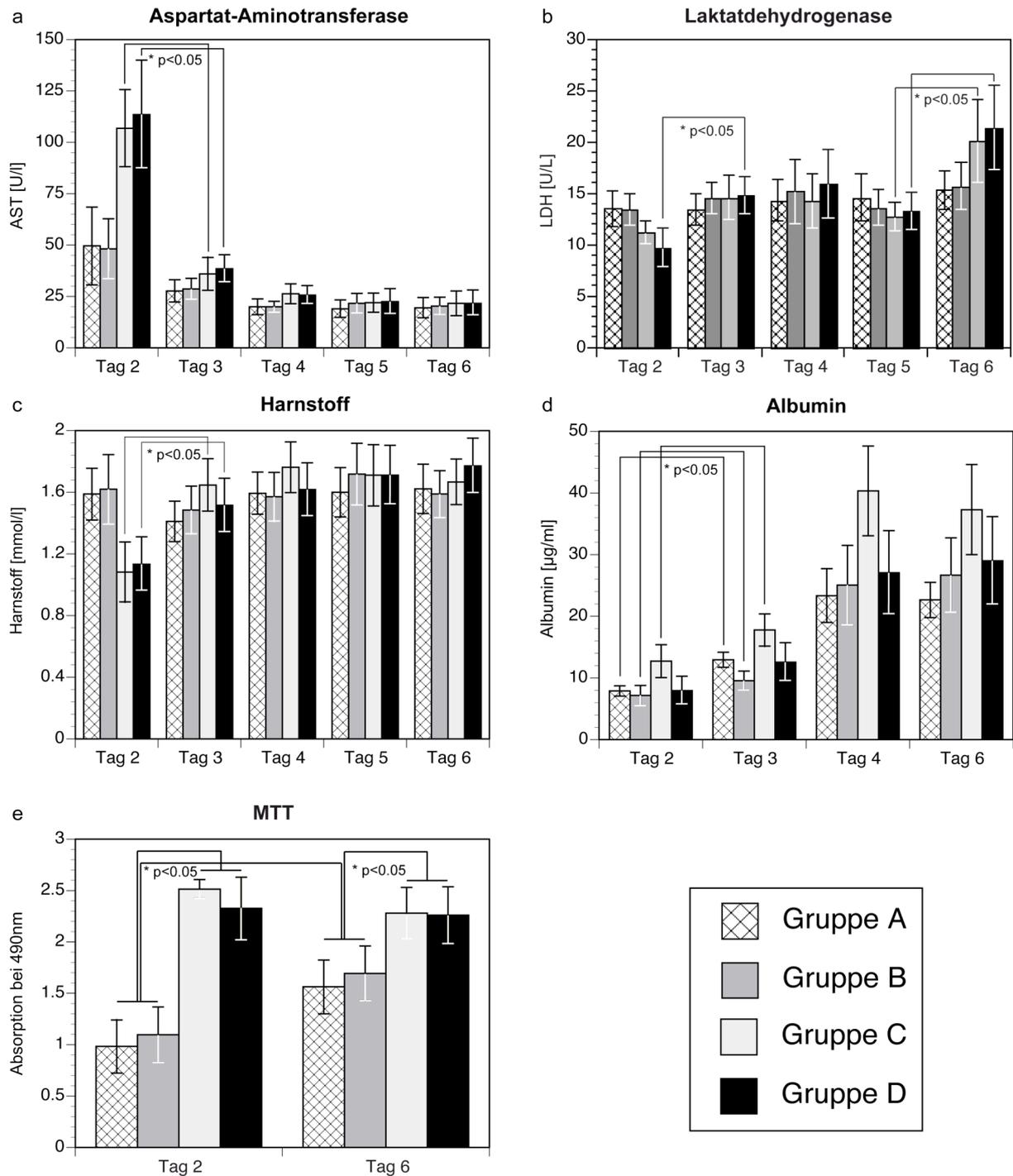


Abb. 14: Schädigungs- (AST-LDH) und Syntheseparameter (Albumin, Harnstoff) sowie die mitochondriale Aktivität (MTT-Test) der primären humanen Hepatozyten während der sechstägigen Kultur.

4. Diskussion

Die Lebertransplantation stellt derzeit das einzige etablierte kurative Therapieverfahren im Endstadium der Lebererkrankungen dar. Parallel zur Entwicklungen und Verbesserungen operativer Verfahren, wie zum Beispiel der Leberlebendspende, der Optimierung der Auswahlkriterien für die Organempfänger sowie der perioperativen Versorgung der Patienten, werden alternative Methoden zur Organtransplantation gesucht.

Die auxiliäre partielle orthotope Lebertransplantation (APOLT) bei akutem Leberversagen zeigte, dass bereits eine kleine Masse von metabolisch intaktem und gesundem Lebergewebe die Funktion der Leber unterstützen und eine Regeneration der patienteneigenen Leber ermöglichen kann [50]. Die positiven Ergebnisse der APOLT bei genetisch bedingten Erkrankungen zeigten darüber hinaus, dass die bei den Patienten fehlenden Enzyme im Körper durch diese Methode ersetzt werden können [21]. Die Transplantation von Leberzellen wird basierend auf diesem Prinzip als alternative Methode zur Organtransplantation diskutiert. In Tierversuchen wurde gezeigt, dass die applizierten Leberzellen in vivo funktionstätig sind und diese Therapie positive klinische Effekte hat [51]. Die Transplantierten Zellen - in der Leber, der Milz, im Peritoneum, in der Bauchspeicheldrüse oder subkapsulär in der Niere – haben im Vergleich zu extrakorporalen zellbasierten Unterstützungssystemen einen direkten Kontakt mit dem Empfängergewebe und nach der Integration ins Organparenchym indirekt zum Gefäßsystem.

Erste klinische Studien zur allogenen Leberzellentransplantation zeigten begrenzte, aber durchaus positive Effekte dieses Verfahrens beim akuten Leberversagen. Biochemische Parameter, wie zum Beispiel Ammoniak, konnten durch diese Therapie signifikant reduziert werden. Ebenso konnte der Komascoring der Patienten durch eine Besserung der Enzephalopathie reduziert werden [24]. Mittels einer Leberzelltransplantation wurden bislang sieben Patienten mit akutem Leberversagen ohne eine Lebertransplantation therapiert. Bei weiteren sieben Patienten wurde durch die Zelltransplantation die Funktion der Leber unterstützt, bis eine geeignete Leber für die Transplantation zur Verfügung stand [19 - 24].

Eine viel versprechende Anwendung der allogenen Zelltransplantation stellt die Therapie der metabolischen Erkrankungen der Leber dar. In frühen Stadien der meisten dieser Krankheitsbilder ist, abgesehen von dem entsprechenden Enzymausfall, die übrige Funktion der Leber nicht eingeschränkt und die Architektur der Leber intakt.

Nach Applikation von hinsichtlich des Gendefekts gesunden Leberzellen konnte gezeigt werden, dass die fehlenden Proteine exprimiert werden können [52, 53]. Bei fünf Patienten mit dem Crigler Najjar Syndrome Typ I konnten mit diesem Verfahren die Billirubinspiegel deutlich reduziert werden [54]. Ebenso wurden bei Alfa1-Antitrypsin-Mangel, Faktor VII- Mangel, Glykogenspeicherungserkrankung, Infantile Refsum Erkrankung, Progressive Familiäre Intrahepatische Cholestase und Harnstoffzyklusstörung die Leberzellentransplantation als Therapiemethode klinisch untersucht [24]. Eine noch elegantere Therapie dieser Erkrankungen wäre die Anwendung autologer, *ex vivo* genmodifizierter Zellen [49]. Somit könnte man auf die jahrelange, teure und unter Umständen mit unerwünschten Wirkungen assoziierte Immunsuppressionstherapie nach der Zelltransplantation verzichten.

Im Rahmen der klinischen Leberzellentransplantation werden zwei Zielorgane, die Leber und die Milz, als Applikationsort diskutiert. Als Zugangswege kommen für die Leber eine Applikation über die Vena portae, ein transjugulärer Zugang und eine direkte Injektion in das Lebergewebe in Frage. Bei der Milz kann die Applikation über die Arterie linealis oder aber über eine intrasplenische Injektion erfolgen. Solange die Architektur der Leber intakt ist, sollten die Zellen entweder über die Vena portae oder den Umweg der Milz in die Leber transplantiert werden [55]: Die in die Milzpulpa applizierten Zellen gelangen über die Vena lienalis in die Leber und integrieren sich ins Leberparenchym. Im Tiermodell wurde gezeigt, dass sich die Zellen zunächst in den Lebersinusoiden anlagern und für kurze Zeit eine Ischämie verursachen [56]. Daraufhin dringen die Zellen ins Lebergewebe ein. Der gesamte Prozess des Einwanderns und der Integration der Leberzellen im Leberparenchym dauert drei bis sieben Tage. Danach sind die transplantierten Zellen von den Empfängerzellen kaum zu unterscheiden [57]. Das Anwachsen der Hepatozyten in die Milz ist ebenfalls im Tiermodell gut beschrieben. Es wurde gezeigt, dass die applizierten Hepatozyten funktionstätig sind und sinusoidale Formationen bilden - die so genannte Hepatisierung (*hepatisation*) der Milz [55]. Während andere ektopische Applikationsorte rein tierexperimentell untersucht wurden, wurde die splenische Applikation klinisch für eine temporäre Therapie des Leberversagens verwendet. Es ist allerdings noch zu klären welcher Applikationsort mit welchem Eingriff für welche Patienten geeignet ist. Dies erfordert ein genaueres Verständnis des Mechanismus der Zelltransplantation im Sinne einer zeitnahen und langzeitigen Überwachung der applizierten Zellen. Vor der klinischen Anwendung sollten die Effektivität und die Sicherung des Eingriffs und Zugangsweges

für Zelltransplantation im Idealfall durch Kombination mit bildgebenden Diagnoseverfahren überprüft werden.

Wie bei anderen invasiven Maßnahmen ist auch bei der Leberzelltransplantation eine kontinuierliche Überwachung der Therapie im Sinne einer Detektion der Zellen im Patienten während und nach der Applikation wünschenswert. Durch endogene Faktoren oder durch exogene Manipulationen (medikamentös, invasiv radiologisch) können die „gesunden“ Spenderhepatozyten bei Vorhandensein einer geeigneten Infrastruktur zum Anwachsen unter Umständen eine gesteigerte Proliferationsrate im Vergleich zu den vorgeschädigten Empfängerhepatozyten zeigen [51, 58]. Die zeitnahe Umstellung der Immunsuppressionstherapie könnte eine überschießende Proliferation der Spenderzellen verhindern. Da der Verbleib der transplantierten Zellen und ihre metabolische Leistung mittels nichtinvasiver Methoden zeitgleich nicht demonstriert werden können, kann derzeit keine kontrollierte Manipulation der Zellproliferation durchgeführt werden, welche bei einer dynamischen Therapie stark erkrankter Patienten unerlässlich ist. Die bisherigen klinischen Kenntnisse und Erfahrungen über die Leberzelltransplantation reichen nicht aus, um sichere Aussagen und Kriterien für einzelne Krankheitsbilder und einzelne Patienten festzulegen. Darüber hinaus konnte eine Korrelation der klinischen Effekte mit Qualität, Anzahl und Applikationsort der applizierten Zellen bis jetzt nicht nachgewiesen werden, da eine nicht invasive, repetitive und langzeitige Kontrolle der Zellen *in vivo* klinisch nicht möglich ist.

Hinsichtlich der Übertragbarkeit der ermutigenden Ergebnisse großtierexperimenteller Zelltransplantationsstudien muss beachtet werden, dass die Tiermodelle das Leberversagen beim Menschen nicht ideal simulieren können. Bei diesen Modellen ist die reduzierte Regenerationsfähigkeit der Hepatozyten in der Regel nicht vorhanden [57]. Mit konventionellen Methoden konnte bisher in klinischen Studien nicht untersucht werden, wie viele der applizierten Zellen das Zielorgan erreichen und sich in das Paranchym des Zielorgans integrieren können, wie viele Zellen mit dem Blutstrom an andere Orte verschleppt werden und wie viele Zellen durch das retikulo-endotheliale System abgebaut werden. Das Verhalten der Zellen und der Mechanismus der Interaktion der Zellen mit dem Zielorgan während und nach der Applikation konnten bis jetzt nicht demonstriert werden. Eine nicht-invasive klinisch einsetzbare Methode für die Detektion der transplantierten Zellen könnte auch der Demonstration des Erfolgs der Transplantation dienen und diese offenen Fragen beantworten.

Aufgrund des vergleichsweise geringen Gefährdungspotentials und des guten Auflösungsvermögens basieren die meisten Studien zur Verfolgung transplantierte Zellen auf der Anwendung der Magnetresonanztomographie [48]. In präklinischen Studien wurde die Zelldetektion neben MRT und Szintigraphie auch mittels optischer Verfahren wie Biolumineszenz oder Fluoreszenz durchgeführt. Diese Verfahren sind zwar hoch sensitiv, aber wegen der begrenzten räumlichen Auflösung und limitierter Eindringtiefe (bis zu 3 cm) ins Gewebe für eine klinische *in vivo* Darstellung der transplantierten Zellen nicht geeignet [59]. *Landis et al.* publizierten ein Protokoll zum Nachweis transplantierte Hepatozyten mittels Magnetresonanzspektroskopie: In einem Mausmodell wurden Leberzellen, welche das Kreatinkinase-Gen als Reporter gen enthielten, in die Empfängerleber transplantiert [58]. Mit dieser Methode sind auch die Tochterzellen der initial applizierten Zellen nachweisbar, da dieses Gen im Rahmen der Zellteilung weitergegeben wird. Für diese Methode ist jedoch eine genetische Modifikation der zu transplanzierenden Zellen erforderlich. Vor einer klinischen Anwendung dieses Verfahrens müssen Verfahren zur stabilen *ex vivo* Transfektion humaner Zellen etabliert und deren Sicherheit geprüft werden.

Positronen-Emissions-Tomographie und Einzelphotonen-Emissions-Tomographie sind weitere klinisch einsetzbare Methoden, um die applizierten Zellen darzustellen [60]. Obwohl diese Verfahren sensitiver als die MRT sind, sind die Erfahrungen mit diesen Verfahren zur zellulären Bildgebung begrenzt. Im Vergleich zu diesen Methoden ist die MRT zurzeit die einzige Methode, die sowohl für die Grundlagenforschung in präklinischen Studien als auch für die Diagnostik im Rahmen der klinischen Applikationen der Zelltransplantation eingesetzt werden kann.

Aufgrund zahlreicher erfolgreicher Studien zur Zellmarkierung mit nanometerskaligen superparamagnetischen Eisenoxidpartikel wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst nanometerskalige *MagForce*®-Partikel als intrazelluläres Kontrastmittel ausgewählt. Diese Partikel wurden mit dem Tat-Peptid des humanen HI-Virus modifiziert. Dies ermöglicht eine drastische Reduzierung der Inkubationszeit und der Inkubationskonzentration [61]. Nach einstündiger Inkubation konnten die FITC-markierten Eisenoxidpartikel im Zytoplasma der Hepatozyten mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. Darüber hinaus identifizierte die Immunfluoreszenzfärbung des spezifischen Zytoplasmaproteins CK18 die markierten Zellen als primäre humane Hepatozyten.

Mittels eines von *Pinkernelle et al.* optimierten Protokolls zur Zelldetektion mit einem klinischen 3,0 Tesla Magnetresonanztomographen konnten erste Aufnahmen primärer humaner Hepatozyten nach Markierung mit modifizierten *MagForce*®-Partikel gemacht werden [61]. Die durch die markierten Zellen verursachte Signalauslöschung bei T2*-gewichteten Untersuchungen hatte eine ähnliche Charakteristik wie die in anderen Zellmarkierungsstudien beschriebenen MRT-Ergebnisse. Eine Detektion der Zellen auf Einzelzellniveau konnte durch dieses Markierungsprotokoll jedoch nicht erreicht werden. Eine weitere Einschränkung ist die Modifizierung der Partikel mit dem Tat-Peptid: Aufgrund der starken Affinität des Tat-Peptides zum Zellkern werden die Eisenoxidpartikel zum Teil in den Zellkern aufgenommen [40]. Bei einer Biodegradation dieser Partikel kann es zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und damit zu einer potentiellen Schädigung der DNA der Zielzelle kommen [34]. Zudem kann das native Tat-Peptid bei CD4-positiven Zellen über die Aktivierung des Kaspase-8-Signalweges Apoptose induzieren [62]. Wesentliches Problem der Anwendung der Tat-Peptid modifizierten Partikel in der Klinik sind die Sicherheitsaspekte – lediglich für die Klärung von Implantationsmechanismen im Rahmen der Grundlagenforschung können derartig modifizierte Partikel verwendet werden [63]. Um eine sichere Anwendung partikelmarkierter Zellen bei Menschen zu ermöglichen, müssen jedoch alternative Methoden entwickelt werden.

Für die Detektion einzelner transplantierte Zellen mittels MRT wird die Vergrößerung des Eisenkerns der Partikel und dadurch die vielfache Vergrößerung der Relaxivität durch den so genannten „*bloomig artefact*“ diskutiert. Im Vergleich zu nanometerskaligen Partikeln haben die MPIO einen größeren Eisenkern und dadurch einen größeren Effekt im Magnetfeld und eine deutlich bessere Hypointensität in T2*-gewichteten MRT-Untersuchungen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* [42-47]. Bei der Verwendung solcher Partikel ist keine weitere Modifikation ihrer Oberfläche erforderlich, da die niedrige Konzentration funktionaler Carboxylgruppen an der Partikeloberfläche die Inkorporation erleichtern. Dabei kann man auf die Verwendung von Antikörpern verzichten, welche für ein universales Markierungsprotokoll der Zellen nicht geeignet sind. Auch die Anwendung von Transfektionsmitteln wie Protamin-Sulfat ist zur Zellmarkierung mittels MPIO nicht erforderlich. Die *in vivo* Detektion einzelner transplantierte Zellen nach der Markierung mit kommerziell erhältlichen MPIO wurde bereits in mehreren Kleintiermodellen beschrieben und erste Erfahrungen zeigten keine negativen Effekte dieser Partikel auf die Zellen [44].

In der vorliegenden Studie konnten einzelne primäre humane Hepatozyten nach einer Inkubation mit MPIO mittels klinischer MRT *in vitro* nachgewiesen werden. Die nötige Beladung der Zellen für die Detektion bei 3,0 Tesla wurde in Vorversuchen untersucht. So wurde nachgewiesen, dass humane Hepatozyten circa 18 Partikel enthalten müssen, um mit einem niedrigen Signal-zu-Rausch-Verhältnis auf einem Agorosehintergrund in T2* detektiert werden zu können. Diese MRT-Aufnahmen der MPIO-markierten Zellen zeigten deutliche Signalauslöschungen, welche nach der Markierung der Hepatozyten mit Tat Peptid-modifizierten SPIO nicht erreicht werden konnten. Diese Daten sind mit den Daten anderer publizierter Studien über Detektion der MPIO-markierten Zellen vergleichbar [42, 43]. In der vorliegenden Studie konnte die zur Markierung primärer humaner Hepatozyten erforderliche Inkubationszeit für eine optimale Beladung mit MPIO von 18 Stunden auf vier Stunden mit einer Inkubationskonzentration von 30 Partikel/Zelle verringert werden. Dies erfolgte durch Reduktion der Kulturphase vor der Inkubation von 24 Stunden auf 18 Stunden. Somit wurde ein Effekt der Präkulturphase auf die Partikelinkorporation festgestellt. Die Ursache dieser interessanten Beobachtung kann anhand der begrenzten Daten nicht erklärt werden, da die genaueren Mechanismen der Inkorporation der MPIO nicht aufgeklärt sind. Eine weitere Reduktion der Adhäsionszeit für primäre humane Hepatozyten in der standardisierten, auf Kollagen A basierten Zellkultur ist nach unseren Erfahrungen nicht möglich.

In der vorliegenden Studie wurden kommerziell verfügbare MPIO mit einem grossen Eisenkern-zu-Gesamtdurchmesser-Verhältnis (42,5% Magnetit) genutzt, um mit einer möglichst niedrigen Anzahl an Partikel eine bessere Detektion mittels MRT zu realisieren. Die Vorversuche zeigten, dass die Partikelinkorporation und die Markierungseffizienz mit zunehmender Inkubationsdauer ein Plateau erreichen. Eine Erhöhung der Inkubationskonzentration zeigte, dass eine leicht verbesserte Inkorporation möglich sein kann. Neben einer Entwicklung der MRT-Technologie und der MRT-Messprotokolle könnte auch durch Vergrößerung des Magnetitanteils der eingesetzten Partikel die Detektierbarkeit der MPIO-markierten Zellen optimiert werden. Die Erfahrungen mit solchen Partikel im Rahmen der Zellbiologie sind derzeit noch begrenzt und das Verhalten der markierten Zellen im Magnetfeld im Sinne des Signal-zu-Rauschen-Verhältnisses, sowie ihre Detektierbarkeit im Organismus und die generelle Sicherheit der Methode sind noch zu klären.

Eine weitere Limitierung der MPIO für die klinische Anwendung ist, dass die derzeit kommerziell verfügbaren Partikel in ihrer Größe und ihrem Eisengehalt variieren. Die Idee des „*cell tracking*“ basiert darauf, dass man einen Anteil von zu transplantierenden Zellen markiert und darüber Aussagen über alle zu applizierenden Zellen trifft. Dies erfordert eine homogene Markierung aller Zellen unter gleichen Bedingungen mit monodispersen Partikel.

Die Quantifizierung der Partikelinkorporation der MPIO erfolgte in dieser Studie wie im Großteil der bislang publizierten Studien zur MPIO-Markierung durch morphometrische Untersuchungen mittels Lichtmikroskopie. Diese Methode ist in der klinischen Anwendung nicht durchführbar, da sie zeitaufwändig ist und retrospektive Angaben über die Partikelbeladung ermöglicht. Eine spektrophotometrische Methode zur Quantifizierung des Eisengalts der MPIO und der markierten Zellen wurde mittlerweile etabliert: Die Polymerkapsel der Partikel wird dabei durch Pyrolyse zerstört. Die hohe Eisenmenge MPIO-markierter Zellproben kann mittels „*High Resolution Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry*“ bei einer Wellenlänge von 305,754 nm gemessen werden. So kann ohne aufwändige Vorbereitungsschritte der Proben anhand der Eisenkonzentration der Partikelgehalt der Zellen quantifiziert werden [64].

Bei einer MRT Untersuchung nimmt die Sensivität zu, je näher sich die zu untersuchenden Bereiche zur Oberflächenspule befinden. Aus diesem Grunde wurde in dieser Studie eine Oberflächenspule mit einem Durchmesser von zwei Zentimetern verwendet. Das ermöglicht eine bessere Detektion der Zellen. Dies könnte bei der Übertragung des Verfahrens in die *in vivo*-Anwendung problematisch sein, da man in dem Fall einen größeren Abstand zur Spule hat. Ein weiteres Problem ist, dass der lebende Organismus keinen homogenen Hintergrund für eine MRT-Untersuchung darstellt. Artefakte bei einer T2*-gewichteten *in vivo* Untersuchung, wie zum Beispiel Hämatoeme, Tumore, Luft und andere Strukturen mit einer hohen Eisenkonzentration, können zu Missinterpretationen der hypointensen Bereiche führen, wenn die Zellen mit negativen Kontrastmitteln wie superparamagnetischen Eisenoxidpartikel markiert sind. In einer 2008 publizierten Studie konnten *Gilad et al.* Mangansoxid-markierte (Positives Kontrastmittel) Gliomazellen in einem Rattenmodell mittels MRT bei einer verwendeten Magnetfeldstärke von 9 Tesla nachweisen [29]. Diese Methode kann für eine Doppelkontrast-Untersuchung in Kombination mit negativen Kontrastmitteln verwendet werden. Sie ist aber als alleinige Markierung für die Darstellung einzelner Zellen nicht geeignet, da die Signalstärke der positiven Kontrastmittel niedriger ist als die

Signalstärke der MPIO in einem Magnetfeld. Für die Validierung der MRT-Ergebnisse bei einem Verdacht auf falsch positive Hypointensität sollten bei klinischen Anwendungen weitere Untersuchungen mittels Computertomographie durchgeführt werden.

Der Mechanismus der MPIO-Inkorporation in die Zellen wurde bis jetzt nicht ausreichend untersucht [48]. Dies ist jedoch für die Optimierung des Markierungsprozess der Zellen mittels MPIO relevant. Bedeutend ist hierbei die Konzentration der Carboxylgruppen an der Partikeloberfläche. Auch das Zytoplasma-zu-Nukleus-Verhältnis der markierten Zellen wurde als relevant für den Erfolg der Markierung diskutiert [59]. Die genauen physikalischen Voraussetzungen für die Interaktion der Partikel mit den Zellen und die dreidimensionale Anordnung der Partikel in der Kultur bzw. in den Zellen sollte für die Markierung in unterschiedlichen Kulturverfahren untersucht werden. Das in dieser Studie beschriebene Protokoll beruht auf einer Markierung der primären humanen Hepatozyten in einem Adhäsionszustand, da die Hepatozyten metabolisch aktiv sind. Dieses Protokoll erfordert eine relativ lange Vorbereitungsphase, um markierte Zellen für die Transplantation bereitstellen zu können. Durch Etablierung eines Verfahrens, welches die Markierung der Leberzellen in Suspension ermöglicht, könnte dieses Protokoll zeitlich um bis zu 75 % verkürzt werden. Dabei könnte der Verlust an Zellen bei der Vorbereitung, wie beim Aussähen, Waschen und Resuspendieren minimiert werden. Für die Markierung der Zellen in Suspension könnte das von der amerikanischen Bundesbehörde für Luft- und Raumfahrt (*National Aeronautics and Space Administration, NASA*) entwickelte Bioreaktorsystem RCCS (*Rotary Cell Culture System, Synthecon, Houston, TX, USA*) dienen. Dieses System beruht darauf, dass die Zellen vorübergehend in Schwebelagerung in Suspension gehalten werden. Durch die ständige Bewegung des Bioreaktors werden die Zellen optimal versorgt. Studien zur Nutzung dieses Verfahrens werden in unserer Arbeitsgruppe bereits durchgeführt. Die Bedingungen für eine Markierung primärer humaner Hepatozyten in Suspension unterscheiden sich von den Bedingungen für denselben Zweck in Adhäsion (*Kammer et al.*, unveröffentlichte Ergebnisse). Bei der Interaktion zwischen Zellen und Partikel in der dreidimensionalen Struktur spielen weitere physikalische Eigenschaften wie zum Beispiel die Dichte der Zellen und der Partikel, oder die auf die Zellen und Partikel wirkenden Scherkräfte eine große Rolle. Wie in vorherigen Studien mit humanen Zellen wurde auch in dieser Studie eine Kombination von Trypsin und EDTA verwendet, um die auf der Kulturplatte adhären-

Zellen zu resuspendieren. Dabei konnte die Hälfte der am Anfang ausgesäten lebenden Zellen gewonnen werden. Es wurden keine negativen Effekte dieser Behandlung auf den Partikelgehalt der Zellen beobachtet. Der hohe Zellverlust bei diesem Verfahren ist unter Anderem auch durch den Teil der Zellen zu erklären, der aufgrund der Ischämie-Reperfusion und Kollagenaseperfusion während der Isolierung bereits vorgeschädigt wurde und gar nicht erst adhärierte [65]. *Katenz et al.* beschrieben, dass nur 77,2% der initial ausgesäten primären humanen Hepatozyten nach 18-20 Stunden adhären [66]. Darüber hinaus waren durch die vorgeschädigten und gestorbenen Zellen Reaktive Sauerstoffspezies und andere proapoptotische Signale im Kulturmedium entstanden [65]. Dieser Effekt war am ersten Kulturtag anhand der AST- und LDH-Konzentrationen im Kulturmedium zu sehen, da diese Zellen initial mit den intakten lebenden Zellen ausgesät wurden und erst nach dem ersten Mediumwechsel - nach dem ersten Tag der Kultur - beseitigt wurden. Trotz dieses Verlustes an lebenden Zellen und der Resistenz eines Teils der angewachsenen Zellen gegen die enzymatische Resuspendierung, konnte die Hälfte der markierten und nichtmarkierten Zellen wieder ausgesät werden. Ähnliche Beobachtung wurde von *Grossmann et al.* beschrieben. Sie konnten nach einer dreitägigen Kultur 33 % der initial ausgesäten primären humanen Hepatozyten wieder resuspendieren [49]. Dieser begrenzte Erfolg im Vergleich zu dem Resuspendierungserfolg in der vorliegenden Studie könnte durch die verlängerte Kultur erklärt werden, da primäre humanen Hepatozyten in einfachen Monolayerkulturen mit der Zeit vor allem durch die ständige Manipulation geschädigt werden und sterben [65]. Um die Effekte der MPIO-Markierung sowie der Resuspendierung auf kultivierte primäre humane Hepatozyten zu untersuchen, wurden die Zellen nach diesen Behandlungen rekultiviert und Standardkulturparameter sowie ihr Partikelgehalt evaluiert. Basierend auf eigenen Erfahrungen und den Erfahrungen anderer Autoren wurde die zweidimensionale Kultur der primären humanen Hepatozyten auf insgesamt sechs Tage begrenzt, da die primären humanen Hepatozyten ihre spezifischen Eigenschaften nach fünf- bis siebentägiger Kultur in diesem Modell verlieren [66, 67]. Die Enzyme LDH und AST sind die wichtigen Zellschädigungsparameter, welche sich hauptsächlich im Zytoplasma der Hepatozyten, AST auch teilweise in den Mitochondrien, befinden [68, 69]. Die AST-Freisetzung der resuspendierten Zellen am zweiten Tag zeigten signifikante Unterschiede im Vergleich zu den konstant in Adhäsion verbliebenen Zellen. Nach dem ersten Mediumwechsel, bei welchem die durch Resuspension gestorbenen oder geschädigten Zellen entfernt wurden, konnte

keinen Unterschied der AST-Freisetzung zwischen den Gruppen bis zum Ende der Kultur beobachtet werden. Die LDH-Werte der resuspendierten Gruppen erreichten ebenso am zweiten Tag die Werte der Kontrollgruppen und blieben auf dem gleichen Niveau bis zum Ende der Kultur. Interessanterweise konnte allerdings ein Anstieg in der Gruppe resuspendierter Zellen von Tag fünf auf Tag sechs beobachtet werden. Die Harnstoffkonzentrationen der resuspendierten Gruppen waren am ersten Tag nach der Trypsinbehandlung niedriger als die Werte der Adhäsionsgruppen. Sie erreichten nach dem ersten Mediumwechsel das Niveau der Kontrollgruppen. Die Albuminproduktion der Zellen nahm in allen Gruppen mit der Zeit zu. Es konnte keinen Unterschied zwischen den Gruppen ab dem dritten Tag bis zum Ende der Kultur bezüglich der untersuchten Syntheseparameter nachgewiesen werden. Die spektrophotometrisch ermittelte mitochondriale Aktivität der markierten Zellen, welche während der gesamten Kultur in Adhäsion blieben, zeigte einen nicht signifikanten Unterschied gegenüber den nicht markierten Zellen. Eine mögliche Erklärung für diese bereits in der Literatur beschriebene Beobachtung [30, 70] ist, dass das Eisen der Partikel in der Kultur die Absorption während der spektrophotometrischen Messung erhöht. Die markierten, resuspendierten Zellen zeigten aber im Gegensatz dazu eine nicht signifikant niedrige Absorption im Vergleich zu den Kontrollen. Nach der MPIO-Markierung der Zellen wurde die Kultur dreimal mit frischem PBS gewaschen. Der Unterschied zwischen den resuspendierten und nicht resuspendierten Zellen wurde vermutlich von zurück gebliebenen MPIO verursacht, welche durch die einfachen Waschschritten und den täglichen Mediumwechsel in den 96-Loch-Platten nicht beseitigt werden konnten und an den Aussenmembranen der Zellen klebten. An beiden Messpunkten des MTT-Tests waren die gemessenen Absorptionen der resuspendierten Zellen größer als die Werte der Kontrollen, was darauf hinweist, dass die Resuspension die Aktivität der Zellen stimuliert. Dieser Befund sollte über einen Verlauf mit täglichen MTT-Messungen und mit weiteren Untersuchungen wie zum Beispiel hepatozytenspezifischer Phase I und Phase II Enzymaktivitäten geprüft werden. Der Proteingehalt aller Gruppen war am Ende der Kultur nicht signifikant unterschiedlich, was darauf hinweist, dass die Anzahl der angewachsenen Zellen am Ende der Kultur in allen Gruppen identisch war. Anhand dieser vorliegenden Ergebnisse konnte kein negativer Effekt durch die Markierung und Resuspendierung auf die primären humanen Hepatozyten festgestellt werden.

Wie bereits von anderen Gruppen beschrieben und in dieser Studie anhand von elektronmikroskopischen Untersuchungen gezeigt, verblieben die inkorporierten MPIO

im Zytoplasma der Zellen in einer membranösen Hülle. Aufgrund der Polymerkapsel der MPIO wurden die Partikel während der gesamten Kulturperiode nicht abgebaut [42]. Diese stabile Markierung der Zellen über die sechs Tage dauernde Kulturphase ermöglicht die Detektion der Zellen über längere Zeit. Die Beschichtung der Partikel verhindert weiterhin den oxidativen Stress und die Zytotoxizität, welche durch freies Eisen ausgelöst werden könnten. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass mittels MPIO eine langzeitige Detektion der Zellen mittels MRT möglich ist. Eine Zellteilung der markierten Zellen nach Applikation würde die Signalstärke im MRT beeinflussen, jedoch würde die Markierung der Zellen mit MPIO einen längeren Untersuchungszeitraum ermöglichen als deren Markierung mit SPIO. Die Stabilität der MPIO sowie deren möglicher Abbauprozess sollen vor einer klinischen Anwendung anhand von weiteren Untersuchungen zu potentiell induzierter Apoptose und Entwicklung von Reaktiven Sauerstoffspezies sowie durch die Bestimmung von Parametern des Eisenstoffwechsels, wie quantitative Bestimmung der Transferrinrezeptoren und des Ferritinspiegels *in vitro* geprüft werden. Es wurde gezeigt, dass klinisch zugelassenen SPIO in kultivierten Zellen abgebaut werden und dadurch den Eisenhaushalt des Organismus beeinflussen können [71]. Der mögliche Abbau der MPIO würde aufgrund ihres hohen Eisengehaltes deutlich größere Effekte hervorrufen als der Abbau von SPIO. Aufgrund dessen sollen in Folgestudien Langzeiteffekte der Markierung der Hepatozyten mit modifizierten Kulturverfahren bei einer längeren Kulturdauer untersucht werden. Hierfür können Bioreaktorsysteme dienen, welche eine dreidimensionale Anordnung der Zellen *in vitro* ermöglichen. So könnte der in der Experimentellen Chirurgie der Charité entwickelte *SlideReactor* verwendet werden [72]. Mittels dieses Systems könnten die Zellen über einen längeren Zeitraum lichtmikroskopisch hinsichtlich Morphologie und Partikelgehalt untersucht werden. Anschließend könnten spezifische Untersuchungen für die Bildung Reaktiver Sauerstoffspezies und der Apoptose durchgeführt werden. Somit sollte eine Sicherung der Verwendung der MPIO mit Überprüfung der Apoptoseinduktion und der Beeinflussung des Eisenhaushaltes in präklinischen Tierstudien überprüft werden. Diese Arbeit überprüft das Konzept der Markierung und Bereitstellung der zu transplantierenden primären humanen Hepatozyten für ihre Detektion mittels klinischer MRT. Die gewonnenen Daten zeigen, dass die Darstellung primärer humaner Hepatozyten mittels klinischer MRT nach ihrer Markierung mit superparamagnetischen Partikel *in vitro* möglich ist. Die Markierung solcher Zellen mit unmodifizierten

mikrometerskaligen und kommerziell erhältlichen Partikel ermöglicht im Vergleich zur Markierung der Zellen mit Tat-Peptid modifizierten nanometerskaligen Partikel eine verbesserte Detektion sogar auf Einzelzellniveau. Das entwickelte Markierungs- und Resuspendierungsprotokoll ermöglicht eine Bereitstellung primärer humaner Hepatozyten für die Transplantation bei ausreichender Anzahl an lebenden Zellen, stabiler Markierung und nicht eingeschränktem Zellmetabolismus. Momentan wird in einer präklinischen Studie, an der Charité in einem Großtier-Modell die Detektierbarkeit und sowie die klinischen Effekte der MPIO-markierten transplantierten Hepatozyten untersucht. Weitere *in vitro* und *in vivo* Versuche sollten zur Klärung des Markierungsprozesses sowie zur Detektierbarkeit der Zellen und möglicher Langzeiteffekte durchgeführt werden. Durch die laufende Studie sollen der dynamische Prozess der Zelltransplantation im Empfänger sowie der mögliche Einfluß der applizierten Zellen auf den Gesamtorganismus und eine mögliche Immunreaktion gegen das Transplantat untersucht werden. Darüber hinaus könnte dieses Konzept als Basis für klinische Studien zur Zelltransplantation MPIO-markierter Zellen dienen und sowohl die Grundlagenforschung als auch die Qualitätssicherung im Rahmen der klinischen Zelltransplantation ermöglichen.

5. Zusammenfassung

Die Transplantation von Leberzellen wird als alternatives Therapieverfahren zur Lebertransplantation diskutiert. Trotz zahlreicher Studien können der Verbleib und die Interaktion der Leberzellen im Empfänger während und nach der Transplantation nicht exakt beschrieben werden. Dies spielt jedoch eine wichtige Rolle für die Optimierung dieses Verfahrens sowie für die Überwachung der klinischen Applikationen. Die Magnetresonanztomographie (MRT) stellt eine nicht-invasive Methode zur Detektion einzelner zuvor mit Eisenoxidpartikel markierter Zellen dar. Die hohe Auflösung heutiger Geräte, sowie die Verfügbarkeit verschiedener spezifischer Kontrastmittel ermöglichen eine detaillierte Lokalisierung von einzelnen Zellen sowohl im Körper als auch innerhalb einzelner Organe.

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurden Versuche zur *in vitro* Detektion primärer humaner Hepatozyten mittels klinischer MRT durchgeführt. Des Weiteren wurde eine Methode zur Bereitstellung zuvor markierter Hepatozyten für eine Transplantation untersucht. Die aus Resektaten gewonnenen Zellen wurden kultiviert, markiert und mittels enzymatischer Resuspendierung wieder Verfügbar gemacht. Die Effekte der einzelnen Schritte wurden anhand standardisierter Kulturparameter *in vitro* untersucht.

Nach einstündiger Inkubation der Hepatozyten mit Tat-Peptid-modifizierten „superparamagnetischen Eisenoxidpartikel“ (SPIO), sowie vierstündiger Inkubation mit „micron sized iron oxide particles“ (MPIO), in Adhäsion wurde die Partikelinkorporation durch mikroskopische Untersuchungsmethoden nachgewiesen. Die Untersuchungen markierter Zellen zeigten typische Signalauslösungen in T2*-gewichteten MRT-Aufnahmen, wobei die MPIO-markierten Zellen deutlichere Signalauslösungen zeigten. Vitalität und Integrität der humanen Hepatozyten wurden durch die MPIO-Markierung und Resuspendierung nicht beeinträchtigt und die Markierung blieb während der gesamten Kulturperiode stabil.

Die vorliegende Arbeit beschreibt erstmals eine Methode zur Markierung primärer humaner Hepatozyten für ihre Detektion mittels klinischer MRT. Diese Methode stellt ein neuartiges Verfahren dar, welches sowohl für die Grundlagenforschung als auch für die Qualitätssicherung in bereits durchgeführten klinischen Anwendungen wichtige Erkenntnisse liefert und daher großes Potential hat.

6. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------------------------|---|
| Abb. | Abbildung |
| AST | Aspartataminotransferase |
| BAL | <i>Bioartificial Liver</i> |
| bzw. | Beziehungsweise |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | Kalziumchlorid Dihydrat |
| CDN | Kanada |
| CK18 | Zytokeratin18 |
| Cy3 | Indocarbocyanin |
| D | Deutschland |
| DAPI | 4',6 -diamidino-2-phenylindole |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGTA | Ethylenglycol bis- [2-aminoethylether]-N,N,N',N'-tetraessigsäure) |
| ELAD | <i>Extracorporeal Liver Assist Device</i> |
| FCS | Fötale Kälberserum |
| FITC | Fluorescein Isothiocyanate |
| FR | Frankreich |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| KCl | Kaliumchlorid |
| LDH | Laktatdehydrogenase |
| MELS | <i>Medular Extracorporeal Liver System</i> |
| MPIO | Mikrometerskalige Eisenoxidpartikel |
| MTT | 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NL | Niederlande |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| S | Schweden |
| s. | Siehe |
| SEM | Standardfehler des Mittelwertes |
| SPIO | Superparamagnetische Eisenoxidpartikel |
| USA | Vereinigte Staaten von Amerika |
| UK | Vereinigtes Königreich |

7. Literaturverzeichnis

1. World Health Organization Department of Measurement and Health Information, (Dezember 2004, <http://www.who.int/en/>, am 20.01.2009).
2. Orlewska E. The cost-effectiveness of alternative therapeutic strategies for the management of chronic hepatitis B in Poland. *Value Health*. 2002;5:405-21.
3. Burroughs A, McNamara D. Liver disease in Europe. *Aliment Pharmacol Ther*. 2003;18:54-9.
4. Hughes RD, Mitry RR, Dhawan A. Hepatocyte transplantation for metabolic liver disease: UK experience. *J R Soc Med*. 2005;98:341-5.
5. Ostapowicz G, Fontana RJ, Schiødt FV, et al. U.S. Acute Liver Failure Study Group. Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. *Ann Intern Med*. 2002;137:947-54.
6. Braun F, Platz KP, Müller AR. Lebertransplantation. In: Sievert JR, Rothmund M, Schumpelick V (eds). *Praxis der Viszeralchirurgie*. 2. Auflage. Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2006:668.
7. Jahresbericht der Stiftung „*Eurotransplant*“ 2007. (<http://www.eurotransplant.nl/>, am 20.01.2009).
8. van der Hilst CS, Ijtsma AJ, Slooff MJ, Tenvergert EM. Cost of liver transplantation: a systematic review and meta-analysis comparing the United States with other OECD countries. *Med Care Res Rev*. 2009;66:3-22.
9. McKenzie TJ, Lillegard JB, Nyberg SL. Artificial and bioartificial liver support. *Semin Liver Dis*. 2008;28:210-7.
10. Liu JP, Glud LL, Als-Nielsen B, Glud C. Artificial and bioartificial support systems for liver failure. *Cochrane Database Syst Rev*. 2004;1:CD003628.

11. Dhawan A, Mitry RR, Hughes RD. Hepatocyte transplantation for liver-based metabolic disorders. *J Inher Metab Dis*. 2006;29:431-5.
12. Bilir BM, Guinette D, Karrer F, et al. Hepatocyte transplantation in acute liver failure. *Liver Transpl*. 2000;6:32-40.
13. Nussler A, Konig S, Ott M, et al. Present status and perspectives of cell-based therapies for liver diseases. *J Hepatol*. 2006;45:144-59.
14. Baccarani U, Sanna A, Cariani A, et al. Isolation of human hepatocytes from livers rejected for liver transplantation on a national basis: results of a 2-year experience. *Liver Transpl*. 2003;9: 506-12.
15. Hughes RD, Mitry RR, Dhawan A, et al. Isolation of hepatocytes from livers from non-heart-beating donors for cell transplantation. *Liver Transpl*. 2006;12:713-7.
16. Terry C, Hughes RD. An optimised method for cryopreservation of human hepatocytes. *Methods Mol Biol*. 2009;481:25-34.
17. Kawashita Y, Guha C, Yamanouchi K, Ito Y, Kamohara Y, Kanematsu T. Liver repopulation: a new concept of hepatocyte transplantation. *Surg Today*. 2005;35:705-10.
18. Nguyen TH, Ferry N. Liver gene therapy: advances and hurdles. *Gene Ther*. 2004;11:76-84.
19. Fisher RA, Strom SC. Human hepatocyte transplantation: worldwide results. *Transplantation*. 2006;82:441-9.
20. Stéphenne X, Najimi M, Sibille C, Nassogne MC, Smets F, Sokal EM. Sustained engraftment and tissue enzyme activity after liver cell transplantation for argininosuccinate lyase deficiency. *Gastroenterology*. 2006;130:1317-23.

21. Puppi J, Tan N, Mitry RR, et al. Hepatocyte transplantation followed by auxiliary liver transplantation--a novel treatment for ornithine transcarbamylase deficiency. *Am J Transplant*. 2008;8:452-7.
22. Allen KJ, Mifsud NA, Williamson R, Bertolino P, Hardikar W. Cell-mediated rejection results in allograft loss after liver cell transplantation. *Liver Transpl*. 2008;14:688-94.
23. Meyburg J, Hoerster F, Weitz J, Hoffmann GF, Schmidt J. Use of the middle colic vein for liver cell transplantation in infants and small children. *Transplant Proc*. 2008;40:936-7.
24. Puppi J, Dhawan A. Human hepatocyte transplantation overview. *Methods Mol Biol*. 2009;481:1-16.
25. Mito M, Kusano M, Kawaura Y. Hepatocyte transplantation in man. *Transplant Proc*. 1992;24:3052-3.
26. Bohnen NI, Charron M, Reyes J, et al. Use of indium-111-labeled hepatocytes to determine the biodistribution of transplanted hepatocytes through portal vein infusion. *Clin Nucl Med*. 2000;25:447-50.
27. Sauer R, Müller RG. Strahlenphysik. In: Kaufmann GW, Moser E, Sauer R (eds). *Radiologie*. Munich, Jena: Elsevier, Urban&Fischer; 2006:9-32.
28. Arbab AS, Liu W, Frank JA. Cellular magnetic resonance imaging: current status and future prospects. *Expert Rev Med Devices*. 2006;3:427-39.
29. Gilad AA, Walczak P, McMahon MT, et al. MR tracking of transplanted cells with "positive contrast" using manganese oxide nanoparticles. *Magn Reson Med*. 2008;60:1-7.
30. Grimm J, Kircher MF, Weissleder R. Cell tracking. Principles and applications. *Radiologie*. 2007;47:25-33.

31. Ittrich H, Lange C, Dahnke H, Zander AR, Adam G, Nolte-Ernsting C. Labeling of mesenchymal stem cells with different superparamagnetic particles of iron oxide and detectability with MRI at 3T. *Rofo*. 2005;177:1151-63.
32. Dodd SJ, Williams M, Suhan JP, Williams DS, Koretsky AP, Ho C. Detection of single mammalian cells by high-resolution magnetic resonance imaging. *Biophys J*. 1999;76:103-9.
33. de Laquintane BD, Dousset V, Solanilla A, Petry KG, Ripoche J. Iron particle labeling of haematopoietic progenitor cells: an in vitro study. *Biosci Rep*. 2002;22:549-54.
34. Frank JA, Miller BR, Arbab AS, et al. Clinically applicable labeling of mammalian and stem cells by combining superparamagnetic iron oxides and transfection agents. *Radiology*. 2003;228:480-7.
35. Daldrup-Link HE, Rudelius M, Oostendorp RA, et al. Targeting of hematopoietic progenitor cells with MR contrast agents. *Radiology*. 2003;228:760-7.
36. Ahrens ET, Feili-Hariri M, Xu H, Genove G, Morel PA. Receptor-mediated endocytosis of iron-oxide particles provides efficient labeling of dendritic cells for in vivo MR imaging. *Magn Reson Med*. 2003;49:1006-13.
37. Arbab AS, Bashaw LA, Miller BR, Jordan EK, Bulte JW, Frank JA. Intracytoplasmic tagging of cells with ferumoxides and transfection agent for cellular magnetic resonance imaging after cell transplantation: methods and techniques. *Transplantation*. 2003;76:1123-30.
38. Himes N, Min JY, Lee R, et al. In vivo MRI of embryonic stem cells in a mouse model of myocardial infarction. *Magn Reson Med*. 2004;52:1214-9.
39. 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;17:513-7

40. Josephson L, Tung CH, Moore A, Weissleder R. High-efficiency intracellular magnetic labeling with novel superparamagnetic-Tat peptide conjugates. *Bioconjug Chem*. 1999;10:186-91.
41. Garden OA, Reynolds PR, Yates J, et al. A rapid method for labelling CD4+ T cells with ultrasmall paramagnetic iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging that preserves proliferative, regulatory and migratory behaviour in vitro. *J Immunol Methods*. 2006;314:123-33.
42. Bernas LM, Foster PJ, Rutt BK. Magnetic resonance imaging of in vitro glioma cell invasion. *J Neurosurg*. 2007;106:306-13.
43. Shapiro EM, Skrtic S, Koretsky AP. Sizing it up: cellular MRI using micron-sized iron oxide particles. *Magn Reson Med*. 2005;53:329-38.
44. 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.
45. Shapiro EM, Sharer K, Skrtic S, Koretsky AP. In vivo detection of single cells by MRI. *Magn Reson Med*. 2006;55:242-9.
46. McAteer MA, Schneider JE, Ali ZA, et al. Magnetic resonance imaging of endothelial adhesion molecules in mouse atherosclerosis using dual-targeted microparticles of iron oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:77-83.
47. Wu YL, Ye Q, Foley LM, et al. In situ labeling of immune cells with iron oxide particles: an approach to detect organ rejection by cellular MRI. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:1852-7.
48. Valable S, Barbier EL, Bernaudin M, et al. In vivo MRI tracking of exogenous monocytes/macrophages targeting brain tumors in a rat model of glioma. *Neuroimage*. 2008;40:973-83.

49. Grossman M, Raper SE, Kozarsky K, et al. *Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia*. Nat Genet. 1994;6:335-41.
50. Pereira SP, McCarthy M, Ellis AJ, et al. *Auxiliary partial orthotopic liver transplantation for acute liver failure*. J Hepatol. 1997;26:1010-7.
51. Horslen SP, Fox IJ. *Hepatocyte transplantation*. Transplantation. 2004;77:1481-6.
52. De Vree JM, Ottenhoff R, Bosma PJ, Smith AJ, Aten J, Oude Elferink RP. *Correction of liver disease by hepatocyte transplantation in a mouse model of progressive familial intrahepatic cholestasis*. Gastroenterology. 2000;119:1720-30.
53. Ponder KP, Gupta S, Leland F, et al. *Mouse hepatocytes migrate to liver parenchyma and function indefinitely after intrasplenic transplantation*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88:1217-21 .
54. Fox IJ, Chowdhury JR, Kaufman SS, et al. *Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation*. N Engl J Med. 1998;338:1422-6.
55. Gewartowska M, Olszewski WL. *Hepatocyte transplantation-biology and application*. Ann Transplant. 2007;12:27-36.
56. Rajvanshi P, Kerr A, Bhargava KK, Burk RD, Gupta S. *Studies of liver repopulation using the dipeptidyl peptidase IV-deficient rat and other rodent recipients: cell size and structure relationships regulate capacity for increased transplanted hepatocyte mass in the liver lobule*. Hepatology. 1996;23:482-96.
57. Fox IJ, Chowdhury JR. *Hepatocyte transplantation*. Am J Transplant. 2004;4:7-13.
58. Landis CS, Yamanouchi K, Zhou H, et al. *Noninvasive evaluation of liver repopulation by transplanted hepatocytes using ³¹P MRS imaging in mice*. Hepatology. 2006;44:1250-8.

59. Sutton EJ, Henning TD, Pichler BJ, Bremer C, Daldrup-Link HE. Cell tracking with optical imaging. *Eur Radiol.* 2008;18:2021-32.
60. Kikkawa H, Tsukada H, Oku N. Usefulness of positron emission tomographic visualization for examination of in vivo susceptibility to metastasis. *Cancer.* 2000;89:1626-33.
61. Pinkernelle J, Teichgräber U, Neumann F, et al. Imaging of single human carcinoma cells in vitro using a clinical whole-body magnetic resonance scanner at 3.0 T. *Magn Reson Med.* 2005;53:1187-92.
62. Dodd CH, Hsu HC, Chu WJ, et al. Normal T-cell response and in vivo magnetic resonance imaging of T cells loaded with HIV transactivator-peptide-derived superparamagnetic nanoparticles. *J Immunol Methods.* 2001;256:89-105.
63. Stelter L, Pinkernelle J, Michel R, et al. Modification of aminosilanized superparamagnetic nanoparticles: feasibility of multimodal detection using 3T MRI, small animal PET and fluorescence imaging. *Mol Imaging Biol.* (in Druck befindlich).
64. Raschzok N, Billecke N, Kammer NN, et al. Quantification of Cell Labeling with Micron-Sized Iron Oxide Particles Using Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry. *Tissue Eng Part C Methods.* (in Druck befindlich).
65. Elaut G, Henkens T, Papeleu P, et al. Molecular mechanisms underlying the dedifferentiation process of isolated hepatocytes and their cultures. *Curr Drug Metab.* 2006;7:629-60.
66. Katenz E, Vondran FW, Schwartlander R, et al. Cryopreservation of primary human hepatocytes: the benefit of trehalose as an additional cryoprotective agent. *Liver Transpl.* 2007;13:38-45.
67. Vinken M, Papeleu P, Snykers S, et al. Involvement of cell junctions in hepatocyte culture functionality. *Crit Rev Toxicol.* 2006;36:299-318.

68. Thabrew MI, Gove CD, Hughes RD, McFarlane IG, Williams R. Protective effects of *Osbeckia octandra* against galactosamine and tert-butyl hydroperoxide induced hepatocyte damage. *J Ethnopharmacol.* 1995;49:69-76.
69. Rauen U, Polzar B, Stephan H, Mannherz HG, de Groot H. Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species. *FASEB J.* 1999;13:155-68.
70. Rodriguez O, Fricke S, Chien C, et al. Contrast-enhanced in vivo imaging of breast and prostate cancer cells by MRI. *Cell Cycle.* 2006;5:113-9.
71. Pawelczyk E, Arbab AS, Pandit S, Hu E, Frank JA. Expression of transferrin receptor and ferritin following ferumoxides-protamine sulfate labeling of cells: implications for cellular magnetic resonance imaging. *NMR Biomed.* 2006;19:581-92.
72. Schwartlander R, Schmid J, Brandenburg B, et al. Continuously microscopically observed and process-controlled cell culture within the SlideReactor: proof of a new concept for cell characterization. *Tissue Eng.* 2007;13:187-96.

8. Lebenslauf

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

9. Publikationsliste

Internationale Zeitschriften

- 1) **Vondran FW, Katenz E, Schwartlander R, Morgul MH, Raschzok N, Gong X, Cheng X, Kehr D, Sauer IM.** Isolation of primary human hepatocytes after partial hepatectomy– criteria for identification of the most promising liver specimen. *Artif Organs.* 2008; 32: 205-13.

- 2) ***Morgul MH, *Raschzok N, Schwartlander R, Vondran FW, Michel R, Stelter L, Pinkernelle J, Jordan A, Teichgraber U, Sauer IM.** Tracking of primary human hepatocytes with clinical MRI – initial results with Tat-peptide modified superparamagnetic iron oxide particles. *Int J Artif Organs.* 2008; 31: 252-7.

- 3) ***Raschzok N, *Morgul MH, Pinkernelle J, Vondran FW, Billecke N, Kammer NN, Pless G, Adonopoulou MK, Leist C, Stelter L, Teichgraber U, Schwartlander R, Sauer IM.** Imaging of primary human hepatocytes using micron-sized iron oxide particles and clinical magnetic resonance tomography. *J Cell Mol Med.* 2008; 12: 1384-94.

- 4) **Stelter L, Pinkernelle J, Michel R, Teichgräber U, Morgul MH, Sauer IM, Schwartländer R, Raschzok N, Denecke T, Ruf J, Koch M, Jordan A, Baeumler H, Hamm B.** Modification of aminosilanized superparamagnetic nanoparticles: feasibility of multimodal detection using 3T MRI, small animal PET and fluorescence imaging. *Mol Imaging Biol.* 2009; 7.

- 5) **Raschzok N, Billecke N, Kammer NN, Morgul MH, Adonopoulou MK, Sauer IM, Florek S, Becker-Roß H, Huang MD.** Quantification of Cell Labelling with Micron-Sized Iron Oxide Particles Using Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry. *Tissue Eng Part C Methods.* 2009;15: 681-6.

* Geteilte Erstautorenschaft

Kongressbeiträge

XXXIV. Annual Congress of the European Society for Artificial Organs
2007, Krems/Österreich

Transplantation of primary human hepatocytes – Iron oxide for labelling for cell detection via MRI
(Vortrag - Erstautor)

The SlideObserver – A new concept for the parallel operation of two SlideReactor bioreactor systems
(Vortrag – Co-Autor)

Impact of donor liver characteristic on the cell function of primary human hepatocytes
(Poster – Co-Autor)

World Congress of Regenerative Medicine
2007, Leipzig/Deutschland

Transplantation of primary human hepatocytes iron oxide, labelling for cell detection via MRI
(Vortrag – Co-Autor)

24. Jahrestagung der Deutschen
Arbeitsgemeinschaft zum Studium
der Leber
2008, Frankfurt/Deutschland

Iron oxide labelling of primary human
hepatocytes for single cell detection via MRI
(Poster - Co-Author)
Parallel operation of two SlideReactor bioreactor
systems - A tool for hypothesis driven
hepatocyte culture experiments
(Poster – Co-Autor)

54th Annual Conference of the
American Society for Artificial
Internal Organs
2008, San Francisco/USA

Iron oxide labelling of primary human
hepatocytes for cell detection via MRI
(Vortrag – Erstautor)

XXXV. Annual Congress of the
European Society for
Artificial Organs
2008, Genf/Schweiz

Micron-sized iron oxide (MPIO) labelling of
hepatocytes for cell detection by MRI
(Poster - Erstautor)
Labelling of primary human hepatocytes with
micron sized particles of iron oxide in temporary
suspension culture
(Vortrag – Co-Autor)

25. Jahrestagung der Deutschen
Arbeitsgemeinschaft zum Studium
der Leber
2009, Heidelberg/Deutschland

Quality control in transplantation of iron-oxide
particle labelled liver cells by using continuum
source atomic absorption spectrometry
(Poster - Co-Autor)

10. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei PD Dr. Igor Maximilian Sauer bedanken. Er lud mich für einen Forschungsaufenthalt aus Istanbul nach Berlin ein und inspirierte mich mit seiner Intelligenz, seinem breiten Horizont sowie seinem Schöpfergeist und Humor, sowohl im wissenschaftlichen als auch im persönlichen Leben.

Prof. Dr. Çiğdem Kayacan, Prof. Dr. Hüseyin Özbey, Prof. Dr. Orhan Bilge, Prof. Dr. Tamer Demiralp und Prof. Dr. Mert Şentürk von der Universität Istanbul sowie Frau Azize Ebru Güran von Istanbul Lisesi gilt mein spezieller Dank für die Unterstützung meiner Karriere aus der Ferne.

Ein ganz herzlicher Dank gilt meiner Betreuerin Dr. Ruth Schwartländer für die wissenschaftliche und fachliche Betreuung dieser Arbeit sowie für die Einführung in die Arbeitsmethoden. Sie stand mir kritisch und konstruktiv bei der Auswertung der Ergebnisse zur Seite, unterstützte mich hilfreich an allen Stellen dieser Studie sowie bei Publikationen und Vorträgen.

Ich danke zudem allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Sauer der Experimentellen Chirurgie der Charité, Michaela Katherina Adonopoulou, Khesraw John Karmand, Dr. Gesine Pless, Dr. Dominik Modest, Anja Zielinski, Kirsten Steinz, Dr. Gunnar Jannelt, Nora Kammer, Nils Billecke und Dr. Katharina Schmitt, die das Leben an der *Bench* für mich bunter und lebhafter machten. Hier ist insbesondere Herr Nathanael Raschzok zu nennen, mein Projektpartner, mein Deutschlehrer, mein *Organiser*, ...

Für die MRT-Messungen danke ich PD. Dr. Ulf Teichgräber und seinen Mitarbeiter von der Institut der Radiologie der Charité (Direktor: Prof. Dr. Bernd Hamm).

Darüber hinaus danke ich Frau Antje Lehman für ihre freundliche Unterstützung im Labor: Ohne sie hätte diese Studie nicht rechtzeitig fertig werden können. Ein weiterer Dank geht an die Mitarbeiter der Charité – Medizinisch-Technische Labore: Markus Eweleit, Raik Paulat für ihre schnelle Arbeit und Kreativität und natürlich an Herrn Bär für die absolut perfekten Kunstwerke.

Spezieller Dank gilt zusätzlich Mehmet Cemil Ozansü, Barış Pekiçten, Gökhan Pehlivan, Furkan Şafak, Mete Öcal und Pınar Bambul – sie alle wissen ganz genau, warum.

Mehmet Haluk Morgül

Leipzig, den 23.06.2009

11. Selbständigkeitserklärung

Ich, Mehmet Haluk Morgül, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „*Markierung primärer humaner Hepatozyten mit Eisenoxidpartikel zum Nachweis mittels Magnetresonanztomographie*“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Leipzig, den 23.08.2009