

## **Untersuchungen zur Einzelzellerwärmung durch Nanopartikel hoher Wärmeleistung im alternierenden Magnetfeld**

Die Behandlung von Tumorerkrankungen ist ein weites Forschungsfeld. Neben etablierten Methoden werden im zunehmenden Maße alternative Verfahren erprobt, unter ihnen die Behandlung mit überhöhten Temperaturen. Das Ziel der therapeutischen Hyperthermie ist, gezielt maligne Gewebe zu zerstören und umliegende gesunde Strukturen zu schonen. Ein besonderes Interesse gilt kleinen, disseminierten Metastasen, die mit gängigen Methoden kaum therapierbar sind. Aufgrund von Wärmeleitung ist es gerade bei kleinen Arealen schwer, eine selektive Temperaturerhöhung gegenüber der Umgebung zu erzielen.

Das Anliegen der vorliegenden Arbeit war es, experimentell zu klären, ob eine einzelne Zelle gegenüber ihrer Umgebung *von innen* selektiv erwärmt werden kann. Für die Erwärmung wurden magnetische Nanopartikel verwendet, die vermittelt durch alternierende Magnetfelder Wärme erzeugen. Die Partikel sollten in Tumorzellen geschleust werden und die Wärme im Innern der Zellen bereitstellen. Unter diesen Bedingungen war die kontrovers diskutierte Frage zu klären, ob sich einzelne Zellen von innen effektiver erwärmen lassen als von außen. Zu diesem Zweck sollten magnetische Nanopartikel, die eine intrazelluläre Erwärmung vermitteln können, in Zellen geschleust werden. Die Wärmeerzeugung würde anschließend durch Wechselwirkung mit hochfrequenten alternierenden Magnetfeldern erfolgen. Sowohl für die eingesetzten Nanopartikel als auch für das Magnetfeld waren Parameter zu ermitteln, die eine effektive, aber für gesundes Gewebe erträgliche Behandlung ermöglichen.

Für die Arbeit wurde ein kommerzielles und biokompatibles Ferrofluid aus Eisenoxid verwendet, welches durch magnetische Separation in vier Fraktionen aufgeteilt wurde. Die Größenverteilung der Partikel in den einzelnen Fraktionen wurde mittels Atomkraftmikroskopie eingehend untersucht. Die in den Fraktionen auftretenden Partikel unterscheiden sich deutlich in ihren physischen Eigenschaften und ermöglichten daher die Untersuchungen der Relaxationsprozesse, die für die Wärmeerzeugung im magnetischen Wechselfeld verantwortlich sind.

Der Aufbau eines in Frequenz und Amplitude variablen Magnetfeldgenerators bildete die Grundlage für kalorimetrische Bestimmungen der Wärmeleistung in Abhängigkeit von Partikelgröße, Frequenz und Feldstärke. Zur Erwärmung trugen merklich nur zwei der vier Fraktionen bei, welche aggregierte Partikel mit Durchmessern  $> 15$  nm enthielten. Für diese wurde ein annähernd linearer Zusammenhang zwischen der Frequenz des Magnetfeldes und der Wärmeleistung der Partikel gefunden. Dabei war die Verlustleistung bei frei beweglichen Teilchen unabhängig von der Frequenz etwa zweimal so groß wie bei immobilisierten Teilchen. Dieser Befund ist im Kontext einer vermuteten brownischen Relaxation nicht plausibel. Zur Erklärung wurden Strukturbildungseffekte im Hochfrequenzfeld diskutiert, die durch Messungen der magneto-optischen Doppelbrechung unter diesen Bedingungen bekräftigt wurden. Untersuchungen zur Feldstärkeabhängigkeit der Verlustleistung ergaben unterschiedliche funktionelle Abhängigkeiten für die einzelnen Partikelspezies. Das Verhalten der größten Partikel zeigte Abweichungen von echtem Superparamagnetismus, die durch einen intermediären Zustand zu stabilem Ferromagnetismus erklärt werden können.

Aus Magnetisierungskurven bei tiefen Temperaturen wurde der Beitrag von Hystereseverlusten abgeschätzt. Diese grenzten sich in ihrem Betrag deutlich von kalorimetrisch ermittelten Verlusten ab, weshalb der Großteil der Wärmeleistung den Relaxationsverlusten, speziell dem néelschen Mechanismus zugesprochen wurde. Diese Vermutung ließ sich durch Abschätzung der Verluste aus der Partikelgrößenverteilung und

durch Vergleich mit Messungen der komplexen Suszeptibilität erhärten. Die Temperaturabhängige Magnetrelaxometrie diente als neuartige Methode der einfachen Beurteilung des Erwärmungspotentials von Partikeln in magnetischen Wechselfeldern. Zur exakten Beschreibung von Verlusten müssen allerdings Eingangsparameter wie die Verteilung und die Temperaturabhängigkeit der Anisotropieenergiedichte genau beschrieben werden.

Im Gegensatz zur kalorimetrischen Bestimmung der Wärmeleistung sind sowohl die Berechnung aus der Partikelgrößenverteilung gemäß gängigen Theorien als auch die Extrapolation der gemessenen komplexen Suszeptibilität zu hohen Feldstärken fehlerbehaftet. Die letzte bietet zusammen mit temperaturabhängigen Relaxationsmessungen jedoch den Vorteil einer schnellen Übersichtsmessung über ein großes Frequenz- bzw. Temperaturspektrum und ermöglicht damit zumindest eine halbquantitative Beschreibung des Erwärmungspotentials von Ferrofluiden.

Für die Planung einer beabsichtigten Therapie und weiterführender Studien wurde aus den Ergebnissen die Forderung abgeleitet, im limitierenden Produkt aus Feldstärke und Frequenz des Magnetfeldes einer hohen Feldstärke den Vorzug gegenüber der Frequenz zu geben.

Alle untersuchten Zelllinien nahmen die Nanopartikel unspezifisch auf, wobei das Ausmaß der Interaktion zwischen den Zelllinien variierte. Die Interaktion war auch abhängig von der Konzentration der Nanopartikel und von der chemischen Struktur der Hülle. In den Zellen wurden Eisengehalte von maximal 500 pg gemessen. Die Teilchen wurden durch Endozytose aufgenommen und in der unmittelbaren Umgebung der Zellkerne abgelagert. Farbstoffe, die zur Markierung der Partikel kovalent an deren Hüllen gebunden waren, fanden sich teilweise im Zellkern wieder. Eine Trennung der Hülle von den Partikeln in terminalen Endosomen ist sehr wahrscheinlich. Die anschließende endosomale Freisetzung ist Voraussetzung für die beobachtete Translokation der Farbstoffe in die Zellkerne.

Die thermische Empfindlichkeit der eingesetzten Tumorzellen wurde im Wasserbad untersucht. Alle Zelllinien zeigten eine hohe Thermotoleranz. Erst ab Temperaturen von 46 °C konnte eine deutliche Abnahme der Zellvitalität beobachtet werden. Etwa 10% der Zellen wurden bei Temperaturen bis 51 °C über eine Stunde nicht beeinflusst, woraus eine Zellzyklus-abhängige Schädigung abgeleitet wurde. Die Dezimalreduktionswerte in einer initialen Phase der Schädigung betragen bei 46,5 °C zwischen zehn Minuten und vier Stunden. Längere Inkubationszeiten als 30 Minuten resultierten nicht in einer gesteigerten Zytotoxizität.

Für die magnetisch ermittelte Einzelzell-Hyperthermie wurden Zellen mit einem Eisengehalt von etwa 5 pg bis 100 pg eingesetzt. An Einzelzellen mit mäßiger thermischer Empfindlichkeit konnte kein schädigender Effekt durch intrazellulär erzeugte Wärme gefunden werden, weder im Hinblick auf die Vitalität noch zellmorphologische Veränderungen. Als Ursache der fehlenden Effekte können die insgesamt mäßige zelluläre Beladung mit magnetischem Material und die geringe thermische Empfindlichkeit der eingesetzten Zellen herangezogen werden. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass die intrazelluläre Erwärmung gegenüber der Erwärmung von außen keinen Vorteil hinsichtlich der Wärmeableitung bietet. Die Frage nach einer möglichen Einzelzell-Hyperthermie muss daher momentan negativ bewertet werden. Aufgrund des enormen Potentials in der Therapie metastasierender Tumorerkrankungen sollte das Konzept unter zukünftig optimaleren Bedingungen erneut überprüft werden.