

Charakterisierung magnetischer Nanopartikel und Untersuchungen zu biologischen Anwendungen

Das Ziel der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen war es, ein auf Wasserbasis vorliegendes bioabbaubares Ferrofluid für pharmazeutische Anwendungen näher zu charakterisieren. Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf den Eigenschaften der einzelnen Partikel. Ein wesentliches Kriterium dafür war die Kenntnis der Größenverteilung der magnetischen Nanopartikel im Ferrofluid. Ein Ziel war die mögliche Einengung dieser Verteilung und damit die Erhöhung der Ausbeute an Relaxationssignal bei der magnetrelaxometrischen Anwendung der Partikel sein.

Aus diesem Grunde wurde versucht das Ferrofluid zu fraktionieren, wobei sowohl dem Magnetismus als auch dem Teilchenvolumen Rechnung getragen wurde. Mit verschiedenen Elutionsmitteln wurden die besten Separationsbedingungen für eine magnetische Trennung mit Hilfe eines Elektromagneten und die Größenausschlusschromatographie gesucht. Zur Charakterisierung der Fraktionen wurden Verfahren wie Photonenkorrelationsspektroskopie, Rasterkraftmikroskopie, Elektronenmikroskopie, magneto-optische Relaxation (MORFF) und Magnetrelaxometrie (MRX) genutzt.

Die Magnetrelaxometrie erfasst prinzipiell nur Partikel, die innerhalb des zeitlichen Messfensters des Messgerätes relaxieren. Dieses Messfenster umfasst für das verwendete Messgerät und die vorliegenden magnetischen Nanopartikel einen anhand theoretischer Abschätzungen berechneten Kerndurchmesser zwischen 18 und 22 nm. Mit den Fraktionierungen gelang es, diese theoretisch angenommenen Partikelgrößenbereich im Wesentlichen zu bestätigen.

Im Gegensatz zur magnetischen Separation, die die Partikelsuspension nach den magnetischen Momenten der enthaltenen Teilchen trennt, separiert die Größenausschlusschromatographie nach dem Teilchenvolumen. Die magnetische Separation erwies sich dabei als das bessere Verfahren um Partikel zu trennen bzw. die für die Magnetrelaxation besten Signalgeber herauszufiltern. Sie ist außerdem einfacher zu handhaben und der Zeitaufwand für die verwendeten Partikelmengen geringer.

Zusätzlich wurde durch dieses Verfahren nichtmagnetisches Material abgetrennt. Hinzu kommt, dass es über den Elektromagneten problemlos möglich ist, durch Festlegung einer definierten Feldstärke eine bestimmte Fraktion abzutrennen. Diese Möglichkeit ist bei der chromatographischen Separation nicht gegeben. Hier muss die gesamte Fraktionierung durchlaufen werden.

Durch Separationen war es möglich, die breite Teilchengrößenverteilung der Ausgangssuspension in Fraktionen mit unterschiedlichen Teilchengrößenverteilungen zu unterteilen. Fraktionen, die bei hohen Feldern eluiert wurden, zeigten im Vergleich zur Ausgangssuspension eine relativ enge Partikelverteilung um die kleinen Partikeldurchmesser. Diese Verteilung verschob sich mit schwächer werdenden Magnetfeldern hin zu größeren Partikeldurchmessern und breiteren Teilchengrößenverteilungen. Die MRX-Signale werden nur von Teilchen mit großen Kerndurchmessern erzeugt. Solche Partikel kamen in den Fraktionen, die bei hohen Feldstärken generiert wurden, nicht vor. Mit phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) als Elutionsmittel wies die Fraktion ein deutliches Signal auf, die nach dem Entfernen der Magnetsäule aus dem Elektromagneten generiert wurde. Die signalstärkste Fraktion wurde nach dem zusätzlichen Spülen der Säule mit Wasser generiert. Rasterkraft- und Elektronenmikroskopie zeigten deutlich die Anwesenheit von Aggregaten kleiner

Einzelpartikel: Sie indizierten, dass die Partikel in den Fraktionen hauptsächlich zusammengesetzte polykristalline Aggregate waren.

Die erhaltenen Fraktionen wurden in In vitro- und in In vivo-Versuchen an Ratten eingesetzt, um unterschiedliche Zellen zu markieren. Im Rahmen erster Versuche wurde untersucht, inwieweit die Verteilung und Funktion von Körperzellen, am Beispiel von mit magnetischen Nanopartikeln gekoppelten Erythrozyten, mit Hilfe der Techniken der magnetischen Separation und der magnetischen Relaxationsmessung bestimmt werden kann.

Sämtliche durchgeführten Kopplungsversuche zeigten, dass es mit Hilfe der Malapradereaktion möglich war, dextranhüllte magnetische Nanopartikel fest an Erythrozyten zu binden. Während der Tierversuche stellte sich jedoch heraus, dass die magnetisch markierten roten Blutkörperchen zu keiner Zeit ein detektierbares Messsignal in Blut der Ratten zeigten, welches darauf hätte schließen lassen, dass es möglich wäre, durch magnetische Markierung die Zirkulation der Erythrozyten im Blutkreislauf zu verfolgen.

Vielmehr wurde beobachtet, dass schon unmittelbar nach Injektion der magnetisch markierten Erythrozyten das Signal nur noch in Leber und Milz detektierbar war. Die durchgeführte äußerliche Markierung wurde offensichtlich stets sofort als fremd erkannt und die markierten Erythrozyten wurden sehr schnell phagozytiert. Außerdem zeigt sich, dass die Kopplung auf chemischem Wege nicht zwingend notwendig war. Vielmehr zeigten weitere Versuche, bei denen die Magnetpartikel mit Leukozyten bzw. in Zellen der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 nur inkubiert wurden, dass auch ohne chemische Reaktion die Zellen mit den hier benutzten DDM 128N/1030-Partikeln markierbar waren.

So konnte sowohl bei den Leukozyten als auch den Tumorzellen eine magnetische Zellseparation nach Inkubation dieser Zellen mit DDM 128N/1030 durchgeführt werden. Dies gelang unabhängig davon, ob die MNP aus der Ausgangssuspension oder den einzelnen Fraktionen stammten. Erwartungsgemäß traten jedoch Unterschiede in den Separationsraten der einzelnen Fraktionen auf.

Des Weiteren wurden spezifisch bindende magnetische Sonden auf der Basis der Biotin-Streptavidin-Bindung und von Antigen-Antikörper-Reaktionen hergestellt. Deren Bindungsfähigkeit wurde mittels Photonenkorrelationsspektroskopie gezeigt. Zusätzlich wurde in Zusammenarbeit mit der Friedrich-Schiller-Universität Jena in der Arbeitsgruppe Festkörperphysik kleiner Strukturen, ein Gerät zur Erfassung der magneto-optischen Relaxation von Ferrofluiden (MORFF) aufgebaut. Die Funktionsweise und die Nutzungsmöglichkeiten dieses Messgerätes für Bindungsreaktionen wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht und weiterentwickelt. Am Beispiel der Biotin-BSA-Reaktion konnte gezeigt werden, dass es mit Hilfe des MORFF-Messgerätes möglich ist, sehr schnell und einfach Bindungskinetiken aufzunehmen.

Christine Groß, März 2003