

**IST MILDE HYPERTHERMIE IN DER LAGE DESMOPLASIE IN
PANKREASKARZINOMEN AUFLÖSEN?
UNTERSUCHUNGEN AN EINEM *IN VITRO* MODELL**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Lena Wucherpfennig

geboren am 01.01.1992 in Göttingen

Gutachter

1. Apl. Prof. Dr. rer. biol. hum. Ingrid Hilger

**Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie,
AG Experimentelle Radiologie, Universitätsklinikum Jena**


2. Apl. Prof. Dr. rer. nat. Alexander Berndt

**Sektion Pathologie des Instituts für Rechtsmedizin, AG Extrazelluläre Matrix,
Universitätsklinikum Jena**

3. Apl. Prof. Dr. med. Joachim Böttcher

**Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie,
SRH Wald-Klinikum Gera**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 14.10.2019



„Das schönste Glück des denkenden
Menschen ist, das Erforschliche
erforscht zu haben und das
Unerforschliche zu verehren.“

Johann Wolfgang von Goethe (1749 – 1832)



Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	1
2	Zusammenfassung	3
3	Einleitung	5
3.1	Pankreaskarzinome	5
3.2	Desmoplasie.....	6
3.3	Gegenwärtige Therapiestrategien zur Auflösung der Desmoplasie.....	8
3.4	Anwendungen von Hyperthermie in der Krebstherapie	8
3.4.1	Magnetische Nanopartikel zur Erzeugung von Hyperthermie	9
3.4.2	Zelluläre und vaskuläre Auswirkungen von Hyperthermie	11
3.4.3	Effekt von Hyperthermie auf Proteine der extrazellulären Tumormatrix 13	
4	Ziele der Arbeit.....	14
5	Materialien und Methoden	16
5.1	Materialien.....	16
5.1.1	Geräte.....	16
5.1.2	Verbrauchsmaterialien	17
5.1.3	Zelllinien.....	19
5.1.4	Nanopartikel	19
5.1.5	Chemikalien.....	20
5.1.6	Puffer und Medien.....	21
5.1.7	Softwares.....	21
5.2	Methoden	22
5.2.1	Sehnenpräparation.....	22
5.2.2	Zellkultur	22
5.2.3	Charakterisierung magnetischer Eisenoxid-Nanopartikel.....	25
5.2.4	Bestimmung der Eisenmenge in Monolayern und 3D-Sphäroiden nach Inkubation mit MNPs.....	27
5.2.5	Hyperthermie.....	28
5.2.6	Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop.....	34
5.2.7	Histologie.....	38

5.2.8	Statistische Auswertung.....	41
6	Ergebnisse.....	42
6.1	Reduktion intakter fibrillärer Kollagenfasern durch milde Hyperthermie.....	42
6.2	Etablierung von dreidimensionalen desmoplastischen Pankreaskarzinom-Modellen in vitro	43
6.2.1	Generierung von PANC-1-Sphäroiden in Abhängigkeit der Zellzahl..	43
6.2.2	Generierung von PANC-1-Sphäroiden in Abhängigkeit extern zugegebener Kollagenlösung.....	44
6.2.3	Charakterisierung der gebildeten PANC-1-Sphäroide.....	45
6.2.4	Generierung von Hetero-Sphäroiden aus PANC-1- und WI-38-Zellen 47	47
6.3	Charakterisierung und Internalisierung von magnetischen Nanopartikeln	50
6.4	Effekt milder Hyperthermie auf die Integrität kollagener Fasern in den generierten Hetero-Sphäroiden	52
6.5	Effekt einer milden magnetischen Hyperthermie auf die Vitalität von Hetero-Sphäroid- und PANC-1-Sphäroid-Zellen.....	55
6.6	Effekt einer milden Brutschrank-Hyperthermie auf die Vitalität von Hetero-Sphäroid- und PANC-1-Sphäroid-Zellen.....	58
7	Diskussion.....	60
7.1	Reduktion intakter fibrillärer Kollagenfasern durch milde Hyperthermie.....	60
7.2	Geeignete 3D-Tumorzell-Modelle für die Analyse von Hyperthermie- Effekten auf desmoplastische Pankreaskarzinome	62
7.3	Nanopartikel-Internalisierung in die Sphäroide	64
7.4	Effekt milder Hyperthermie auf die Integrität kollagener Fasern in 3D- Sphäroiden aus Pankreaskarzinomzellen und Fibroblasten	65
7.5	Auswirkungen von Hyperthermie und Stromareduktion auf die Vitalität der Zellen des Tumorgewebes	67
8	Schlussfolgerungen	71
9	Literatur- und Quellenverzeichnis	73

10 Anhang	79
10.1 Abbildungsverzeichnis.....	79
10.2 Tabellenverzeichnis.....	81
10.3 Danksagung.....	82
10.4 Ehrenwörtliche Erklärung.....	83

1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celcius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µmol	Mikromol
3D	dreidimensional
7-AAD	7-Aminoactinomycin
bzw.	beziehungsweise
ca.	<i>circa</i>
CEM43	<i>cumulative equivalent minutes at 43°C</i> (kumulative Anzahl äquivalenter Minuten bei 43°C)
CLSM	Konfokales Laser Scanning Mikroskop
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAAS	Flammenatomabsorptionsspektrometrie
Fe	<i>ferrum</i> (Eisen)
g	Gramm
h	<i>hora</i> (Stunde[n])
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HCl	Salzsäure
kA	Kiloampere
l	Liter
m	Meter
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minuten
ml	Milliliter
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MNP	magnetische Nanopartikel

mV	Millivolt
MWF	Magnetwechselfeld
n	Anzahl der Versuchsdurchführungen
nm	Nanometer
P	Passage
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PdI	Polydispersitätsindex
RCF	<i>relative centrifugal force</i> (Relative Zentrifugalbeschleunigung)
ROI	<i>Region of Interest</i> (Bereich von Interesse)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde
SHG	<i>Second Harmonic Generation</i> (Frequenzverdopplung)
TCA	Trichloressigsäure
USA	<i>United States of America</i> (Vereinigte Staaten von Amerika)
V	Volt

2 Zusammenfassung

Pankreaskarzinome gehören zu den häufigsten Tumoren des Gastrointestinaltrakts und haben eine sehr ungünstige Prognose. Diese ist unter anderem auf den erhöhten Anteil an Proteinen der extrazellulären Matrix (EZM) zurückzuführen, welchen man als Desmoplasie bezeichnet. Bedingt durch die desmoplastische Stromareaktion werden in den Tumoren Gefäße komprimiert, sodass systemisch applizierte Chemotherapeutika die Tumorzellen über die Blutgefäße nur noch in unzureichender Konzentration erreichen können. Da bekannt ist, dass Wärme sowohl eine proteindenaturierende als auch eine zytotoxische Wirkung hat, kann eine Hyperthermiebehandlung eine vielversprechende Möglichkeit zur Auflösung der Desmoplasie sowie zur Reduktion von Zellen darstellen. Trotz dieser Erkenntnisse ist die Wirkung von Hyperthermie auf das Tumorstroma bisher nur unzureichend geklärt. Die vorliegende Arbeit untersucht daher, ob und bei welcher Temperatur die extrazelluläre Matrix von Pankreaskarzinomen beeinflusst wird. Zum anderen werden die Auswirkungen der Temperaturbehandlung und der potentiell veränderten Desmoplasie auf die Vitalität von Zellen innerhalb des Tumors ermittelt.

Es wurden zunächst anhand von murinen Kollagenquellen kollagendegradierende Temperaturen im Bereich der milden Hyperthermie ermittelt. Weiterhin wurden dreidimensionale (3D) Tumorzell-Sphäroide gebildet, welche die desmoplastischen Pankreaskarzinome *in vitro* nachbilden sollen. Die Sphäroide wurden einerseits aus Pankreaskarzinomzellen (PANC-1-Sphäroide), andererseits aus Pankreaskarzinomzellen und Fibroblasten (Hetero-Sphäroide) generiert. Diese wurden anschließend für eine Stunde mit den zuvor ermittelten Temperaturen behandelt. Die Temperaturen wurden sowohl durch einen Brutschrank als auch durch eisenoxidhaltige magnetische Nanopartikel generiert. Nach der Wärmeexposition wurden die Auswirkungen der Hyperthermie auf die Integrität der Kollagenfasern und das Sphäroidvolumen in Hetero-Sphäroiden mittels *Second Harmonic Generation* (SHG)-Mikroskopie analysiert. Weiterhin wurde die Wirkung stromadegradierender Temperaturen auf die Vitalität von Hetero- und PANC-1-Sphäroid-Zellen fluoreszenzmikroskopisch bestimmt.

In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Generierung von sowohl PANC-1- als auch Hetero-Sphäroiden möglich war, wobei die Hetero-Sphäroide die desmoplastische Situation aufgrund ihres erhöhten Kollagengehalts besser widerspiegeln als die generierten PANC-1-Sphäroide. Die Behandlung der Hetero-Sphäroide mit den zuvor ermittelten kollagendegradierenden Temperaturen von 40 °C und 42 °C zeigte unabhängig von der Applikationsform der Wärme eine Reduktion intakter Kollagenfasern um 90 %. Die Untersuchungen der Zellvitalitäten in den PANC-1- und Hetero-Sphäroiden nach einer Brutschrank- sowie nach magnetischer Hyperthermie ergaben eine signifikante Reduktion vitaler Zellen mit steigender Temperatur. Dabei war die Zellreduktion in den PANC-1-Sphäroiden stets ausgeprägter als in den kollagenhaltigeren Hetero-Sphäroiden. In Bezug auf die Applikationsform der Hyperthermie zeigte sich eine vorteilhafte Wirkung der magnetischen Hyperthermie im Vergleich zur Brutschrank-Hyperthermie.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine milde magnetische Hyperthermie die desmoplastische Stromareaktion reduzieren und letale Effekte in den im Pankreaskarzinom enthaltenen Zellen induzieren kann. Schlussfolgernd ist festzuhalten, dass eine magnetische Hyperthermiebehandlung möglicherweise das Therapieansprechen von Pankreaskarzinomen auf additiv verabreichte Chemotherapie durch Dekompression zuführender Blutgefäße verbessern kann.

3 Einleitung

3.1 Pankreaskarzinome

Maligne Tumorerkrankungen zählen nach wie vor zu den häufigsten Todesursachen weltweit (Siegel et al. 2016). In Deutschland erkrankt derzeit jeder zweite Mensch im Laufe seines Lebens an Krebs. In etwa jeder vierte Mann und jede fünfte Frau stirbt an einer Krebserkrankung (Kaatsch et al. 2015).

Pankreaskarzinome gehören zu den häufigsten Tumoren des Gastrointestinaltrakts und stellen bei Frauen den siebthäufigsten und bei Männern den neunthäufigsten bösartigen Tumor dar (Seufferlein et al. 2014). Die Ursachen der Erkrankung sind bisher weitestgehend ungeklärt, es konnten jedoch Risikofaktoren wie Tabakkonsum, Adipositas, langjähriger Diabetes mellitus und chronische Pankreatitiden eruiert werden (Ansari et al. 2015). Die Inzidenz der Erkrankung ist steigend (Goral 2015). Auch die Anzahl der Sterbefälle steigt stetig an, sodass das Pankreaskarzinom derzeit die vierthäufigste krebsbedingte Todesursache aller bösartigen Tumore darstellt (Philip et al. 2009). Die 5-Jahres-Überlebensrate der Erkrankten liegt bei unter 5 % und die durchschnittliche Lebenserwartung im metastasierten Stadium beträgt weniger als sechs Monate (Philip et al. 2009). Die schlechte Prognose der Pankreaskarzinome wird unter anderem durch die frühe Metastasierungstendenz der Karzinome und das Fehlen von Frühsymptomen der Erkrankung bedingt (Feig et al. 2012, Kamisawa et al. 2016). Die Karzinome werden somit lediglich in 10 bis 15 % der Erkrankungsfälle in einem Stadium diagnostiziert, in dem eine vollständige Resektion des Tumorgewebes möglich ist (Feig et al. 2012). Für Patienten, bei denen eine kurative Resektion des Tumorgewebes nicht mehr realisierbar ist, stellt die chemotherapeutische Behandlung des Karzinoms die wichtigste Therapieoption dar (Sclafani et al. 2015). Bedingt durch das ausgeprägte Tumorstroma, das die Karzinomzellen umgibt, weisen pankreatische Karzinome jedoch eine hohe intrinsische Resistenz gegenüber Chemotherapeutika auf.

3.2 Desmoplasie

Während man Tumore früher als homogene Ansammlung maligne entarteter Zellen betrachtete, weiß man heute, dass sich Tumore vielmehr aus einer Kombination von Krebszellen und Tumorstroma zusammen setzen. Als Tumorstroma definiert man die unmittelbare Mikroumgebung der entarteten Zellen, die sich aus nicht-entarteten Stromazellen wie Fibroblasten, Endothel- und Immunzellen sowie Matrixkomponenten zusammensetzt (Hanahan und Weinberg 2011). Die extrazelluläre Matrix besteht hauptsächlich aus Faser- und Adhäsionsproteinen sowie Proteoglykanen (Hamacher et al. 2004). Einige Tumore zeichnen sich durch einen stark erhöhten Anteil von Proteinen der extrazellulären Matrix aus, welchen man als Desmoplasie bezeichnet (Neesse et al. 2011).

Den Tumor mit der am stärksten ausgeprägten desmoplastischen Stromareaktion stellt das duktales Adenokarzinom des Pankreas dar. Das Tumorstroma des Pankreas besteht hauptsächlich aus dem Faserprotein Kollagen Typ 1 und kann bis zu 90 % des Gesamttumorzellvolumens ausmachen (Neesse et al. 2011, Shields et al. 2012).

Pankreatische Tumorzellen sind einerseits selbst in der Lage, Proteine der extrazellulären Matrix, wie Kollagene zu sezernieren, andererseits setzen sie verschiedene Wachstumsfaktoren, unter anderem den transformierenden Wachstumsfaktor β (TGF β) und den Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF), frei, welche wiederum Stromazellen aktivieren (Rasheed et al. 2012, Yeon et al. 2013, Lohr et al. 1994). Bei den aktivierten Stromazellen handelt es sich vorrangig um Tumor-assoziierte Fibroblasten und Pankreatische Sternzellen. Diese synthetisieren daraufhin den Großteil der Stromaproteine und tragen so hauptsächlich zur desmoplastischen Stromareaktion der Pankreaskarzinome bei (Rasheed et al. 2012). Abbildung 1 veranschaulicht die desmoplastische Stromareaktion in Pankreaskarzinomen sowie die daran beteiligten Zellen.

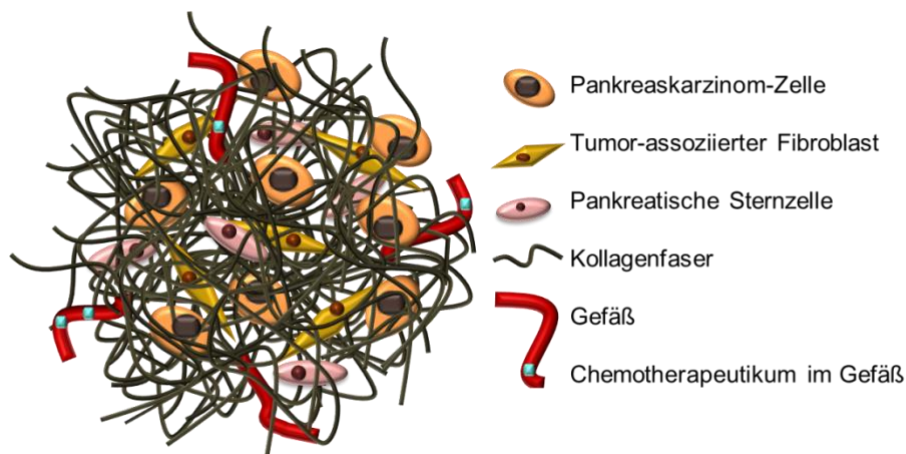


Abbildung 1: Desmoplastische Stromareaktion in Pankreaskarzinomen. Eigene Darstellung des Tumorstromas mit dem Hauptbestandteil Kollagen, den sezernierenden Stromazellen (Fibroblasten und pankreatischen Sternzellen) und den Pankreaskarzinom-Zellen. Zudem ist die stromabedingte Kompression Chemotherapeutika-zuführender Gefäße dargestellt.

Der erhöhte Anteil an Stromaproteinen, vor allem an Kollagen Typ 1, begünstigt wiederum die Sekretion von Matrix-abbauenden Matrix-Metalloproteinasen (MMP), proteolytischen Enzymen und mitogenen Substanzen durch Pankreaskarzinom- und Stromazellen. In Zusammenspiel mit der Proteinproduktion führen die sezernierten Faktoren neben dem Tumorwachstum zu einem ständigen Remodelingprozess der extrazellulären Matrix und modifizieren diese dahingehend, dass Tumorwachstum, Invasion und Metastasierung begünstigt werden (Rasheed et al. 2012, Neesse et al. 2011). Da Kollagenfasern als Migrationswege fungieren, begünstigen sie so das Eindringen von Tumorzellen in die umgebenden Blutgefäße und damit die Metastasierung (Provenzano et al. 2006, Condeelis und Segall 2003).

Eine weitere Folge der verstärkten Produktion von Faserproteinen besteht in einer daraus resultierenden Steifheit des Tumors. Dies führt zu einer massiven Erhöhung des intratumoralen Drucks, sodass die Chemotherapie-zuführenden Tumorgefäße komprimiert werden. Systemisch applizierte Chemotherapeutika können die Pankreaskarzinomzellen dadurch nur noch in unzureichender Konzentration erreichen und abtöten (Jain et al. 2014).

Die negativen Auswirkungen des erhöhten Stromaanteils auf die Therapierbarkeit und Prognose des Pankreaskarzinoms machen das Tumorstroma somit zu einem

vielversprechenden Angriffspunkt in der Behandlung dieses Karzinoms (Zeng et al. 2017).

3.3 Gegenwärtige Therapiestrategien zur Auflösung der Desmoplasie

Um der desmoplastischen Stromareaktion und den damit einhergehenden negativen Auswirkungen entgegenzuwirken, wurde bereits eine Vielzahl an *in vitro* und *in vivo* Studien zur pharmakologischen Auflösung der Stromakomponenten durchgeführt. Beispielsweise wurde durch eine enzymatische Aufspaltung von Matrixbestandteilen durch Hyaluronidase oder Kollagenase ein stromareduzierender Effekt gezeigt (Goodman et al. 2007, Provenzano et al. 2012, Hingorani et al. 2016). Auch die Anwendung von Wachstumsfaktor-Inhibitoren und von in der klinischen Routine häufig verschriebenen Medikamenten – wie Angiotensin-II-Inhibitoren oder dem oralen Antidiabetikum Metformin – führte zu einer verringerten Kollagenproduktion (Gaspar et al. 2007, Incio et al. 2015, Diop-Frimpong et al. 2011). In den *in vivo* Studien bewirkte die Auflösung der Desmoplasie zum einen eine erhöhte Überlebensrate der Versuchstiere und zum anderen eine verbesserte Akkumulation zeitgleich verabreichter Chemotherapeutika im Tumorgewebe (Kolosnjaj-Tabi et al. 2017).

Nachteilig an den genannten Therapeutika ist jedoch, dass sie ihre Wirkung nicht tumorspezifisch entfalten und daher mit beträchtlichen systemischen Nebenwirkungen einhergehen (Kolosnjaj-Tabi et al. 2017). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass die medikamentöse Matrixreduktion mit einer gegenregulatorisch erhöhten Proteinsynthese durch Fibroblasten einhergehen könnte, was die desmoplastische Stromareaktion wiederum verstärken würde (Gaspar et al. 2007, Provenzano et al. 2012). Einen zufriedenstellenden Therapieansatz zur Bekämpfung der Desmoplasie gibt es demnach bisher nicht.

3.4 Anwendungen von Hyperthermie in der Krebstherapie

Als Hyperthermie bezeichnet man eine temporäre Erhöhung der Gewebetemperatur über 37 °C durch exogene Wärmezufuhr, welche für therapeutische Zwecke, beispielsweise für die Behandlung maligner Tumoren, additiv zu den herkömmlichen Therapieoptionen (Operation, Chemotherapie und

Strahlentherapie) zur Anwendung kommen kann (Peeken et al. 2017, Hilger 2013). Während man Behandlungstemperaturen bis 42 °C als milde oder moderate Hyperthermie definiert, bezeichnet man Behandlungen mit Temperaturen über 45 °C als Thermoablation (Hilger 2013, Roesch und Mueller-Huebenthal 2015, Li et al. 2013).

Als Begründer der Hyperthermiebehandlung zur Krebsbekämpfung gilt Manfred von Ardenne, welcher sich im Zuge seiner systemischen Krebs-Mehrschritt-Therapie den apoptoseinduzierenden Effekt von Hyperthermie in Tumorzellen zu Nutze machte (von Ardenne 1965). Während Ardenne die Patienten noch mit Ganzkörper-Hyperthermie therapierte, finden heute bevorzugt regionale Verfahren der Temperaturapplikation, wie Radiofrequenzablationssonden oder erwärmte Spülflüssigkeiten, Anwendung in der klinischen Routine (Chicheł et al. 2007). Da tiefliegende Tumore für die bisher etablierten Verfahren zur Hyperthermie-generierung jedoch nur unzureichend zugänglich sind und selbst bei oberflächlichen Tumoren peritumorales Gewebe geschädigt wird, werden derzeit in die Tumorregion injizierte oder durch Targetingmodule in das Tumorgewebe gelenkte eisenoxidhaltige magnetische Nanopartikel zur lokalen Hyperthermie-generierung erforscht (Thiesen und Jordan 2008).

3.4.1 Magnetische Nanopartikel zur Erzeugung von Hyperthermie

Als magnetische Nanopartikel (MNP) bezeichnet man Materialien im Größenbereich von bis zu 100 nm, welche sich in der Regel aus einem anorganischen Nanopartikel-Kern und einer biokompatiblen Oberflächenbeschichtung zusammensetzen (Sun et al. 2008). Um unterschiedlichen Anwendungsgebieten gerecht zu werden, gibt es die Partikel in verschiedenen Zusammensetzungen von Partikelkern und -hülle (Rehana et al. 2015, Gupta und Gupta 2005). Aufgrund ihrer chemischen Stabilität und guten Biokompatibilität enthalten die am häufigsten für biomedizinische Anwendungen verwendeten Partikel einen Eisenoxid-Kern, bestehend aus den Materialien Magnetit oder Maghemit, welcher den Nanopartikeln ferromagnetische Eigenschaften verleiht (Tartaj et al. 2003). Die Partikelhülle verhindert die Agglomeration der Partikel untereinander sowie mit Fremd-Ionen. Sie besteht zumeist aus Polysacchariden, wie Dextranen oder Stärke, da sich diese aufgrund

ihrer Verträglichkeit gut für medizinische Anwendungen eignen (Sun et al. 2008). Durch funktionelle Gruppen auf der Oberfläche der Partikel können diese zudem an Chemotherapeutika gekoppelt werden oder sich durch Targetingmoleküle bei intravenöser Applikation selektiv in bestimmten Geweben, wie beispielsweise Tumorgeweben, anreichern (Rehana et al. 2015, Sun et al. 2008). Im Tumorgewebe werden die Eisenoxid-Nanopartikel dann vermutlich durch Endozytose in die Zellen internalisiert (Peng et al. 2008). Abbildung 2 zeigt den schematischen Aufbau der magnetischen fluidMAG/C11-D-Eisenoxid-Nanopartikel von der Firma chemicell GmbH.

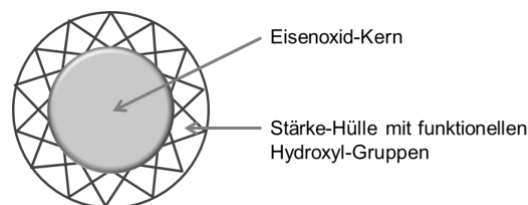


Abbildung 2: Schematischer Aufbau der Eisenoxid-Nanopartikel fluidMAG/C11-D. Darstellung der superparamagnetischen fluidMAG/C11-D-Nanopartikel der Firma chemicell GmbH, Berlin, D. Der Partikelkern besteht aus Eisenoxid und ist von einer Stärke-Hülle umschlossen.

Die Anwendung magnetischer Nanopartikel wird derzeit in zahlreichen präklinischen und klinischen Studien für verschiedenste diagnostische und therapeutische Einsatzgebiete erprobt. Als eisenoxidhaltiges Kontrastmittel (Resovist) zur Diagnostik von Leberläsionen in der Magnetresonanztomographie und zur Hyperthermiebehandlung von Hirntumoren haben die magnetischen Nanopartikel bereits Einzug in den klinischen Alltag gefunden (El-Boubbou 2018, Wang 2011). Auch in Bezug auf andere Tumore kann die therapeutische Anwendung von Hyperthermie, generiert durch magnetische Nanopartikel ein vielversprechendes Anwendungsgebiet darstellen. Dabei werden die Partikel intravenös oder intratumoral appliziert und durch Interaktion mit einem alternierenden Magnetfeld erwärmt. Das Prinzip der Wärmeerzeugung durch magnetische Nanopartikel bezeichnet man auch als magnetische Hyperthermie (Thiesen und Jordan 2008, El-Boubbou 2018, Hilger 2013). Aufgrund der ferromagnetischen Eigenschaften wird durch das Magnetwechselfeld das

intrinsische magnetische Moment des Partikelkerns angeregt (Jordan und Thiesen 2010). Die Nanopartikel verändern permanent ihre Magnetisierung und geben über verschiedene Relaxationsprozesse (Brown-, Néel-Relaxation) Energie in Form von Wärme an ihre Umgebung ab (Hergt et al. 2006). Einige Partikel besitzen außerdem superparamagnetische Eigenschaften. Im Gegensatz zur permanenten Magnetisierung ferromagnetischer Stoffe, sind diese Nanopartikel nicht permanent magnetisiert, sodass ohne eine Anregung durch ein Magnetwechselfeld keine Magnetisierung stattfindet und folglich keine Wärme erzeugt wird (Mathew und Juang 2007). Da sich die Hitzeinduktion auf den Akkumulationsbereich der Partikel begrenzt und diese nur unter Anwesenheit eines Magnetfeldes stattfindet, kann die Wärme – im Falle einer intratumoralen Injektion der Nanopartikel – gezielt im Tumorgewebe erzeugt werden (Kolosnjaj-Tabi et al. 2014, Kolosnjaj-Tabi et al. 2017). Ein weiterer Vorteil dieser Behandlungsform ist, dass magnetische Wechselfelder bekanntermaßen keine nachteiligen Auswirkungen auf den menschlichen Organismus haben und auch die eisenoxidhaltigen Nanopartikel biologisch abgebaut werden können (Gupta und Gupta 2005, Sun et al. 2008, Hilger 2013). Die magnetische Hyperthermie zeichnet sich dadurch als nebenwirkungsarmes und hocheffizientes Verfahren zur Behandlung maligner Tumore aus (Hilger 2013, Thiesen und Jordan 2008).

3.4.2 Zelluläre und vaskuläre Auswirkungen von Hyperthermie

In der Krebstherapie liegt das Hauptaugenmerk der Wärmebehandlung auf der zytotoxischen Wirkung der Hyperthermie, welche bei Temperaturen zwischen 40 °C und 47 °C abhängig von der Expositionszeit ist (Hegyí et al. 2013). Während intensives Erhitzen ab einer Temperatur von *circa* 41 °C zumeist direkt zytotoxisch wirkt und die Proteinsynthese vollständig hemmt, kommt es durch mildere Temperaturen über eine Expression von Hitzeschockproteinen zu einer Chemotaxis und Aktivierung von Zellen des Immunsystems, die zur Bekämpfung der Krebszellen beiträgt (Multhoff und Gaipl 2010, Hegyí et al. 2013). Der zytotoxische Effekt der Hyperthermie beruht auf der Strukturänderung von Proteinen, Phospholipiden und der Desoxyribonukleinsäure (DNA) (Hilger 2013). Durch die Schädigung der membranbildenden Phospholipide sowie durch die Temperaturerhöhung entstehen reaktive Sauerstoffspezies (ROS), welche

wiederum zusätzlich zu der temperaturbedingten Funktionseinschränkung von Proteinen die enzymatische Funktion der DNA-Reparatursysteme beeinträchtigen (Hilger 2013). Die, unter anderem durch Wärme, induzierten DNA-Schäden können somit nicht mehr durch die Reparatursysteme behoben werden und führen zu einer fehlerhaften bzw. unvollständigen DNA-Replikation. Folglich kommt es zu einer Induktion von Apoptose in den Zielzellen (Roti 2008). Thermoablative Temperaturen ab 45 °C induzieren hingegen vorrangig Gewebnekrosen (Hilger 2013).

Aufgrund des raschen Wachstums von Tumorzellen wird deren Gefäßversorgung zur Bereitstellung von Nährstoffen stetig erneuert (Multhoff und Gaipl 2010, Hegyi et al. 2013). Da Tumorgewebe jedoch in der Regel eine irreguläre Vaskularisation aufweisen und die Thermoregulation in Geweben über die Durchblutung reguliert wird, können sie Wärme im Vergleich zu Normalgewebe schlechter abtransportieren. Das Tumorgewebe ist der toxischen Wirkung der Hitze somit länger ausgesetzt als Normalgewebe und wird durch die Hyperthermie vorrangig geschädigt (Multhoff und Gaipl 2010, Hegyi et al. 2013). Daraus ergibt sich im Vergleich zu anderen, vor allem systemisch wirkenden, Therapieformen ein entscheidender Vorteil.

Ein weiterer Vorteil einer Hyperthermiebehandlung ist die synergistische Wirkung additiv verabreichter Chemo- und Strahlentherapie auf das Tumorgewebe. Durch die wärmebedingte Vasodilatation und die ab einer Temperatur von 42 °C durch Gefäßschäden hervorgerufene erhöhte Tumorgefäßpermeabilität wird die Akkumulation von Chemotherapeutika im Tumorgewebe erhöht (Hildebrandt et al. 2002, Song et al. 2005). Zudem werden die Tumorzellen durch hyperthermiebedingte DNA-Schäden für die Chemotherapeutika sensibilisiert, da subletale DNA-Schäden so in letale umgewandelt werden können (Multhoff und Gaipl 2010). In Bezug auf die Strahlentherapie ermöglicht die verbesserte Durchblutungssituation und daraus resultierend die erhöhte Sauerstoffversorgung innerhalb des Tumors eine vermehrte Bildung von Sauerstoffradikalen bei Bestrahlung. Auch diese tragen – wie bereits beschrieben – dazu bei DNA-Schäden in Tumorzellen hervorzurufen und zu fixieren (Multhoff und Gaipl 2010, Hildebrandt et al. 2002, Song et al. 2005).

3.4.3 Effekt von Hyperthermie auf Proteine der extrazellulären Tumormatrix

Wie unter Abschnitt 3.2 beschrieben setzt sich die extrazelluläre Matrix der desmoplastischen Pankreaskarzinome vorrangig aus Faser-, Adhäsionsproteinen und Proteoglykanen zusammen.

Es ist bereits bekannt, dass Proteine durch Exposition mit Temperaturen im Bereich der milden Hyperthermie denaturieren können (Vazquez und Larson 2013). Auch in Bezug auf kollagene Fasern sind die denaturierenden Auswirkungen einer milden Hyperthermie bereits beschrieben (Liu et al. 2013, LI et al. 2010). Daher kann die milde Hyperthermie einen vielversprechenden Ansatz zur lokalen und nebenwirkungsarmen Destruktion der desmoplastischen Stromareaktion des Pankreaskarzinoms darstellen. Da die Denaturierung von Proteinen in der Regel mit einem Funktionsverlust dieser einhergeht, können durch die Reduktion des Tumorstromas vermutlich auch die negativen Auswirkungen des Stromas wie gefäßkompressionbedingte Chemotherapie-Resistenz und die frühe Metastasierungstendenz verringert werden (Miyamoto et al. 2016, Kolosnjaj-Tabi et al. 2014, Deutzmann und Bruckner 2014, Kolosnjaj-Tabi et al. 2017).

Trotz dieser Erkenntnisse gibt es bisher nur wenige Studien, die sich mit der Auswirkung von Hyperthermie auf die Komponenten der extrazellulären Matrix von stromareichen Tumoren - wie dem Pankreaskarzinom - beschäftigen (Park et al. 2008).

4 Ziele der Arbeit

Pankreaskarzinome zeichnen sich durch ein ausgeprägtes Tumorstroma aus, welches man als Desmoplasie bezeichnet. Die desmoplastische Stromareaktion führt, unter anderem durch Kompression von Tumorgefäßen, zu einer unzureichenden Penetration von Chemotherapeutika in das Tumorgewebe und verschlechtert so die Therapierbarkeit und Prognose des Karzinoms. Vorangegangene Studien zur pharmakologischen Stromaauflösung haben bereits die potentiell günstige Wirkung einer reduzierten extrazellulären Matrix für die Therapierbarkeit des Karzinoms belegt. Da die applizierten Pharmaka jedoch mit erheblichen systemischen Nebenwirkungen einhergingen, gilt es eine Therapieoption zur nebenwirkungsarmen und tumorselektiven Auflösung der Desmoplasie zu finden. Eine solche könnte, aufgrund der zytotoxischen und proteindenaturierenden Wirkung von Wärme, die Behandlung der Tumoren mit milder Hyperthermie darstellen. Erkenntnisse über die Degradation von EZM-Molekülen in desmoplastischen Tumoren durch Wärme liegen bisher jedoch nur unzureichend vor.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher die Untersuchung der milden Hyperthermie als mögliche Option zur Verminderung der Kollagendeposition sowie zur Reduktion vitaler Zellen in einem *in vitro* Modell des Pankreaskarzinoms.

Thematisch lässt sich die Arbeit in drei Teile gliedern. Im ersten Teil werden Temperaturen im Bereich der milden Hyperthermie (39 °C bis 42 °C) ermittelt, bei denen ein Großteil kollagener Fasern degeneriert. Die ermittelten Temperaturen werden für die nachfolgenden Hyperthermie-Experimente verwendet.

Im zweiten Teil der Arbeit werden *in vitro* kollagenhaltige, dreidimensionale Tumorsphäroide generiert, welche die desmoplastischen Verhältnisse *in vivo* widerspiegeln sollen. Diese werden einerseits durch PANC-1-Zellen und andererseits durch Co-Kultivierung von PANC-1- und WI-38-Zellen gebildet.

Der letzte Teil der Arbeit verbindet die vorherigen Teile dahingehend, dass der Einfluss der zuvor ermittelten Temperaturen auf die generierten 3D-Tumorsphäroide unter *in vivo*-ähnlichen Bedingungen untersucht werden soll. Hierbei steht vor allem die Auswirkung der milden Hyperthermie auf die Integrität kollagener Fasern im Vordergrund. Zudem soll der Einfluss der potentiell

kollagendegradierenden Temperaturen auf die Reduktion im Tumor befindlicher vitaler Zellen untersucht werden.

5 Materialien und Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 Geräte

Die in der Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Geräte.

Bezeichnung	Hersteller
Analysenwaage „AC 211 P“	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Atomabsorptionsspektrometer „AAS 5 FL“	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
Brenner „Schuett-Phoenix“	schuett-biotec GmbH, Göttingen, Deutschland
Brutschrank „HERAcell®“	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Ein- und Mehr-Kanal-Pipetten	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, D; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Elektronisches Rotationsmikrotom „HM 340E“	MICROM International GmbH, Walldorf, Deutschland
Faseroptischer Temperatursensor „TS2“	OPTOcon AG, Dresden, Deutschland
Faseroptisches Temperaturmessgerät „FOTEMP“	OPTOcon AG, Dresden, Deutschland
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr, Bulle, Schweiz
Gefriertruhe -80 °C „Thermo Scientific Forma 700“	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Gewebeeinbettautomat (Histokinette) „Leica TP1020“	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop „CLSM 780“	Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland
Kryostat „Leica CM 3050 S“	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Kühlschrank 4 °C	Liebherr, Bulle, Schweiz
Laborabzug	TROX GmbH, Neukirchen-Vluyn, Deutschland
Laborthermometer	Amarell GmbH & Co KG, Kreuzwertheim, Deutschland
Magnetrührer mit Heizplatte „MR Hei-Tec“	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Schwabach, Deutschland
Magnetwechselfeld-Generator „präklinisches MACH (<i>Magnetic Alternating Current Hyperthermia</i>)-System, Modell 2017/ Jena“ bestehend aus: MACH-Steuereinheit, Stromversorgungsgerät ALR3220	Resonant Circuits Limited, London, England; elc, Annecy, Frankreich
Mikroskop „Axioplan 2 Imaging“	Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland

Mikroskop „EVOS XL“	Advanced Microscopy Group, Mill Creek, USA
Mikrowelle	C. Bohmann GmbH, Kempen, Deutschland
Paraffinausgießstation „Leica EG1160“	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Paraffin-Streckbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland
Pipettierhilfe „accu-jet© pro“	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
Pipettierhilfe „Pipet Boy®“	Lab-Laborfachhandel, München, Deutschland
Sicherheitswerkbank Klasse 2 „HERA Safe Typ HS12“	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Sicherheitswerkbank Klasse 2 „Holten Safe Typ 2010 1.2“	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Stickstofftonne	Messer Griesheim GmbH, Krefeld, Deutschland
Ultraschallbad „Sonorex Digitec“	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Vakuumsauger „Flüssigkeits- Absaugsystem BVC professional“	VACUUBRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland
Vortexer „Vortex-Genie 2“	Scientific Industries Inc., Bohemia, USA
Wasserbad „E 100“	Lauda GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Wasserbad „stuart SBS40“	Cole-Parmer Instrument Company, Vernon Hills, USA
Zellzähler „CASY TT“	Roche Innovatis AG, Basel, Schweiz
Zentrifuge „320R“	Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen, Deutschland
Zetasizer „Zetasizer Nano-ZS“	Malvern Instruments GmbH, Herrenberg, Deutschland

5.1.2 Verbrauchsmaterialien

Die in der Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Hersteller
96-Well Mikrotiterplatten, F-bottom	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
96-Well Mikrotiterplatten, R-Bottom	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Deckgläser „Menzel-Gläser“ (24 x 50 mm)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Einweg-Cryomold®-Formen „Cryomold® Intermediate“	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande

Eppendorf Tubes/ Eppendorfgefäße (0,5 ml; 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Färbegestell (85 * 60 * 45 mm)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Färbekästen nach Hellendahl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Gewebe-Einbettkassetten „Biopsie“	KABE LABORTECHNIK GmbH, Nümbrecht-Elsenroth, Deutschland
Glaskästen (105 * 85 * 70 mm)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glasrohr mit Probenhalterung (für magnetische Hyperthermie)	Friedrich Schiller Universität Jena, Institut f. Anorg. und Analyt. Chemie (C. Greiner), Jena, Deutschland
Kapillar-Küvette	Malvern Instruments GmbH, Herrenberg, Deutschland
Laborflasche	Schott AG, Mainz, Deutschland
Meßgefäße für Zellzählung „CASYcups“	OLS® OMNI Life Science GmbH + Co. KG, Bremen, Deutschland
Messpipetten (10 ml, 20 ml)	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co KG, Eberstadt, Deutschland
Mikrotomklinge „Microtome Blade C35“	FEATHER® Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan
Mikrotomklinge „Microtome Blade R35“	FEATHER® Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan
Objektträger „SuperFrost Plus“	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Parafilm-Verschlussfolie	Bemis Company, Neenah, USA
Pasteurpipetten	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim/ Rhön, Deutschland
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Präparierbesteck	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Probengefäße für FAAS (3 ml)	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
Reagenzgläser	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Reagenzglasständer	Kartell S.p.A. – LABWARE Division, Mailand, Italien
Reagenzreservoir	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
Rundboden-Röhrchen (5 ml) „Polystyrene Round-Bottom Tubes“	Corning Incorporated Life Sciences, Durham, USA
Schwimmendes Schaum-Gestell für Tubes (<i>Floating foam tube rack</i>)	Promega Corporation, Fitchburg, USA
Skalpell	P.J. Dahlhausen & Co. GmbH, Köln, Deutschland
spezialangefertigte Mikroskopievorrichtung für Sphäroide	AG Molecular Cardiology and Stem Cell Research (Leitung: Prof. Dr. Wartenberg), Jena, Deutschland

Sterican Einwegkanüle (21 G)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Zellkulturflaschen „CELLSTAR® TC, STERIL“ (175 cm ²)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflaschen „CELLSTAR® TC, STERIL“ (75 cm ²)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

5.1.3 Zelllinien

Die in der Arbeit verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Zelllinien.

Zelllinie	Eigenschaften	Hersteller
PANC-1	Organismus: <i>Homo sapiens</i> Gewebe: Pankreasgang Zelltyp: epitheloides Karzinom	ATCC® American Type Culture Collection, Manassas, USA (Nr. CRL-1469™)
WI-38	Organismus: <i>Homo sapiens</i> Gewebe: Lunge Zelltyp: Fibroblast Produkt: Kollagen	ATCC® American Type Culture Collection, Manassas, USA (Nr. CRL-75™)

5.1.4 Nanopartikel

Der in der Arbeit verwendete Nanopartikel fluidMAG/C11-D von der Firma chemicell GmbH, Berlin, Deutschland (LOT: 2503/17) ist in Tabelle 4 näher charakterisiert.

Tabelle 4: Eigenschaften des verwendeten Nanopartikels fluidMAG/C11-D.

	Eigenschaften
fluidMAG/C11-D	Partikelkonzentration: 130 mg/ml Kerntyp: Magnetit - C11 Matrix: Stärke funktionelle Gruppen: Hydroxylgruppen Magnetisierungstyp: superparamagnetisch

5.1.5 Chemikalien

Die in der Arbeit verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Chemikalien.

Bezeichnung	Hersteller
Agarose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<i>Aqua bidestillata</i>	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Einbettmedium „Pertex®“	VWR Lab Services GmbH, Darmstadt, Deutschland; medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Einbettmedium „Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound“	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande
Eisen(III)-chlorid (97 %)	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Ethanol (96 %, 100 %)	Nordbrand Nordhausen GmbH, Nordhausen, Deutschland; Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum „FBS one shot™ standard“ (FKS)	Gibco® by Life Technologies™, Carlsbad, USA
Flüssigstickstoff	Linde AG, Pullach, Deutschland
Formaldehydlösung (5 %)	Fischar, Saarbrücken, Deutschland
<i>Hank's Balanced Salt Solution</i> (HBSS)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Kalibrierlösungen für FAAS (5, 10, 20, 30, 50 µmol Eisen/l 0,1 M HCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Kaliumhexacyanoferrat (II) Trihydrat	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Kaliumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Kapillarreinigungslösung „CASYclean“	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Kernechtrot	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kollagenlösung „Corning® Collagen I, Rat Tail“ (4,42 mg/ml)	Corning Inc., Corning, USA
Messpuffer „CASYton“	OLS® OMNI Life Science GmbH + Co. KG, Bremen, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<i>Non-Essential Amino Acids</i> (NEA)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Paraffin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Gibco® by Life Technologies™, Carlsbad, USA
Pikro-Siriusrot-Lösung	Morphisto GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland

Salzsäure (HCl; 1 N; 0,1 N; 32%)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Trichloressigsäure (10 %)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Xylol (100 %)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Zelldissoziationsreagens „StemPro® Accutase®“	Gibco® by Life Technologies™, Carlsbad, USA
Zellkulturmedium „ <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> “ (DMEM)	Gibco® by Life Technologies™, Carlsbad, USA
Zellkulturmedium „MEM Flüssigmedium mit Earle's Salzen, mit 2,2 g/l NaHCO ₃ , mit stabilem Glutamin“	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Zellvitalitäts-Kit „ <i>Apoptosis/ Necrosis Detection Kit</i> “	Abcam plc., Cambridge, England

5.1.6 Puffer und Medien

Die in der Arbeit verwendeten Puffer in Medien sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Puffer und Medien sowie deren Zusammensetzung.

Bezeichnung	Zusammensetzung
<i>Phosphate buffered saline</i> (PBS)	0,008 mol/l Dinatriumhydrogenphosphat 0,003 mol/l Kaliumchlorid 0,0015 mol/l Kaliumhydrogenphosphat 0,137 mol/l Natriumchlorid pH 7,4
PANC-1-Medium	500 ml <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM) 50 ml Fetales Kälberserum (FKS)
WI-38-Medium	500 ml MEM Flüssigmedium 50 ml Fetales Kälberserum (FKS) 5 ml <i>Non-Essential Amino Acids</i> (NEA)

5.1.7 Softwares

Die in der Arbeit verwendeten Softwares sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Softwares.

Bezeichnung	Hersteller
AxioVision SE64 4.9	Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland
Fiji (<i>Fiji is just ImageJ</i>)	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
FOTEMP-Assistent	OPTOcon AG, Dresden, Deutschland
GraphPad PRISM Version 6.01	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
ZEN (<i>black edition</i>)	Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland

5.2 Methoden

5.2.1 Sehnenpräparation

Um eine Kollagenquelle für nachfolgende Hyperthermie-Versuche zu gewinnen, wurden die Achillessehnen von NMRI-Foxn1nu/Foxn1nu Mäusen, die aufgrund anderweitiger Experimente in der Arbeitsgruppe abgetötet wurden, herauspräpariert (Abbildung 3).

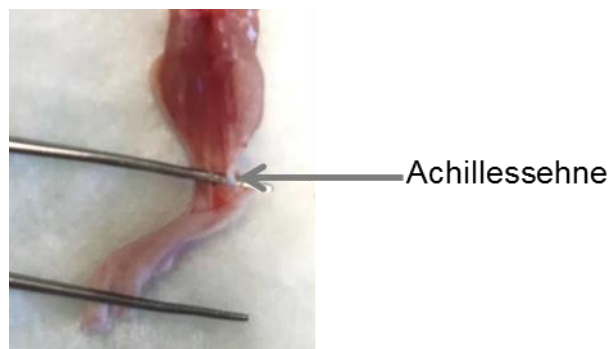


Abbildung 3: Präparation der Achillessehne einer toten NMRI-Foxn1nu/Foxn1nu-Maus. Die Abbildung zeigt die freipräparierte Achillessehne des Hinterbeines einer toten NMRI-Foxn1nu/Foxn1nu-Maus.

Zur Präparation der Sehnen wurde zunächst die Haut an den Hinterbeinen der Mäuse entfernt. Mittels mechanisch induzierter Plantarflexion wurde überprüft, ob es sich bei der frei präparierten Struktur um die Achillessehne handelt. Diese wurde nach positiver Flexion an Ursprung und Ansatz mittels Skalpell abgetrennt. Um ein Austrocknen der Sehnen zu vermeiden, wurden die abgetrennten Sehnen bis zur Hyperthermiebehandlung mittels Wasserbad (siehe Abschnitt 5.2.5.1) in mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) befüllten Eppendorfgefäßen gelagert.

5.2.2 Zellkultur

5.2.2.1 Kultivierung von Monolayer-Zellkulturen

Bei den im Folgenden verwendeten Zelllinien handelt es sich um die aus einem pankreatischen duktalem Adenokarzinom gewonnene Tumorzelllinie PANC-1 und die Fibroblasten-Zelllinie WI-38 (ATCC®-PANC-1, ATCC®-WI-38). Die Arbeit mit beiden Zelllinien erfolgte unter einer Werkbank und somit unter sterilen

Bedingungen. Die PANC-1-Zelllinie wurde in Zellkulturflaschen durch Zugabe des zelltypischen PANC-1-Mediums und die WI-38-Zellen durch Zugabe des WI-38-Mediums bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchte kultiviert, um eine ausreichende Zellzahl für die nachfolgende Sphäroidbildung zu generieren. Es wurden ein wöchentlicher Mediumwechsel sowie eine wöchentliche Passage in eine neue Zellkulturflasche durchgeführt, um den Zellen ausreichend Nährmedium und Wachstumsfläche bereitzustellen. Um die adhärent wachsenden Zellen zu passagieren und für nachfolgende Versuche zu verwenden, wurden sie mit Accutase vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Hierfür wurde zunächst der Mediumüberstand abgesaugt und es schlossen sich drei Waschgänge mit *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) an. Anschließend erfolgte die Zugabe der Accutase und eine 5minütige Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchte. Den abgelösten Zellen wurde frisches Medium (10 ml) zugegeben und sie wurden in ein Falcontube überführt. Von dieser Zellsuspension wurden 50 µl für die Zellzählung am CASY-Zellzähler verwendet. Die verbliebenen Zellen wurden daraufhin 5 min bei 200 RCF zentrifugiert und der Mediumüberstand verworfen. Die Zellen wurden in dem jeweiligen frischen Medium (PANC-1- oder WI-38-Medium) resuspendiert und in der benötigten Zellzahl für die Generierung von 3D-Sphäroiden oder Passagen verwendet. Um einen Einfluss der Passagezahl auf die Versuchsergebnisse auszuschließen, wurden die Zelllinien nach dem Auftauen über maximal 10 Passagen (P) verwendet (PANC-1: P 64 - 73, WI-38: P18 - 27).

5.2.2.2 Generieren von 3D-Sphäroiden

Um für die folgenden Untersuchungen kollagenhaltige Versuchsobjekte zu generieren, welche die biologischen Eigenschaften des Pankreaskarzinoms *in vivo* simulieren, wurden Sphäroide (kugelförmige dreidimensionale Zellkulturen) formiert. Um ein dreidimensionales Zellwachstum zu induzieren, muss generell das Absetzen der Zellen auf dem Plattenboden verhindert werden, sodass sich adhärent wachsende Zellen zusammenlagern (Li et al. 2011). Dies wurde in der vorliegenden Arbeit realisiert, indem Flachboden-Mikrotiterplatten unter sterilen Bedingungen mit einer 1,5%igen Agaroselösung beschichtet und bis zum Gebrauch bei 4 °C im Kühlschrank gelagert wurden. Anschließend wurden in die

beschichteten Wells der Mikrotiterplatte die (entsprechend Abschnitt 5.2.2.1) kultivierten Zellen gegeben und die optimalen Bedingungen für die Bildung von Sphäroiden ermittelt. Es wurden hierbei drei verschiedene Ansätze der Bildung kugelförmigen dreidimensionaler Zellgebilde untersucht. Erstens wurden die PANC-1-Zellen in unterschiedlichen Zellzahlen (2500 bis 10.000 Zellen in PANC-1-Medium) eingesetzt und über verschiedene Zeiträume (2 bis 14 Tage) kultiviert. Auf diese Weise wurde ermittelt, inwiefern die PANC-1-Zellen selbst in der Lage sind, Kollagenfasern zu produzieren, wie es aus der Literatur bekannt ist (Longati et al. 2013, Lohr et al. 1994, Yeon et al. 2013). Im zweiten Ansatz wurde untersucht, ob eine extern zugegebene Kollagenlösung mit einer Konzentration von 4,42 mg/ml (0 bis 100 µl) zu einer definierten Anzahl an PANC-1-Zellen (10.000 Zellen pro Well) zu den gewünschten Sphäroiden führt. Im dritten Ansatz wurden Sphäroide aus PANC-1-Zellen und WI-38-Zellen generiert, die im Folgenden als Hetero-Sphäroide bezeichnet werden. Hierbei wurden die Zellen im Verhältnis 1:1 eingesetzt.

Unabhängig davon, welcher Ansatz verwendet wurde, betrug das Gesamtvolumen pro Well der Mikrotiterplatte 200 µl. Während es sich bei Ansatz eins und zwei um das PANC-1-Medium handelte, setzte sich das Medium im Falle der Hetero-Sphäroide sowohl aus PANC-1- als auch aus WI-38-Medium im Verhältnis 1:1 zusammen. Die so befüllten Mikrotiterplatten wurden anschließend für 5 min bei 200 RCF zentrifugiert und bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchte im Brutschrank inkubiert. Im Abstand von zwei Tagen wurden 100 µl des verbrauchten Nährmediums durch zelltypisches Frischmedium ersetzt und das Wachstum der Sphäroide mit dem Mikroskop „EVOS XL“ in 10facher Vergrößerung kontrolliert. Die Auswertung der entstandenen Sphäroide erfolgte anhand der Zirkularität, Größe bzw. der Größe und Kompaktheit mit Hilfe der Software Fiji (*Fiji is just ImageJ*). Um die Kompaktheit der Sphäroide zu ermitteln wurde eine *Region of interest* (ROI) definiert (siehe Tabelle 8), innerhalb dieser die Zellen manuell unter Verwendung des Zellzählers der Software Fiji ausgezählt wurden. Die so kultivierten PANC-1- und Hetero-Sphäroide wurden mittels konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops wie unter Abschnitt 5.2.6.1 beschrieben auf Kollagenhaltigkeit untersucht. Der Kollagennachweis wurde zusätzlich mittels Piko-Siriusrot-Färbung überprüft (siehe Abschnitt 5.2.7.2).

Tabelle 8: Eigenschaften der Region of interest (ROI) zur Auswertung der Kompaktheit

Form	Durchmesser [Pixel]	Mitte der ROI (x-, y-Koordinate) [Pixel]
quadratisch	120	1630, 525

5.2.3 Charakterisierung magnetischer Eisenoxid-Nanopartikel

Im Folgenden wurde der verwendete MNP fluidMAG/C11-D in Bezug auf das Zeta-Potential, die Größe, Polydispersitätsindex (Pdl) und den Eisengehalt charakterisiert. Die drei erstgenannten Eigenschaften wurden mittels Zetasizer Nano-ZS und der Eisengehalt mit Hilfe der Flammenatomabsorptionsspektrometrie (FAAS) ermittelt. Um mögliche Nanopartikel-Agglomerate aufzulösen wurde das Ferrofluid vor jedem Versuch 30 s mittels Vortexer gemischt, anschließend 5 min in einem Ultraschallbad behandelt und erneut 30 s mittels Vortexer homogenisiert.

5.2.3.1 Bestimmung von Größe, Polydispersitätsindex und Zetapotential

Die Größenmessung erfolgte mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) und dem Messverfahren „size distribution per number“. Dabei wird das Ferrofluid mit einem Laserlicht bestrahlt. Beim Auftreffen des Strahls auf einen Nanopartikel wird das Laserlicht gestreut. Das gestreute Licht wird durch einen Detektor innerhalb des Zetasizers detektiert. Eine Berechnung der Partikelgröße ist so möglich, da die Diffusionsgeschwindigkeit eines Partikels mit dessen Größe korreliert (Instruments 2004). Parallel zur Größenmessung wurde der Polydispersitätsindex bestimmt, der eine Aussage über die Varianz der Partikelgröße erlaubt. Pdl-Werte unter 0,2 weisen auf Größenabweichungen der Partikel von unter 10 % hin und die Lösung wird als monodispers bezeichnet. Lösungen mit einem Pdl von mehr als 0,2 gelten als polydispers (Schneider 2016, Instruments 2004).

Das Zetapotential bezeichnet das elektrokinetische Potential zwischen Partikeloberfläche und Dispersionsflüssigkeit. Mittels Zetapotential lässt sich eine Aussage darüber treffen, ob die Partikel in einer Lösung präzipitieren. Partikel mit

einem Zetapotential zwischen +10 mV und -10 mV werden als neutral, also nicht präzipitierend, angesehen (Instruments 2004, Lauth und Kowalczyk 2016).

Zur Bestimmung der genannten Eigenschaften wurde das Ferrofluid (Partikelkonzentration: 130 mg/ml) auf eine Partikelkonzentration von 50 µg/ml mit *Aqua bidestillata* verdünnt. Anschließend wurden je 1000 µl der verdünnten Partikelsuspension in eine Kapillar-Küvette gegeben, welche im Zetasizer platziert wurde. Die Messung der Größe, des PdIs und des Zetapotential erfolgte als Dreifachbestimmung, wobei pro Bestimmung drei Messwerte generiert und gemittelt wurden.

5.2.3.2 Eisenkonzentrationsbestimmung der MNPs mittels Flammenatomabsorptionsspektrometrie

Die quantitative Bestimmung der Eisenkonzentration in fluidMAG/C11-D-Nanopartikeln erfolgte mittels FAAS. Die FAAS gehört zu den spektralanalytischen Verfahren und ermöglicht die quantitative Analyse von Metallen in Lösungen. Durch die thermische Energiezufuhr einer Flamme wird bei dieser Methode das Ferrofluid der Probe in die Gasphase überführt und atomisiert. Da die Extinktion eines Lichtstrahls, der durch die Probe gesendet wird, mit der Atomkonzentration in einer Probe korreliert, kann so anhand einer Kalibriergeraden die Eisenkonzentration einer Probe bestimmt werden (Gey 2015).

Um die Partikel bzw. das Eisen aus dem Partikel zu lösen, wurde das Ferrofluid 1:21 mit 32%iger HCL versetzt. Nach einer 30minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Gemisch über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Um Werte im linearen Messbereich des Atomabsorptionsspektrometers zu generieren, wurde die Probe durch weitere Verdünnungsschritte mit *Aqua bidestillata* verdünnt. Aus dieser Endverdünnung wurden 250 µl in ein Probengefäß überführt und zur Analyse im Spektrometer mit 32%iger HCl sowie mit 10%iger Trichloressigsäure (TCA) im Verhältnis 2:1:1 versetzt und mittels Vortexer gemischt. Die Eisenkonzentration der Nanopartikel wurde, nach Kalibrieren des Spektrometers, in den so vorbereiteten Probengefäßen (Gesamtvolumen von 500 µl) in dreifachem Ansatz bestimmt. Für die Kalibrierung des Gerätes wurden je 500 µl von Proben mit bekannter Eisenkonzentration im

Bereich von 0 bis 50 μmol Eisen (Fe)/l in je ein Probengefäß gegeben und mit jeweils 250 μl HCl und TCA versetzt. Zudem wurde eine Probe *Aqua bidestillata* (500 μl) mit HCl und TCA (jeweils 250 μl) versetzt, um den Einfluss dieser Substanzen auf die Messung zu ermitteln. Mit Hilfe der zusätzlich mitgeführten Präzisionskontrolle (40 μmol Fe/l) wurde die Genauigkeit der erhaltenen Messergebnisse erfasst. Hierfür wurden 250 μl dieser Probe mit jeweils 125 μl HCl und TCA versetzt. Die Bestimmung der Eisenkonzentration der Nanopartikel erfolgte mittels nachstehender Formel:

$$F_{\text{E}_{\text{unverdünnte Probe}}} \left[\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right] = F_{\text{E}_{\text{verdünnte Probe}}} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{l}} \right] \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot \text{Umrechnungsfaktor}$$

Verdünnungsfaktor: 74.088

Umrechnungsfaktor: $5,5845 \cdot 10^{-5}$

5.2.4 Bestimmung der Eisenmenge in Monolayern und 3D-Sphäroiden nach Inkubation mit MNPs

Für die Untersuchung der Internalisierung der MNPs wurden PANC-1-Monolayer sowie PANC-1- und Hetero-Sphäroide, die über einen Zeitraum von 6 Tagen kultiviert wurden, verwendet. In den darauffolgenden 24 Stunden wurden die Monolayer und Sphäroide mit jeweils 100 μg Eisen/ml Medium weiterkultiviert.

Die Sphäroide wurden hierfür in unbeschichtete Rundboden-Mikrotiterplatten transferiert, um eine Interaktion der Agarosebeschichtung mit den Nanopartikeln zu vermeiden. Anschließend wurden die Zellen bzw. Sphäroide dreimalig mit HBSS gewaschen, um nicht internalisierte Nanopartikel zu entfernen. Nach der Zellernte wurden 3×10^6 PANC-1-Monolayer-Zellen und jeweils 10 PANC-1- und Hetero-Sphäroide in Eppendorfgefäße überführt. Für den Zellaufschluss und den Übergang des Eisens in Lösung wurde auf die Zellen 32%ige HCl gegeben (Gesamtvolumen in den Gefäßen 500 μl) und die Probe nach 30minütiger Inkubation bei Raumtemperatur über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Um einen Messwert im linearen Bereich des Spektrometers zu generieren, wurden die Proben mit *Aqua bidestillata* verdünnt. Danach wurden 250 μl der Proben mit TCA (125 μl) und HCl (125 μl) versetzt und es schloss sich eine 5minütige Zentrifugation bei 5.000 rpm zur Proteinfällung an. Pro Versuchsgruppe wurden jeweils 3 Proben als Dreifachbestimmung vorbereitet. Parallel dazu wurden nicht mit Nanopartikel behandelte PANC-1-Monolayer sowie PANC-1- und Hetero-

Sphäroide als Kontrollen zur Bestimmung des zelleigenen Eisengehaltes mitgeführt. Im weiteren Verlauf wurde mit diesen Proben identisch verfahren wie mit den Proben unter Nanopartikelzugabe. Die quantitative Bestimmung der Eisenkonzentration erfolgte mittels FAAS, wie unter Abschnitt 5.2.3.2 bereits erläutert.

Um den Eisengehalt pro Zelle zu berechnen, wurde folgende Formel angewendet:

$$\text{Fe pro Zelle} \left[\frac{\text{pg}}{\text{Zelle}} \right] = \text{Fe}_{\text{unverdünnte Probe}} \left[\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right] \cdot \frac{\text{Volumen der Ausgangslösung [ml]}}{\text{Zellzahl}} \cdot 10^9$$

5.2.5 Hyperthermie

5.2.5.1 Wasserbad-Hyperthermie

Für die Wasserbad-Hyperthermie wurden in PBS gelagerte murine Sehnen (siehe Abschnitt 5.2.1) verwendet. Die Eppendorfgläser mit den Sehnen wurden im Wasserbad auf Temperaturen im Bereich von 37 °C bis 70 °C erwärmt. Die auf 37 °C erwärmte Sehne diente hierbei als Referenztemperatur, während die bei 55 °C und 70 °C erwärmten Proben die Positivkontrollen darstellten.

Zur Temperaturoaufzeichnung wurde eine kalibrierte fiberoptische Temperatursonde in ein Probengefäß eingetaucht, welche mit einem Temperaturmessgerät zur Temperaturoaufzeichnung verbunden war. Die Temperaturoaufzeichnung wurde mittels FOTEMP-Assistent-Software gestartet. Nach Erreichen der jeweiligen Zieltemperatur wurde diese für 60 min durch Regulation der Wassertemperatur mittels Temperaturregulationseinheit des Wasserbads sowie durch Zufuhr kalten Leitungswassers aufrechterhalten (Abbildung 4). Nach der Erwärmung wurden die Proben dem Wasserbad entnommen und die Temperaturoaufzeichnung beendet. Einen repräsentativen Temperaturgraph pro Versuchstemperatur zeigt Abbildung 4.

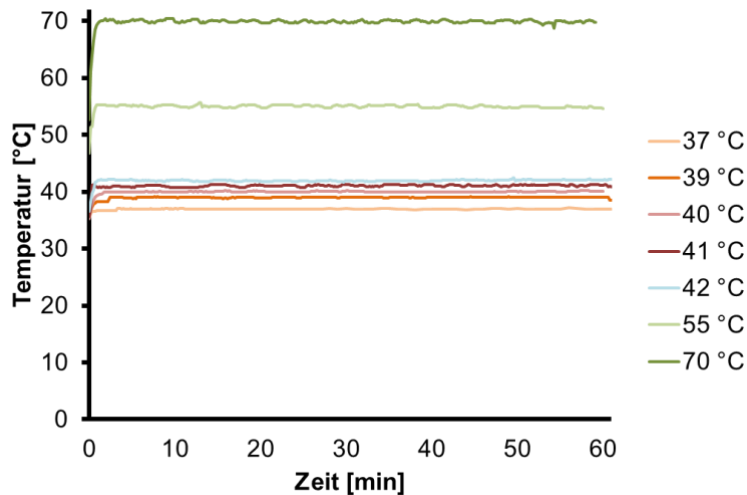


Abbildung 4: Repräsentative Temperaturgraphen der Wasserbad-Hyperthermie.

Anhand der Temperaturaufzeichnung kann der CEM43 (*cumulative equivalent minutes at 43 °C*) entsprechend nachstehender Formel berechnet werden (Miller et al. 2017). Der CEM43 definiert die Anzahl kumulativer Erwärmungsminuten bei 43 °C, die erforderlich sind, um einen äquivalenten Effekt in biologischen Geweben zu induzieren (Sapareto und Dewey 1984). Er dient somit der Quantifizierung der thermischen Exposition von Geweben. Die CEM43-Werte der Wasserbad-Hyperthermie werden in Tabelle 9 veranschaulicht. Um für die weitere Analyse eine homogene Dicke der Sehnen zu gewährleisten, wurden Kryoschnitte mit einer Schnittdicke von 20 µm angefertigt. Dazu wurden die temperaturbehandelten Sehnen in Einweg-Cryomold®-Formen gegeben und mittels „Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound“-Einbettmedium eingebettet. Die eingebetteten Sehnen wurden mittels Flüssigstickstoff kryofixiert und bis zum Schneiden bei -80 °C zwischengelagert. Die mittels Kryostat angefertigten Schnitte wurden anschließend auf einen Objektträger aufgezogen und unter dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop entsprechend 5.2.6.1 analysiert.

$$\text{CEM43} = \sum_{i=1}^n \Delta t_i \cdot R^{(43 - T_i)}$$

n: Anzahl der Messzeitpunkte

Δt_i : Zeitintervall zwischen Messzeitpunkt i und i-1

R: Konstante (R=0,5 wenn $T_i \geq 43$ °C, R=0,25 wenn $T_i < 43$ °C)

T_i : gemessene Temperatur des Messzeitpunktes i

Tabelle 9: CEM43-Werte der Wasserbad-Hyperthermie.

Versuchs- temperatur [°C]	CEM43 [min]
37	0,02 ± 0,00
39	0,24 ± 0,01
40	0,88 ± 0,07
41	4,16 ± 0,02
42	15,21 ± 0,32
55	2,45*10 ⁵ ± 2,39*10 ³
70	7,74*10 ⁹ ± 1,09*10 ⁸

5.2.5.2 Brutschrank-Hyperthermie

Für die Brutschrank-Hyperthermie wurden PANC-1- und Hetero-Sphäroide in separaten Wells einer gemeinsamen Mikrotiterplatte (je 10 Sphäroide pro Versuchsgruppe) verwendet. Der Brutschrank wurde hierfür auf die entsprechenden Versuchstemperaturen von 40 °C, 42 °C bzw. 55 °C temperiert. Die auf 55 °C erwärmte Probe stellt die Positivkontrolle dar, während eine bei 37 °C belassene Probe als Referenz diente. Eine weitere Mikrotiterplatte, die ausschließlich mit Zellkulturmedium befüllt war, die sogenannte „Dummy“-Platte, wurde mit einer kalibrierten fiberoptischen Temperaturmesssonde versehen, die wiederum mit einem Temperaturmessgerät verbunden war (Abbildung 5).

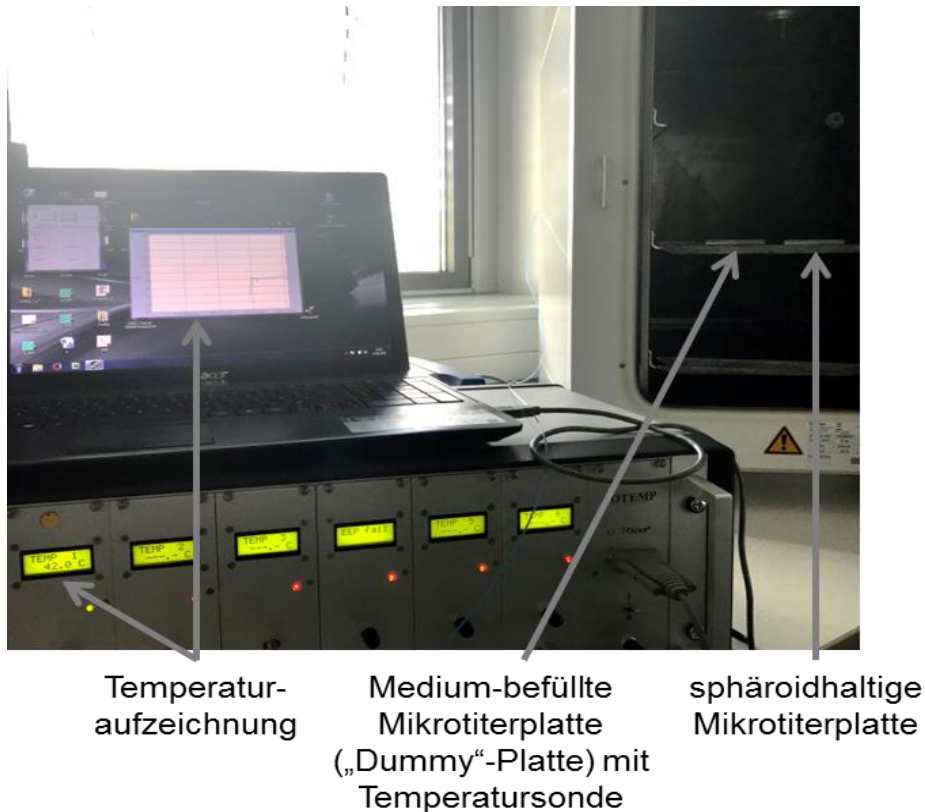


Abbildung 5: Versuchsaufbau für die Brutschrank-Hyperthermie. Dargestellt sind die verschiedenen Komponenten, die für die Hyperthermie-Erzeugung und Temperaturaufzeichnung notwendig waren.

Die Temperaturaufzeichnung erfolgte mittels FOTEMP-Assistent-Software und begann, nachdem die Tür des Brutschranks verschlossen wurde. Nach Erreichen der jeweiligen Zieltemperatur wurde diese für 60 Minuten durch Regulation der Brutschranktemperatur mittels Temperaturregulationseinheit des Brutschranks sowie Raumluftzufuhr aufrechterhalten. Ein repräsentativer Temperaturgraph pro Versuchstemperatur ist in Abbildung 6 gezeigt. Tabelle 10 veranschaulicht die entsprechenden CEM43-Werte (Berechnung und Bedeutung siehe Abschnitt 5.2.5.1). Nach der einstündigen Erwärmung wurden die Mikrotiterplatten dem Brutschrank entnommen und die Sphäroide unter der Sicherheitswerkbank mittels Ein-Kanal-Pipette in je ein Eppendorfgefäß pro Versuchstemperatur überführt. Die Temperaturbehandelten Sphäroide wurden anschließend unter dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop entsprechend Abschnitt 5.2.6 analysiert.

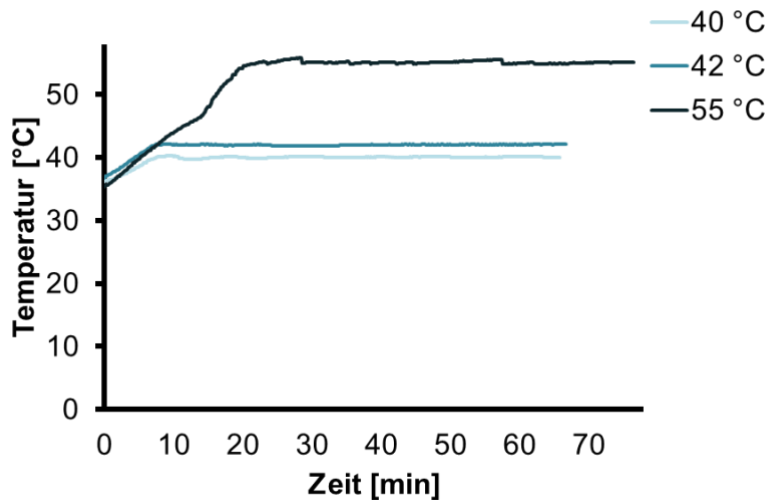


Abbildung 6: Repräsentative Temperaturgraphen der Brutschrank-Hyperthermie von Hetero-Sphäroiden und PANC-1-Sphäroiden.

Tabelle 10: CEM43-Werte der Brutschrank-Hyperthermie von Hetero-Sphäroiden und PANC-1-Sphäroiden.

Versuchs-temperatur [°C]	CEM43 [min]
40	$1,00 \pm 0,02$
42	$15,35 \pm 0,23$
55	$2,71 \cdot 10^5 \pm 6,46 \cdot 10^3$

5.2.5.3 Magnetische Hyperthermie

Eine magnetische Hyperthermie wurde mit PANC-1- und Hetero-Sphäroiden, die 7 Tage kultiviert wurden, bei 40 °C, 42 °C sowie 55 °C durchgeführt. Hierfür wurden jeweils 15 PANC-1- und Hetero-Sphäroide unter der Sicherheitswerkbank mittels Ein-Kanal-Pipette der Mikrotiterplatte entnommen und in ein Rundboden-Röhrchen überführt. Eventuell mit überführtes Medium wurde abgenommen und durch 100 µl zelltypisches Medium mit Nanopartikeln ersetzt. Die Konzentration der zugegebenen Nanopartikel lag bei 7,5 µg Fe/µl Medium bei den Temperaturen 37 °C, 40 °C und 42 °C. Im Falle der Hyperthermie bei 55 °C betrug die Konzentration 25 µg Fe/µl Medium. Die bei 37 °C belassene Probe diente als Referenzprobe, wohingegen die auf 55 °C erwärmte Probe die Positivkontrolle darstellte. Für die Erzeugung eines Magnetwechselfeldes wurde das präklinische

magnetic alternating current hyperthermia (MACH)-System verwendet (Abbildung 7).

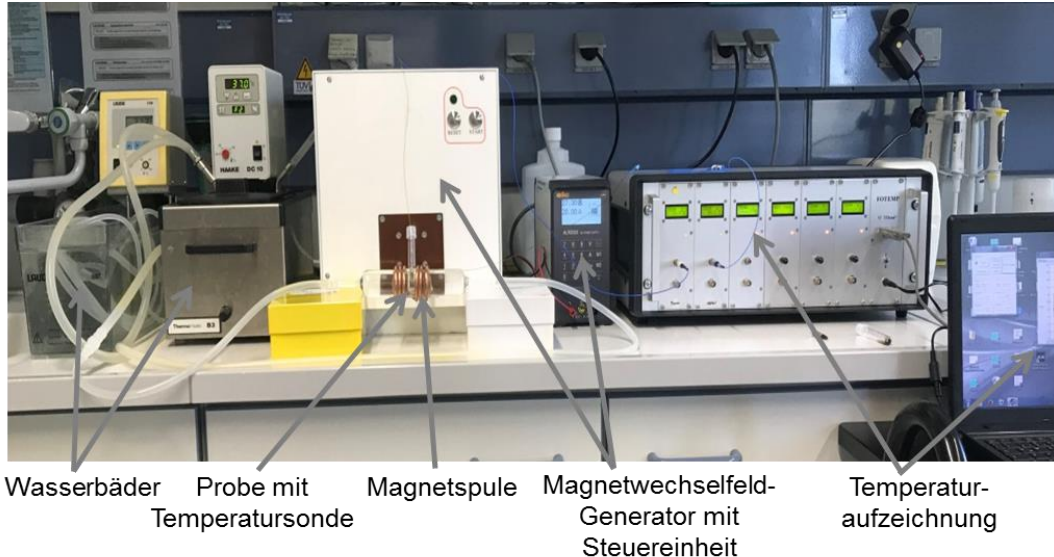


Abbildung 7: Versuchsaufbau für die Hyperthermie generiert durch eisenoxidhaltige magnetische Nanopartikel im Magnetwechselfeld. Dargestellt sind die verschiedenen Komponenten, die für die Hyperthermie-Erzeugung und Temperaturaufzeichnung notwendig waren.

Die Proben wurden in die Probenhalterung des präklinischen MACH-Systems eingebracht. Zur Temperaturgenerierung wurde in das Probenröhrchen eine zuvor kalibrierte fiberoptische Temperaturmesssonde (verbunden mit Temperaturmessgerät) zur Temperaturaufzeichnung getaucht. Zur Kühlung der Magnetspule wurde ein Wasserkreislauf mit auf 24 °C temperiertem Wasserbad angelegt. Ein zweiter Wasserkreislauf erwärmte ein spezialangefertigtes Glasrohr mit Probenhalterung auf eine Temperatur von 37 °C, sodass die Probe nach Platzierung in der Haltevorrichtung durch das bereits vorgewärmte Glasrohr auf eine Temperatur von 37 °C erwärmt wurde. Bei Erreichen von 37 °C in der Probe wurde die Temperaturaufzeichnung mittels FOTEMP-Assistent-Software gestartet. Nach einer Vorlaufzeit von 30 s wurde das Magnetwechselfeld bei einer Spannung von 15 V eingeschaltet. Die Spannung wurde im weiteren Verlauf zwischen 15 V und 28 V bei einer Feldstärke H von 6,62 bis 8,49 kA/m und Frequenz f von 1,048 MHz zur Einstellung der entsprechenden Zieltemperatur variiert. Nach Erreichen der jeweiligen Zieltemperatur wurde diese für 60 Minuten

aufrechterhalten, wobei Abbildung 8 repräsentative Temperaturgraphen und Tabelle 11 die dazugehörigen CEM43-Werte (Berechnung und Bedeutung siehe Abschnitt 5.2.5.1) zeigt. Anschließend wurde der Magnetwechselfeld-Generator ausgeschaltet und die Temperaturaufzeichnung für weitere 30 s fortgeführt. Nach der Magnetwechselfeld-Behandlung wurde das Rundboden-Röhrchen wieder aus der Halterung entfernt und die Nanopartikel-Medium-Suspension wurde mittels Ein-Kanal-Pipette entfernt. Es folgte ein dreimaliges Waschen der Zellen mit HBSS, um die Nanopartikel-Rückstände zu entfernen und eine Überführung der Sphäroide in je ein Eppendorfgefäß pro Versuchstemperatur. Die temperaturbehandelten PANC-1- und Hetero-Sphäroide wurden anschließend unter dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop entsprechend Abschnitt 5.2.6 mikroskopiert.

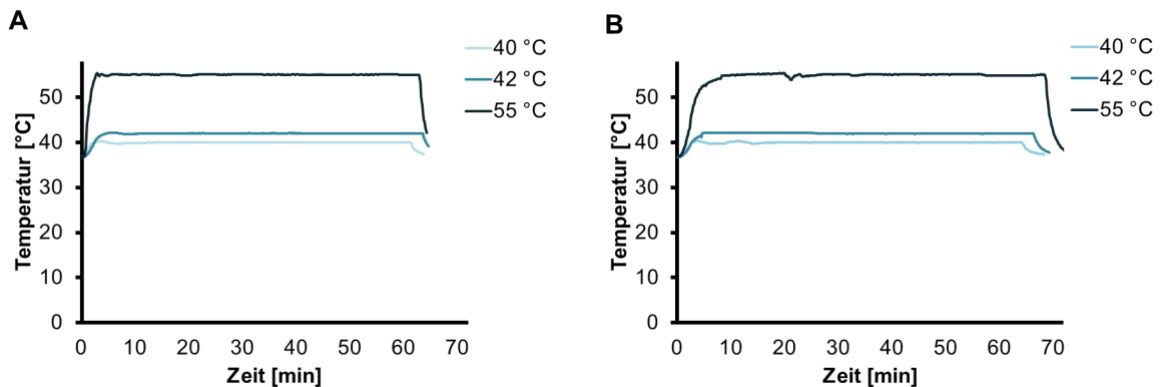


Abbildung 8: Repräsentative Temperaturgraphen der magnetischen Hyperthermie von Hetero-Sphäroiden (A) und PANC-1-Sphäroiden (B).

Tabelle 11: CEM43-Werte der magnetischen Hyperthermie von Hetero-Sphäroiden und PANC-1-Sphäroiden.

Versuchstemperatur [°C]	Hetero-Sphäroide CEM43 [min]	PANC-1-Sphäroide CEM43 [min]
40	$0,95 \pm 0,02$	$0,98 \pm 0,02$
42	$15,42 \pm 0,15$	$15,89 \pm 0,53$
55	$2,56 \cdot 10^5 \pm 3,11 \cdot 10^3$	$3,13 \cdot 10^5 \pm 7,18 \cdot 10^4$

5.2.6 Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop

Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) ermöglicht fluoreszierende Proben, die durch einen Laser bestrahlt wurden, zu analysieren. Ein besonderer Vorteil der konfokalen Mikroskopie besteht in der Aufnahme dreidimensionaler

Bilder, welche durch das Einstellen eines *Pinholes* realisiert werden (Roderfeld et al. 2003).

Zur Analyse strukturspezifischer Eigenschaften von kollagenen Fasern in murinen Sehnen und Hetero-Sphäroiden, findet die *Second Harmonic Generation*-Mikroskopie Anwendung. Die Vitalitätsuntersuchung der Zellen in PANC-1- als auch in Hetero-Sphäroiden erfolgte durch Markierung Vitalitäts-, Apoptose- und Nekrose-typischer Zellmerkmale mittels Fluoreszenzfarbstoffen. Beide Anwendungen werden nachfolgend beschrieben. Die Anregungswellenlänge der Laser und der Detektionsbereich des emittierten Lichts wurden entsprechend angepasst.

5.2.6.1 *Second Harmonic Generation*-Mikroskopie

Als *Second Harmonic Generation* (SHG) bezeichnet man eine Frequenzverdopplung des, durch ein Multiphotonen-Mikroskop, eingestrahlt Laserlichts. Die Frequenzverdopplung erfolgt strukturspezifisch in kristallinen, nicht-zentrosymmetrischen Geweben (Cox et al. 2003). Die potentesten SHG-Signal-Erzeuger in Geweben sind native fibrilläre Kollagenfasern (Georgiou et al. 2000). Da Kollagenfasern durch thermische Denaturierung die SHG-erzeugende Struktur verlieren, korreliert die SHG-Signalintensität mit dem Anteil intakter Kollagenfasern in einem Gewebe (Theodossiou et al. 2006).

Für die Versuche wurden zum einen Mausehnen, die hyperthermen Temperaturen ausgesetzt wurden, verwendet (siehe Abschnitt 5.2.4.1). Zum anderen wurden Hetero-Sphäroide, die entweder einer magnetischen oder einer Brutschrank-Hyperthermie unterzogen wurden, genutzt. Der Einfluss einer Hyperthermie-Behandlung auf die Strukturintegrität fibrillärer kollagener Fasern in den Proben wurde mittels CLSM überprüft. Die Proben wurden in dreidimensionaler Aufnahmetechnik (z-stack) bei 10facher (Sphäroide) bzw. 20facher (Sehnen) Vergrößerung unter Verwendung der in Tabelle 12 dargestellten Einstellungen analysiert. Zur Darstellung und Vermessung des Volumens der Sphäroide wurden zusätzliche dreidimensionale Hellfeldbilder der Sphäroide unter Verwendung des *transmitted light-Detectors* (T-PMT) aufgenommen.

Die Auswertung der SHG-Signalintensitäten wurde mit der Software Fiji durchgeführt. Dazu wurden die sehn- bzw. sphäroiddarstellenden Aufnahmeebenen aufsummiert (*z-project*) und der Hintergrund automatisiert subtrahiert (*subtract background*). Für die Messung der Signalintensitäten signalgebender, also intakter, Kollagene wurden *Regions of interest* (ROIs) definiert (siehe Tabelle 13). Die Signalintensitäten in den Sehnen wurden durch Bestimmung der *Mean Gray Value* der ROIs ermittelt. ROIs, deren Fläche mehr als 50 % außerhalb der zu analysierenden Sehne lagen, wurden von der Auswertung ausgeschlossen. In den Sphäroiden wurde die Intensität signalgebender Strukturen innerhalb der *Region of interest* mittels *Integrated Density* (Produkt aus *Mean Gray Value* und Fläche signalgebender Strukturen) bestimmt. Die so ermittelten Werte werden im Ergebnisteil als relative Größen in Bezug auf die jeweiligen Referenzproben (37 °C-Proben) angegeben.

Tabelle 12: Mikroskop-Einstellungen zur Generierung eines SHG-Signals in kollagenen Fasern.

Probe	Extinktionswellenlänge [nm]	Emissionswellenlänge [nm]	Laserleistung [%]	Gain	Offset	Falschfarbe
kryofixierte Sehnen (20 µm)	880	< 485	15	500	200	keine
Hetero-Sphäroide	880	< 485	15	400	52	keine

Tabelle 13: Eigenschaften der Regions of interest (ROIs).

Probe	Form	Durchmesser [Pixel]	Anzahl	Mitte der ROI (x-, y-Koordinate) [Pixel]
Sehnen	quadratisch	50	4	in Entfernung zur Sehnenmitte: - ROI 1: -35, -35 - ROI 2: +35, -35 - ROI 3: +35, +35 - ROI 4: -35, +35
Sphäroide	rund	350	1	256, 256

5.2.6.2 Fluoreszenz-Mikroskopie

Um die Vitalität von Zellen zu prüfen, kann man sich die unterschiedlichen Eigenschaften verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorophore) zu Nutze machen. Für die Versuche wurde ein *Apoptosis/Necrosis Detection Kit* verwendet, der drei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe beinhaltet. Das CytoCalcein Violet 450 ist membrangängig und wird durch ubiquitäre intrazelluläre unspezifische Esterasen im Zytoplasma lebender Zellen in seine fluoreszierende Form gespalten. Bei der Apoptoseinduktion wird das in Zellmembranen befindliche Phospholipid Phosphatidylserin, das sich normalerweise auf der zytosolischen Membranseite befindet, auf die Außenseite der Membran verlagert. Apoptin Green Indicator bindet das Phosphatidylserin auf der Membranaußenseite. 7-AAD (7-Aminoactinomycin) ist ein Kernfarbstoff, der nicht membrangängig ist und somit lediglich den Zellkern nekrotischer Zellen (durch Destruktion von Zellmembranen bei der Nekrose) fluoreszenzmikroskopisch anfärben kann (Ayan et al. 2017).

Zur fluoreszenzmikroskopischen Vitalitätsanalyse wurden die PANC-1- und Hetero-Sphäroide, nachdem sie der Brutschrank- oder magnetischen Hyperthermie ausgesetzt waren, entsprechend den Herstellerangaben mit dem *Apoptosis/Necrosis Detection Kit* inkubiert. Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme erfolgte am CLSM mit 10facher Vergrößerung in dreidimensionaler Aufnahmetechnik (*z-stack*). Die farbstoffspezifischen Einstellungen zeigt Tabelle 14. Zur Darstellung der Sphäroide wurden zusätzlich Hellfeldbilder unter Verwendung des transmitted light-Detectors (T-PMT) aufgenommen. Für die Auswertung der Anteile vitaler, apoptotischer und nekrotischer Zellen an der Gesamtzahl fluoreszenzmikroskopisch dargestellter Zellen, wurde eine *Region of interest* (ROI) definiert (ROI entspricht dem ROI der Sphäroide in Abschnitt 5.2.6.1, siehe Tabelle 13). Innerhalb dieser ROI wurden die Zellen nach Aufsummieren der Bilder in der z-Ebene (*z-project*) manuell unter Verwendung des Zellzählers der Software Fiji ausgezählt.

Tabelle 14: Auflistung der verwendeten Einstellungen für die verschiedenen Fluorophore und deren Bedeutung.

Fluorophor	Exzitationswellenlänge [nm]	Emissionswellenlänge [nm]	Falschfarbe
CytoCalcein Violet 450	405	450	blau
Apopxin Green Indicator	488	525	grün
7-Aminoactinomycin	561	647	rot

5.2.7 Histologie

5.2.7.1 Probenvorbereitung und Anfertigen von Paraffinschnitten

Für die histologischen Untersuchungen wurden sowohl kultivierte PANC-1- als auch Hetero-Sphäroide verwendet. Zum einen wurden diese Sphäroide mittels der Piko-Siriusrot-Färbung auf das Vorhandensein kollagener Fasern analysiert und zum anderen wurde die Lokalisation internalisierter Eisenoxid-Nanopartikel mit Hilfe der Berliner-Blau-Reaktion untersucht. Im Falle letztgenannter Färbemethode wurde den Sphäroiden am sechsten Kultivierungstag ein nanopartikelhaltiges Medium (100 µg Fe/ml Medium) für einen Zeitraum von 24 Stunden zugegeben, bevor dieses durch dreimaliges Waschen mit HBSS entfernt wurde.

Für beide Färbemethoden wurden die Sphäroide mittels Ein-Kanal-Pipette in Eppendorfgefäße überführt und mittels 5prozentiger Formaldehydlösung für ein bis drei Tage fixiert und anschließend in Agaroseblöcke eingebettet. Die sphäroidhaltigen Agaroseblöcke wurden in Gewebe-Einbettkassetten gegeben und bis zur Paraffineinbettung in Formaldehydlösung gelagert bzw. bei längerer Lagerungszeit in PBS umgelagert. Wenn keine Umlagerung stattfand, wurden die Proben vor der Einbettung mit Leitungswasser gewässert.

Die Einbettung der Proben erfolgte durch den Gewebeeinbettautomaten „Leica TP1020“. Dabei durchliefen die Proben die in Tabelle 15 aufgeführten Schritte. Anschließend wurden die Proben mittels Paraffinausgießstation „Leica EG1160“ in Paraffinblöcke gegossen und bis zum Schneiden im Gefrierschrank bei -20 °C gelagert. Die Paraffinschnitte wurden durch das elektronische Rotationsmikrotom „HM 340E“ mit einer Dicke von 5 µm angefertigt. Hierfür wurden die Schnitte zunächst in einen Glaskasten gegeben, der mit Raumtemperatur warmem Wasser gefüllt war, um Luftblasen zu entfernen. Anschließend wurden sie zum Strecken

in ein 40 °C temperiertes Wasserbad überführt, bevor sie auf die Objektträger aufgezogen wurden.

Tabelle 15: Schritte der Einbettung von Sphäroiden mittels Gewebeeinbettautomat.

Häufigkeit des Schrittes	Substanz	Dauer [h]
2	Ethanol 70 %	1
2	Ethanol 96%	1
2	Ethanol 100%	1
1	Ethanol 100% + Xylol 100% (1:1)	1
2	Xylol 100 %	1
2	Paraffin	1

5.2.7.2 Pikro-Siriusrot-Färbung

Die Pikro-Siriusrot-Färbung ermöglicht den Nachweis von Kollagen in den Sphäroiden, wobei Zellen gelb und kollagene Fasern rot erscheinen (Junqueira et al. 1978).

Das Paraffin der angefertigten Schnitte wurde durch Xylol und eine absteigenden Alkoholreihe entsprechend Tabelle 16 entfernt.

Tabelle 16: Entfernung von Paraffin für die Pikro-Siriusrot-Färbung.

Häufigkeit des Schrittes	Substanz	Dauer [min]
1	Xylol 100 %	20
1	Xylol 100 %	2
2	Ethanol 100 %	2
2	Ethanol 96%	2
1	Ethanol 70%	2
3	Leitungswasser	spülen
1	<i>Aqua destillata</i>	spülen

Die Färbung, das Auswaschen der Färbelösung und die Dehydrierung der Schnitte erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol entsprechend Tabelle 17. Die Objektträger wurden anschließend mittels Einbettmedium „Pertex®“ und Deckgläsern eingedeckt. Die Analyse der Schnitte erfolgte mit dem Mikroskop AxioPlan 2 und der Software AxioVision SE64 4.9.

Tabelle 17: Pikro-Siriusrot-Färbung und Dehydrierung.

Häufigkeit des Schrittes	Substanz	Dauer [min]
1	Pikro-Siriusrot-Färbelösung	40
1	HCl-Spüllösung (= 400 ml <i>Aqua destillata</i> + 4 ml 1N Salzsäure [HCl])	spülen
1	HCl-Spüllösung (= 400 ml <i>Aqua destillata</i> + 4 ml 1N Salzsäure [HCl])	2
2	Ethanol 96%	spülen
1	Ethanol 100%	spülen
1	Ethanol 100%	2
1	Ethanol 100 % + Xylol 100 % (1:1)	2
1	Xylol 100 %	2
1	Xylol 100 %	bis zum Eindecken

5.2.7.3 Berliner-Blau-Reaktion

Die Berliner-Blau-Reaktion ermöglicht eine Lokalisation der internalisierten Eisenoxid-Nanopartikel, wobei diese blau dargestellt werden (Lang 2012). Zur Darstellung der Sphäroidzellen wurden die Zellkerne dieser mittels Kernechtrot gegengefärbt (Lang 2012).

Das Paraffin der Schnitte wurde unter Verwendung von Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe entfernt (siehe Tabelle 18).

Tabelle 18: Entfernung von Paraffin für die Berliner-Blau-Reaktion.

Häufigkeit des Schrittes	Substanz	Dauer [min]
2	Xylol 100 %	5
1	Ethanol 96%	5
1	Ethanol 70%	5
1	Ethanol 50%	5
1	<i>Aqua destillata</i>	5

Die Färbung, das Auswaschen der Färbelösung und die Dehydrierung der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol erfolgte entsprechend Tabelle 19. Die Objektträger wurden anschließend entsprechend Abschnitt 5.2.7.2 eingedeckt und analysiert.

Tabelle 19: Berliner-Blau-Reaktion, Kernechtrot-Färbung und Dehydrierung.

Häufigkeit des Schrittes	Substanz	Dauer [min]
1	Kaliumferrocyanid 10 % (= 300 ml <i>Aqua destillata</i> + 30 g Kaliumhexacyanoferrat (II) Trihydrat)	5
1	HCl 20 % + Kaliumferrocyanid 10 % (1:1)	30
3	<i>Aqua destillata</i>	5
1	Kernechtrot	3
1	<i>Aqua destillata</i>	spülen

5.2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software GraphPad PRISM Version 6.01 unter Verwendung des ungepaarten t-Tests mit *Welch's correction* bei Normalverteilung. Zur Berechnung der Signifikanzen wurden die gewichteten Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten verwendet.

Das Signifikanzniveau wird in Abhängigkeit des p-Wertes wie folgt codiert (Tabelle 20).

Tabelle 20: Kodierung der Signifikanzen.

	p-Wert	Darstellung
nicht signifikant	$p > 0,05$	ns
signifikant	$p < 0,05$	* bzw. #
hoch signifikant	$p < 0,01$	** bzw. ##
höchst signifikant	$p < 0,001$	*** bzw. ###
höchst signifikant	$p < 0,0001$	**** bzw. ####

6 Ergebnisse

6.1 Reduktion intakter fibrillärer Kollagenfasern durch milde Hyperthermie

Abbildung 9 veranschaulicht den Effekt einer einstündigen Behandlung mit verschiedenen Temperaturen im Bereich der milden Hyperthermie von 39 °C bis 42 °C auf die Strukturintegrität kollagener Fasern in murinen Sehnen.

Mit steigender Temperatur zeigte sich eine zunehmende Reduktion intakter Fasern, sodass nach einer einstündigen Temperierung auf 40 °C nur noch 27,1 % der Fasern verglichen mit der Referenzprobe intakt waren ($p < 0,01$). Bei einer Behandlung mit 42 °C verstärkte sich dieser Effekt, sodass bei dieser Temperatur nur noch 8,6 % der Kollagenfasern intakt waren ($p < 0,01$).

Da es für nachfolgende Experimente entscheidend war, Temperaturen zu verwenden, bei denen eine deutliche Reduktion intakter Kollagenfasern stattfand, wurden die Temperaturen von 40 °C und 42 °C für diese verwendet.

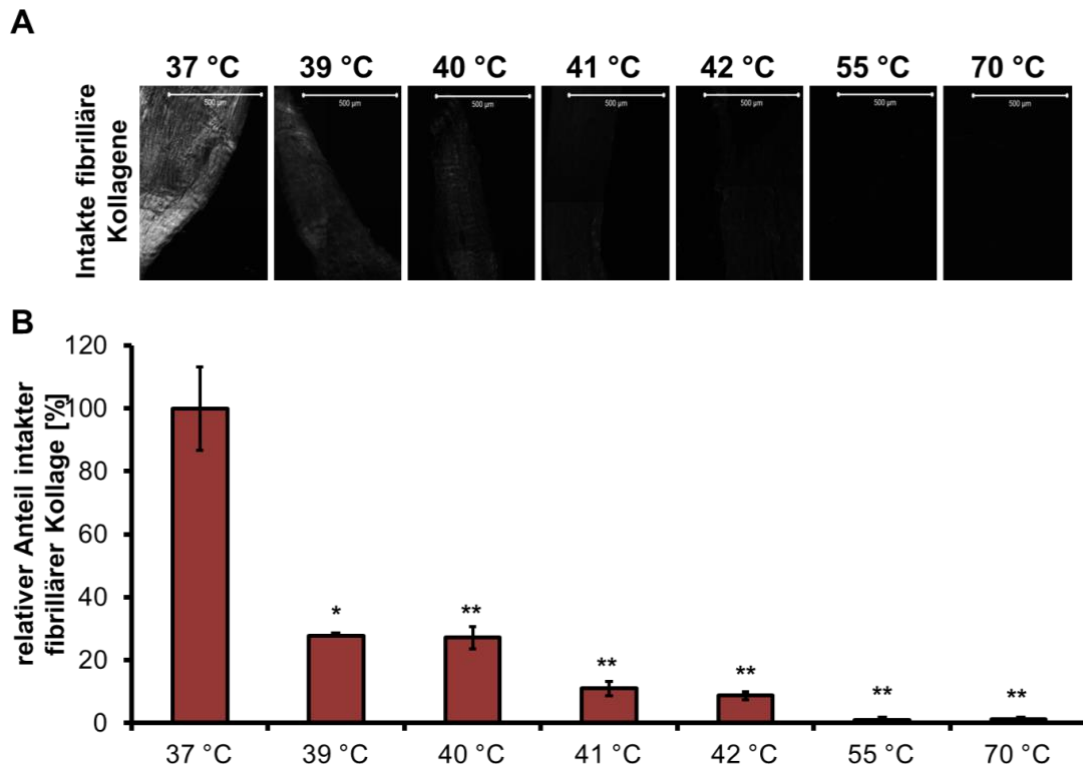


Abbildung 9: Effekte verschiedener Temperaturen auf die Struktur fibrillärer Kollagenfasern. A) Als Kollagenquelle dienten die Achillessehnen toter NMRI-Foxn1nu/Foxn1nu-Mäuse, die für eine Stunde mit verschiedenen Temperaturen im Bereich von 37 °C bis 70 °C behandelt wurden. Der Anteil intakter fibrillärer Kollagene erfolgte mit Hilfe der *Second Harmonic Generation*-Mikroskopie (20fache Vergrößerung, Skala: 500 µm). B) Bestimmung des relativen Anteils intakter Kollagenfasern nach Temperaturbehandlung bezogen auf die Referenzkontrolle. Dargestellt sind die gewichteten Mittelwerte mit den entsprechenden relativen Standardfehlern bei dreifacher Versuchsdurchführung (n=3). Es werden die relevanten Signifikanzen bezogen auf die Referenzkontrolle angegeben (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

6.2 Etablierung von dreidimensionalen desmoplastischen Pankreaskarzinom-Modellen *in vitro*

6.2.1 Generierung von PANC-1-Sphäroiden in Abhängigkeit der Zellzahl

Es wurde die Fähigkeit zur Bildung und die Größe von Sphäroiden aus PANC-1-Zellen in Abhängigkeit der eingesetzten Zellzahl über einen Kultivierungszeitraum von vier Tagen untersucht. Abbildung 10 ist zu entnehmen, dass mit steigender Zellzahl die Größe der gebildeten PANC-1-Sphäroide stetig zunahm. Hierbei generierte die geringste Zellzahl an eingesetzten PANC-1-Zellen (2.500 Zellen) die flächenmäßig kleinsten Sphäroide von 0,2 mm². Die Sphäroide, die mit 10.000 Zellen/Well kultiviert wurden, wuchsen auf eine Fläche von 0,6 mm² und

waren damit im Vergleich zu den Sphäroiden, die mit geringeren Zellzahlen ausgesät wurden, makroskopisch deutlich sichtbar.

Da es für die weiteren Versuche von Bedeutung war, die Sphäroide makroskopisch zu erkennen, wurden die Sphäroide im Folgenden durch die Verwendung von 10.000 PANC-1-Zellen/Well generiert.

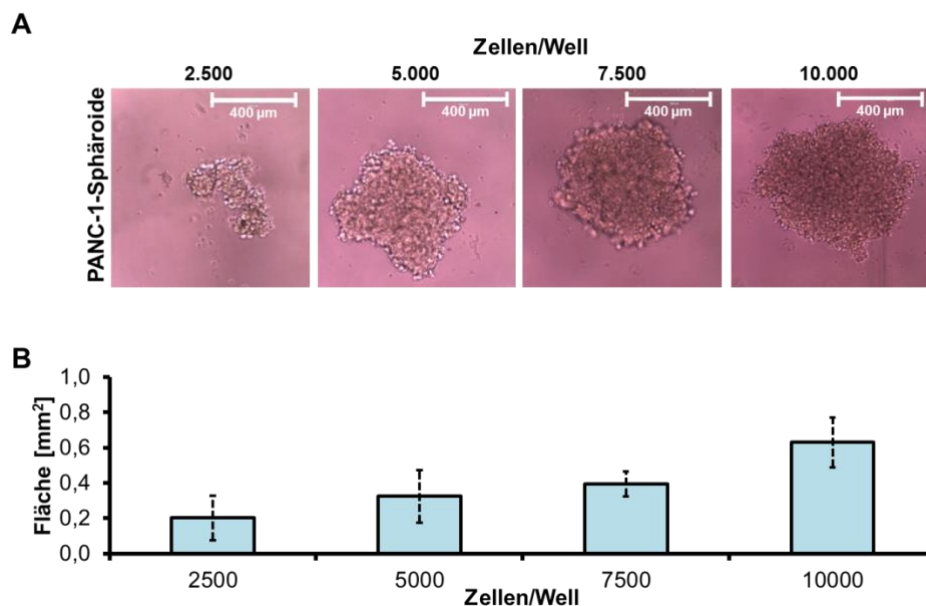


Abbildung 10: Größe der gebildeten PANC-1-Sphäroide in Abhängigkeit von der Zellzahl. Es wurden PANC-1-Zellen mit verschiedenen Zellzahlen im Bereich von 2.500 bis 10.000 Zellen/Well in 200 µl Medium ausgesät und über einen Zeitraum von 4 Tagen kultiviert. A) Die erhaltenen Sphäroide wurden lichtmikroskopisch analysiert. Skala: 400 µm. B) Bestimmung der Größe der Sphäroide, wobei die Mittelwerte bei Mehrfachbestimmung mit den entsprechenden Standardabweichungen bei einfacher Versuchsdurchführung (n=1) dargestellt sind.

6.2.2 Generierung von PANC-1-Sphäroiden in Abhängigkeit extern zugegebener Kollagenlösung

Um die desmoplastische Stromareaktion in Pankreaskarzinomen nachzubilden, wurde überprüft, ob eine externe Zugabe kollagener Lösung diese simulieren kann. Abbildung 11 zeigt die Fähigkeit von PANC-1-Zellen in Abhängigkeit einer extern zugegebenen Kollagenlösung Sphäroide zu bilden. Eine Sphäroidbildung durch die PANC-1-Zellen in Anwesenheit der Kollagenlösung war, unabhängig von der zugegebenen Kollagenmenge über einen Zeitraum von 4 Tagen nicht möglich. Demgegenüber formten sich die PANC-1-Zellen, denen kein Kollagen zugegeben wurde, zu Sphäroiden mit einer Zirkularität von 0,85 (eine Zirkularität von 1

entspricht einem Kreis). So konnte gezeigt werden, dass eine Generierung von PANC-1-Sphäroiden ohne eine extern zugegebene kollagene Lösung möglich war. Demgegenüber induzierte eine extern zugegebene Kollagenlösung keine Bildung von PANC-1-Sphäroiden, sodass für die weiteren Experimente auf die Zugabe einer Kollagenlösung verzichtet wurde.

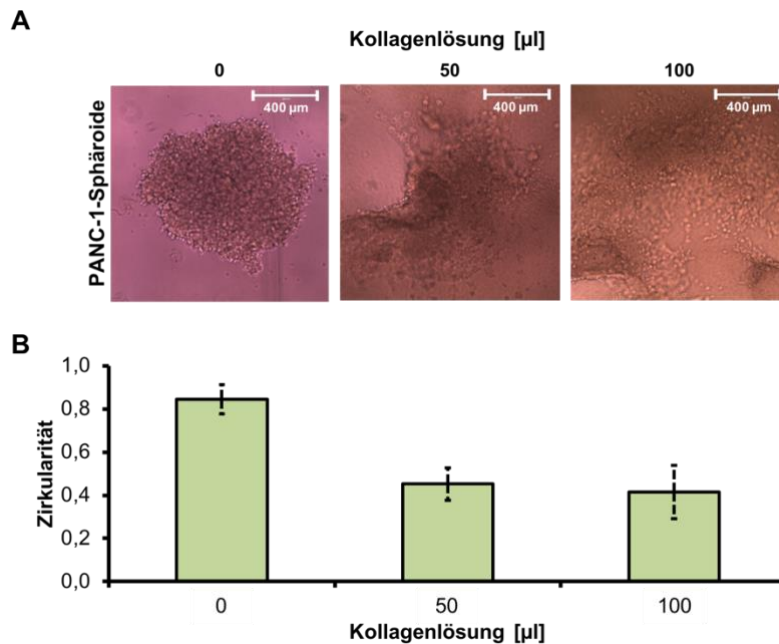


Abbildung 11: Generieren von PANC-1-Sphäroiden in An- und Abwesenheit extern zugegebener Kollagenlösung. A) Es wurden jeweils 10.000 PANC-1-Zellen in An- und Abwesenheit einer Kollagenlösung (4,42 mg/ml) in einem Well (Gesamtvolumen 200 μ l) über einen Zeitraum von 4 Tagen zur Sphäroidbildung kultiviert und lichtmikroskopisch analysiert. Skala: 400 μ m. B) Bestimmung der Zirkularität (eine Zirkularität von 1 entspricht einem Kreis) der Tumorzell-Ansammlungen. Dargestellt sind die Mittelwerte bei Mehrfachbestimmung mit den entsprechenden Standardabweichungen bei einfacher Versuchsdurchführung (n=1).

6.2.3 Charakterisierung der gebildeten PANC-1-Sphäroide

Nachdem die PANC-1-Zellzahl für die Bildung von makroskopisch sichtbaren Sphäroiden ermittelt wurde, erfolgte nun eine Bestimmung der optimalen Wachstumsdauer der Sphäroide anhand der Größe und Kompaktheit. Es wurde hierfür der jeweilige Beobachtungszeitpunkt mit dem vorangegangenen verglichen, um den Tag zu bestimmen, an dem eine Änderung der genannten Parameter stattfand.

Wie aus Abbildung 12 zu entnehmen ist, war eine Zunahme der Größe und Kompaktheit von PANC-1-Sphäroiden in Abhängigkeit einer Wachstumsdauer von 14 Tagen zu erkennen. Allerdings verhielten sich beide Parameter gegensätzlich. Während die Kompaktheit der Sphäroide bis zu einer Wachstumsdauer von 7 Tagen stetig anstieg und ab diesem Tag keine weitere Zunahme zu verzeichnen war, erfolgte die Größenzunahme der PANC-1-Sphäroide erst ab Tag 7. Die Sphäroide waren bei der Zellaussaat von 10.000 Zellen pro Well auf 200 µl bereits zu Beginn des Beobachtungszeitraums makroskopisch sichtbar und konnten so für die Versuche verwendet werden. Lichtmikroskopisch waren die Zellgrenzen der PANC-1-Zellen im Zentrum des Sphäroids nach einer Wachstumszeit von über 7 Tagen nicht mehr eindeutig voneinander abgrenzbar.

Da ab Kultivierungstag 7 keine weitere Kompaktheitzunahme zu verzeichnen war und die Sphäroide makroskopisch sichtbar waren, erschien eine längere Kultivierungsdauer nicht vorteilhaft. Die Sphäroide wurden deshalb für die folgenden Versuche über einen Zeitraum von 7 Tagen kultiviert.

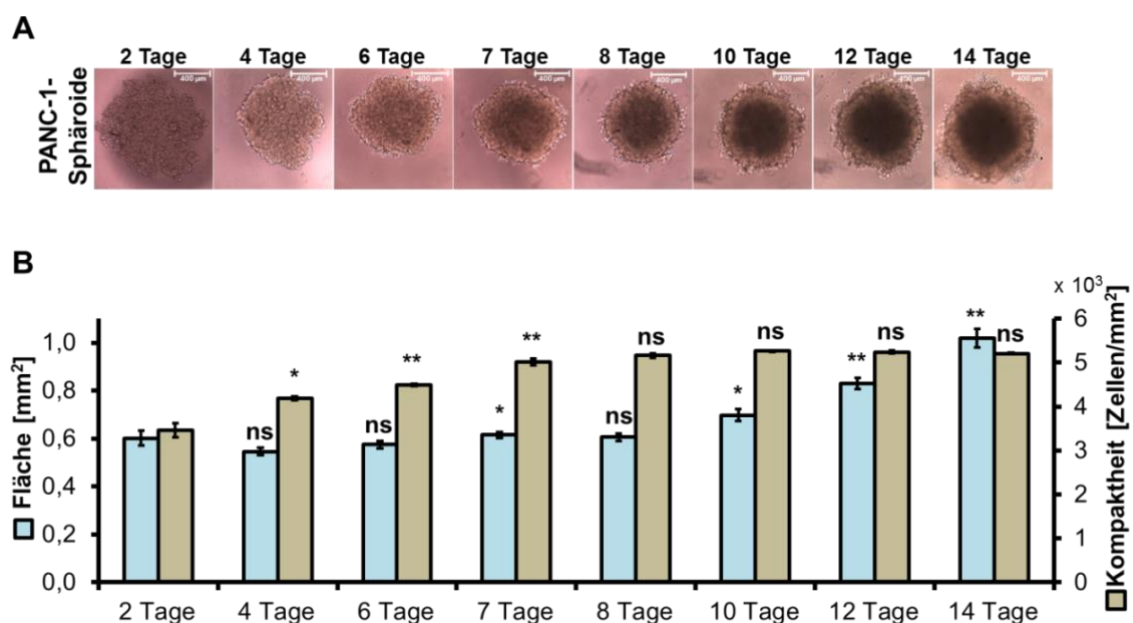


Abbildung 12: Größenwachstum und Kompaktheit von PANC-1-Sphäroiden in Abhängigkeit der Wachstumsdauer. Es wurden jeweils 10.000 PANC-1-Zellen/Well in 200 µl Medium ausgesät und über einen Zeitraum von 14 Tagen kultiviert. A) Lichtmikroskopische Untersuchung der PANC-1-Sphäroide zu den angegebenen Beobachtungszeitpunkten. Skala: 400 µm. B) Auswertung der Größe und Kompaktheit der Sphäroide zu den Beobachtungszeitpunkten mit Hilfe der Fiji Software. Dargestellt sind die gewichteten Mittelwerte mit den entsprechenden Standardfehlern bei dreifacher Versuchsdurchführung (n=3). Es werden die relevanten Signifikanzen bezogen auf den Wert des jeweils vorangegangenen Beobachtungszeitpunkts angegeben (ns = nicht signifikant; * = p < 0,05; ** = p < 0,01).

Um als nächstes zu überprüfen, ob die auf diese Weise generierten PANC-1-Sphäroide nach einer Wachstumsdauer von 7 Tagen, kollagene Fasern beinhalten, wurden eine SHG-Mikroskopie sowie Piko-Siriusrot-Färbung durchgeführt (siehe Abbildung 13). In der Mikroskopie zeigten sich vereinzelt signalgebende Strukturen mit einer stark schwankenden SHG-Signalintensität von 554 ± 601 . Die SHG-Signalintensität korreliert mit dem Anteil intakter Kollagenfasern. Die geringe Intensität kombiniert mit der hohen Schwankungsbreite zwischen den Versuchsobjekten deutet daraufhin, dass in den Sphäroiden allenfalls geringe Kollagenfasermengen vorhanden sind. Auch in den Piko-Siriusrot gefärbten PANC-1-Sphäroid-Schnitten konnten kollagene Fasern nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden.

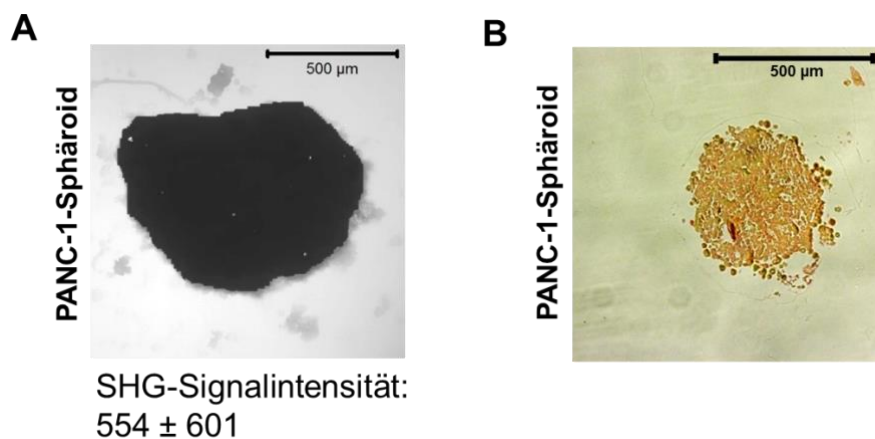


Abbildung 13: Kollagengehalt von PANC-1-Sphäroiden. Es wurden jeweils 10.000 PANC-1-Zellen/Well in 200 µl Medium über einen Zeitraum von 7 Tagen kultiviert. A) Repräsentative Darstellung von fibrillären Kollagenfasern (weiße Strukturen in schwarz dargestellten Sphäroiden) in PANC-1-Sphäroiden mittels *Second Harmonic Generation*-Mikroskopie (Skala: 500 µm). B) Repräsentative Darstellung von 5 µm dicken Piko-Siriusrot-gefärbten Paraffinschnitten von PANC-1-Sphäroiden (Zellen = gelb, Kollagen = rot).

6.2.4 Generierung von Hetero-Sphäroiden aus PANC-1- und WI-38-Zellen

Um *in vitro* 3D-Tumorzell-Modell für desmoplastische Pankreaskarzinome zu bilden, wurden heterogene Sphäroide aus PANC-1-Zellen und WI-38-Zellen gebildet. Die so generierten Sphäroide werden im Folgenden als Hetero-Sphäroide bezeichnet. Es wurden die Parameter, die zuvor für die PANC-1-Sphäroide ermittelt wurden, verwendet. Für die Formierung der Hetero-Sphäroide wurde demzufolge eine Gesamtzellzahl von 10.000 Zellen mit gleicher Anzahl an

PANC-1- und WI-38-Zellen genutzt. Diese wurden, wie die PANC-1-Sphäroide, über einen Zeitraum von 7 Tagen kultiviert und hinsichtlich Größe, Kompaktheit und Kollagengehalt charakterisiert.

6.2.4.1 Charakterisierung der gebildeten Hetero-Sphäroide

Die Abbildung 14 veranschaulicht das Wachstum und die Kompaktheit von Hetero-Sphäroiden über einen Zeitraum von 7 Tagen. Über den untersuchten Zeitraum zeigte sich eine stetige Zunahme der Kompaktheit sowie der Sphäroidgröße. An Kultivierungstag 7 wiesen die Hetero-Sphäroide eine Größe von 0,5 mm² auf und waren damit makroskopisch sichtbar. Aufgrund der Größe und der ausgeprägten Kompaktheit der Sphäroide nach 7 Kultivierungstagen, können diese für die folgenden Versuche verwendet werden.

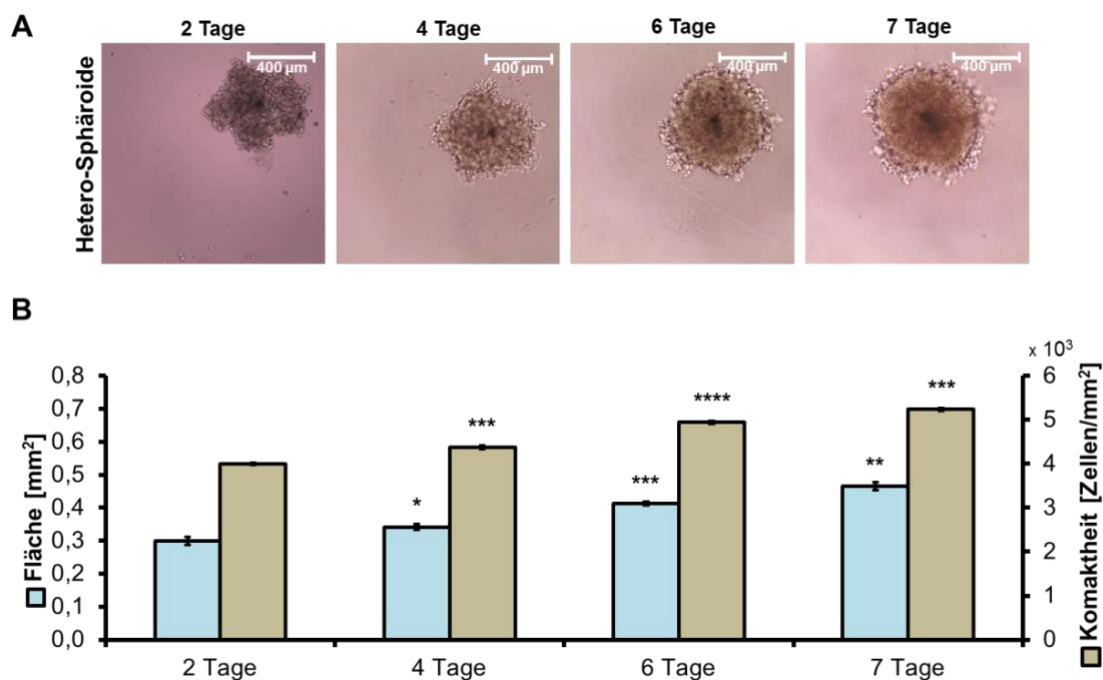


Abbildung 14: Größenwachstum und Kompaktheit von Hetero-Sphäroiden in Abhängigkeit von der Wachstumsdauer. Es wurden jeweils 5.000 PANC-1-Zellen und 5.000 WI-38-Zellen in einem Wellausgesät und über einen Zeitraum von 7 Tagen in zelltypischem Medium im Verhältnis 1:1 co-kultiviert. A) Lichtmikroskopische Darstellung der Hetero-Sphäroide zu den angegebenen Beobachtungszeitpunkten. Skala: 400 µm. B) Auswertung der Größe und Kompaktheit der Hetero-Sphäroide mit Hilfe der Fiji Software unter Angabe der gewichteten Mittelwerte mit den entsprechenden Standardfehlern bei dreifacher Versuchsdurchführung (n=3). Es werden die relevanten Signifikanzen bezogen auf den Wert des jeweils vorangegangenen Beobachtungszeitpunkts angegeben (* = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001; **** = p < 0,0001).

Die nächste Fragestellung galt der Untersuchung der Kollagenhaltigkeit der Hetero-Sphäroide. Dazu wurden eine *Second Harmonic Generation* (SHG)-Mikroskopie sowie die Pikro-Siriusrot-Färbung durchgeführt (siehe Abbildung 15). Bereits bildmorphologisch zeigte sich in der SHG-Mikroskopie eine deutliche Zunahme signalgebender Strukturen im Vergleich zu den PANC-1-Sphäroiden. Die SHG-Signalintensität betrug in den Hetero-Sphäroiden 6.425 ± 932 und war damit in etwa um das 12fache höher als in PANC-1-Sphäroiden. Da die SHG-Signalintensität mit dem Gehalt nativer Kollagenfibrillen korreliert, ist von einer 12fachen Erhöhung dieser in den Hetero-Sphäroiden im Vergleich zu den PANC-1-Sphäroiden auszugehen. Auch in den Pikro-Siriusrot gefärbten Hetero-Sphäroid-Schnitten konnte eine deutliche Zunahme kollagener Fasern verzeichnet werden.

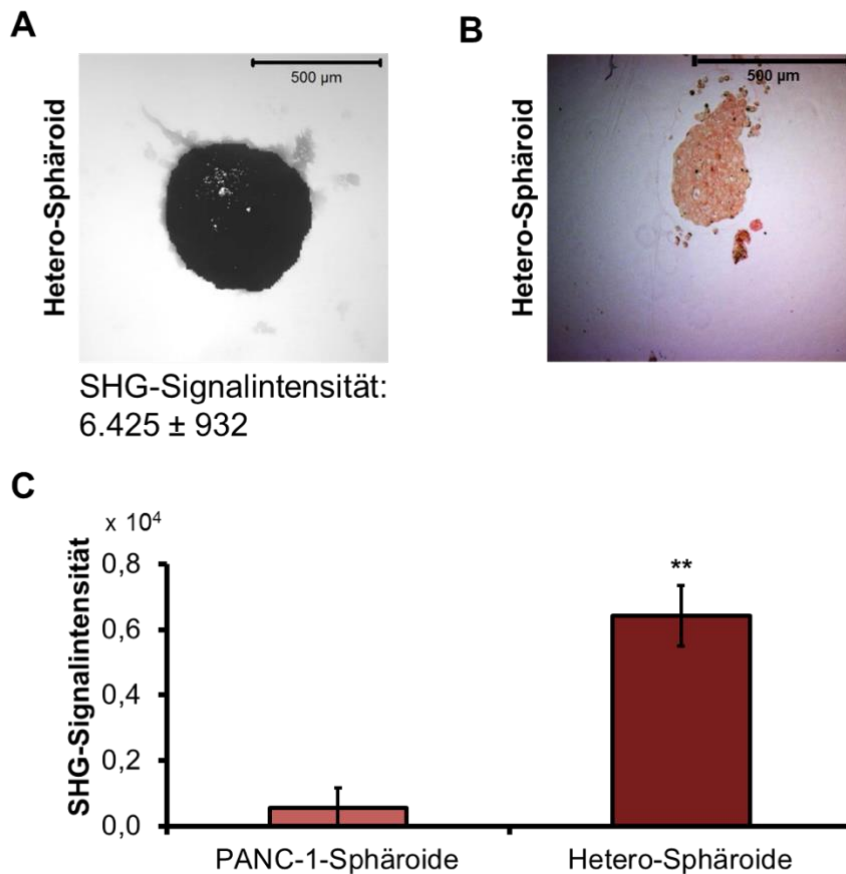


Abbildung 15: Kollagengehalt von Hetero-Sphäroiden. Es wurden jeweils 5.000 PANC-1-Zellen und 5.000 WI-38-Zellen in einem Well (200 µl Medium) ausgesät und über einen Zeitraum von 7 Tagen co-kultiviert. A) Repräsentative Darstellung von fibrillären Kollagenfasern (weiße Strukturen in schwarz dargestellten Sphäroiden) in Hetero-Sphäroiden mittels *Second Harmonic Generation*-Mikroskopie unter Angabe der Mittelwerte der *Integrated Densities* (Verrechnung aus Signalintensität und Fläche) der einzelnen Versuchsdurchführungen mit den entsprechenden Standardabweichungen. B) Piko-Siriusrot-Färbung (Zellen = gelb, Kollagen = rot) von 5 µm Paraffinschnitten von Hetero-Sphäroiden. C) Vergleich des Kollagengehalts von PANC-1- und Hetero-Sphäroiden unter Angabe der gewichteten Mittelwerte mit den entsprechenden Standardfehlern bei dreifacher Versuchsdurchführung (n=3). Es wird die Signifikanz zwischen den Vergleichswerten angegeben (** = p < 0,01).

6.3 Charakterisierung und Internalisierung von magnetischen Nanopartikeln

Die für die nachfolgenden Versuche zur Generierung der magnetischen Hyperthermie verwendeten fluidMAG/C11-D-Eisenoxid-Nanopartikel wurden hinsichtlich ihrer Eigenschaften, der Internalisierung in die Zellen sowie der intrazellulären Lokalisierung, wie in Tabelle 21 und Abbildung 16 dargestellt, charakterisiert. Die Nanopartikel waren monodispers (Pdl von < 0,2) und nicht-präzipitierend (Zetapotential < 10 mV und > -10 mV).

Tabelle 21: Charakterisierung von fluidMAG/C11-D-Eisenoxid-Nanopartikeln. Die verwendeten Nanopartikel wurden hinsichtlich der dargestellten Eigenschaften untersucht.

MNP fluidMAG/ C11-D	Size by number [nm]	Pdl	Zetapotential [mV]	Eisenkonzentration [mg/ml]
	83 ± 6	0,142 ± 0,007	-3,037 ± 0,304	87,3 ± 4,9

Die Untersuchung der Internalisierung der Partikel zeigte, dass diese nach 24stündiger Inkubation sowohl in die PANC-1-Monolayer als auch in die PANC-1- und Hetero-Sphäroide aufgenommen wurden. Allerdings erfolgte die Aufnahme in unterschiedlichem Umfang. Während in den PANC-1-Monolayern die höchste zelluläre Aufnahme erkennbar war, wiesen die PANC-1- und Hetero-Sphäroide eine 6fach bzw. 9fach geringere Aufnahme der Partikel auf (Abbildung 16 A). Die erhaltenen Werte sind auf die Nanopartikel zurückzuführen, da in den unbehandelten Monolayern und Sphäroiden kein Eisengehalt nachgewiesen werden konnte (Abbildung 16 A). Weiterhin wurde die Internalisierung der Partikel in die PANC-1- und Hetero-Sphäroid-Zellen mittels Berliner-Blau-Reaktion untersucht (Abbildung 16 B). Die anschließende lichtmikroskopische Analyse zeigte, dass die eisenhaltigen Nanopartikel in den Sphäroiden lediglich in die äußeren Zellschichten aufgenommen wurden und nicht in die Zellen im Sphäroidkern vordringen konnten. Aufgrund der wesentlich geringeren Aufnahme der Partikel war für nachfolgende Experimente bei dieser Eisenkonzentration keine Generierung einer magnetischen Hyperthermie unter dem Magnetwechselfeld möglich. Daher wurden die Nanopartikel für die weiteren Versuche zur Hyperthermie-Erzeugung in einer Konzentration von 7,5 µg Fe/µl Medium unmittelbar vor der Magnetwechselfeldbehandlung zugegeben.

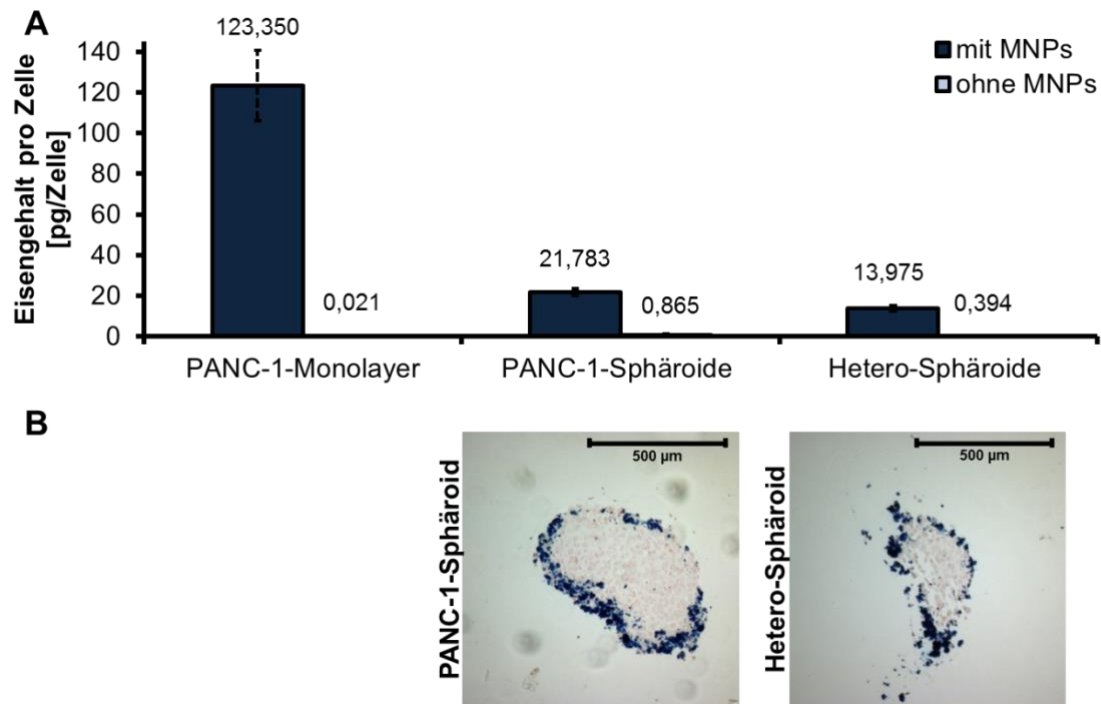


Abbildung 16: Internalisierung von fluidMAG/C11-D-Eisenoxid-Nanopartikeln. A) Quantifizierung des intrazellulären Eisengehaltes in PANC-1-Monlayern und Hetero-Sphäroiden, die für 7 Tage bei einer Zellaussaat von 10.000 Zellen/Well bei 200 µl Medium kultiviert wurden. Nach 24stündiger Inkubation mit den Nanopartikeln (100 µg Fe/ml Medium) erfolgte die Bestimmung des Eisengehaltes mittels FAAS. Angegeben sind die Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen einer Dreifachbestimmung. B) Lokalisierung der Eisenoxid-Nanopartikel in den Sphäroidkulturen mittels Berliner-Blau-Färbung und anschließender lichtmikroskopische Analyse. Skala: 500 µm.

6.4 Effekt milder Hyperthermie auf die Integrität kollagener Fasern in den generierten Hetero-Sphäroiden

Abbildung 17 zeigt den Effekt einer einstündigen milden Hyperthermiebehandlung mit den in Abschnitt 6.1 ermittelten Temperaturen 40 °C und 42 °C auf die Strukturintegrität kollagener Fasern in den generierten Hetero-Sphäroiden. Zum einen wurde die Hyperthermie durch einen Brutschrank und zum anderen durch die Verwendung eisenoxidhaltiger Nanopartikel in Anwesenheit eines Magnetwechselfeldes generiert.

Betrachtet man zunächst den Einfluss der Brutschrank-Hyperthermie auf den Anteil intakter kollagener Fasern in den Hetero-Sphäroiden, war mit steigender Temperatur eine zunehmende Reduktion intakter Fasern erkennbar. Hierbei reduzierte sich der Anteil an intakten Kollagenfasern sowohl bei 40 °C als auch bei

42 °C signifikant um mehr als 90 % verglichen mit den nativen Sphäroiden ($p < 0,01$). Weiterhin wurde gezeigt, dass sich die Größe der Hetero-Sphäroide mit steigender Temperatur vermindert. Während eine Temperatur von 40 °C das Volumen der Sphäroide nicht beeinflusste, reduzierte es sich bei einer Temperatur von 42 °C im Vergleich zur Referenzprobe hingegen um ca. 30 % ($p < 0,05$). Wie erwartet, war bei der Positivkontrolle von 55 °C die Faser- sowie Volumenreduktion noch ausgeprägter.

Bevor der Einfluss einer milden magnetischen Hyperthermie auf die Hetero-Sphäroide ermittelt wurde, wurde der Effekt magnetischer Nanopartikel, die keinem Magnetwechselfeld ausgesetzt waren, auf die Sphäroide untersucht. Die einstündige Inkubation mit den Partikeln bewirkte hierbei in den Hetero-Sphäroiden einen um 73 % verminderten Anteil an intakten Kollagenfasern verglichen mit den unbehandelten Zellen. Demgegenüber nahm das Sphäroidvolumen zu. Wurden diese Partikel anschließend einem Magnetwechselfeld ausgesetzt und Temperaturen von 40 °C bzw. 42 °C generiert, sank der Anteil intakter Kollagenfasern auf unter 10 % im Vergleich zu unbehandelten Sphäroiden. Neben einer Reduktion intakter Kollagenfasern reduzierte sich weiterhin das Volumen der Hetero-Sphäroide um 20 % durch eine magnetische Hyperthermie bei 42 °C. Vergleicht man die Wirkung der Nanopartikel in An- und Abwesenheit eines Magnetwechselfeldes (MWF) auf die Hetero-Sphäroide zeigte sich, dass die kollagenen Fasern und die Sphäroidgröße durch die Anwesenheit des MWF stärker reduziert wurden, als durch die alleinige Applikation der Partikel.

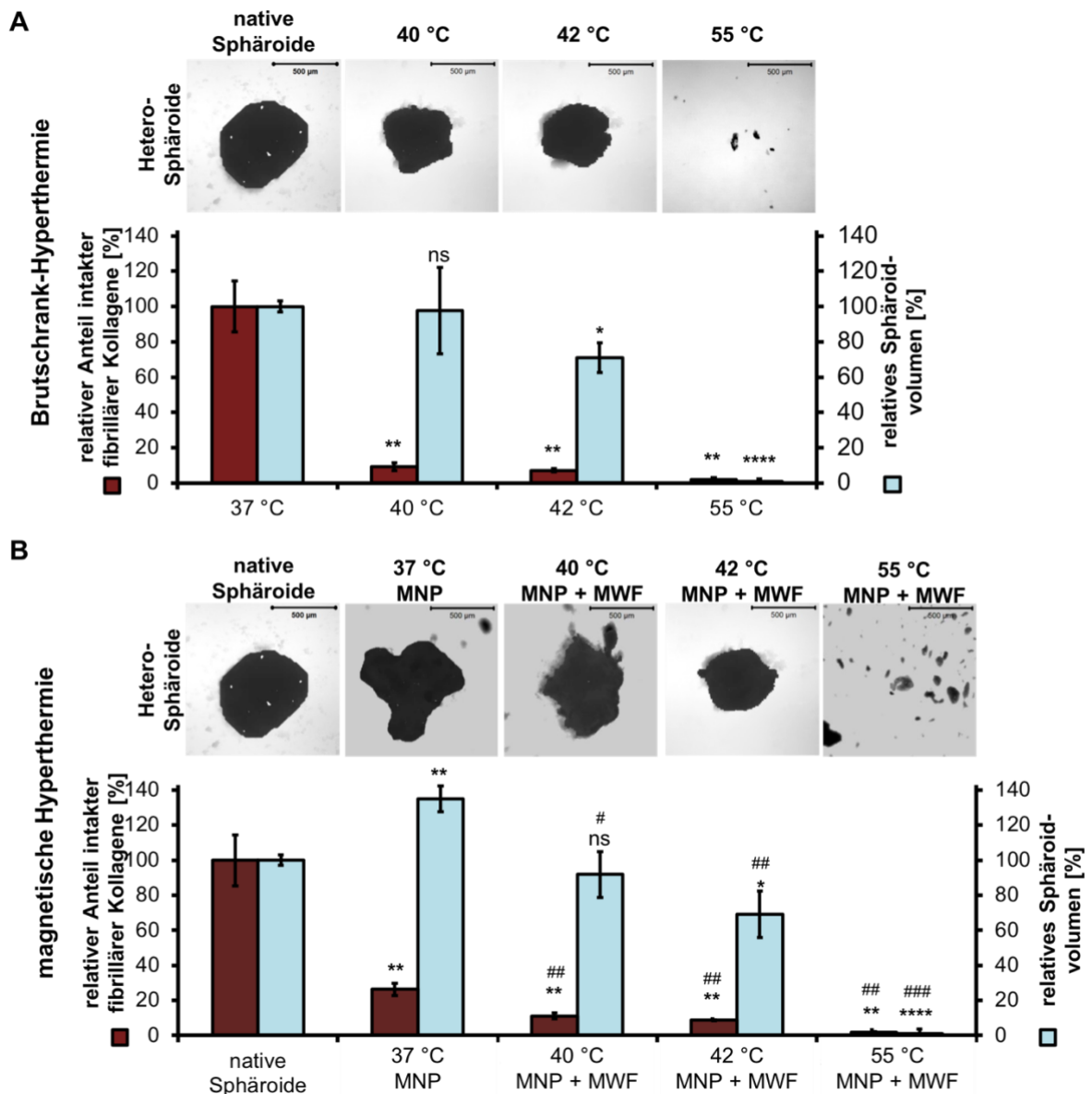


Abbildung 17: Effekte von Hyperthermie auf den Kollagengehalt und das Volumen von Hetero-Sphäroiden. Es wurden jeweils 5.000 PANC-1-Zellen und 5.000 WI-38-Zellen in einem Well ausgesät und über einen Zeitraum von 7 Tagen co-kultiviert, bevor sich eine einstündige Hyperthermie mit Temperaturen im Bereich von 40 °C bis 55 °C anschloss. Parallel dazu wurden unbehandelte Hetero-Sphäroide als Kontrolle mitgeführt. Generierung der Hyperthermie A) mit Hilfe des Brutschranks B) mit Hilfe magnetischer Nanopartikel in An- und Abwesenheit eines Magnetwechselfeldes (Feldstärke H: 6,62 - 8,49 kA/m, Frequenz f: 1,048 MHz). Dargestellt wird der Anteil intakter Kollagenfasern (weiße Strukturen in schwarz dargestellten Sphäroiden) in den Sphäroiden sowie das Sphäroidvolumen nach der Hyperthermie-Behandlung ermittelt durch *Second Harmonic Generation*-Mikroskopie. Die Auswertungen der SHG-Signalintensitäten sind bezogen auf die unbehandelten Sphäroide. Dargestellt sind die gewichteten Mittelwerte mit den entsprechenden relativen Standardfehlern bei dreifacher Versuchsdurchführung (n=3). Es werden die relevanten Signifikanzen bezogen auf die nativen Sphäroide angegeben (untere Reihe; ns = nicht signifikant; * = p < 0,05; ** = p < 0,01; **** = p < 0,0001). Zudem werden die relevanten Signifikanzen bezogen auf die den MNPs ausgesetzt und nicht durch das MWF erwärmten Sphäroide angegeben (obere Reihe; # = p < 0,05; ## = p < 0,01; ### = p < 0,001).

6.5 Effekt einer milden magnetischen Hyperthermie auf die Vitalität von Hetero-Sphäroid- und PANC-1-Sphäroid-Zellen

Abbildung 18 veranschaulicht den Effekt einer einstündigen milden magnetischen Hyperthermiebehandlung mit den in Abschnitt 6.1 ermittelten Temperaturen 40 °C und 42 °C auf die Vitalität von Hetero-Sphäroid- und PANC-1-Sphäroid-Zellen.

In den nativen Hetero-Sphäroiden war erwartungsgemäß der Großteil der Zellen vital und lediglich ein geringer Anteil apoptotisch oder nekrotisch. Eine Inkubation der Hetero-Sphäroide mit Nanopartikeln in Abwesenheit eines angelegten Magnetwechselfeldes verringerte bereits den Anteil vitaler und erhöhte den Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen innerhalb des Sphäroides verglichen mit den nativen Zellen. So reduzierte sich der Anteil vitaler Zellen im Hetero-Sphäroid auf 55 %, während die restlichen Zellen entweder nekrotisch oder apoptotisch waren. Wurden die Nanopartikel einem Magnetwechselfeld ausgesetzt, verstärkte sich dieser Effekt, sodass mit steigender Temperatur sowohl gegenüber unbehandelten Zellen als auch gegenüber den mit Nanopartikeln inkubierten und nicht erwärmten Zellen eine verstärkte Reduktion vitaler Zellen stattfand. So verminderte eine Temperatur von 40 °C die Vitalität auf 39 % und eine Temperatur von 42 °C auf 35 % ($p < 0,05$). Während die Vitalität sank, stieg der Anteil apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen in Abhängigkeit der Temperatur. So waren bei einer Temperatur von 40 °C 47 % der Zellen apoptotisch ($p < 0,01$) und 13 % nekrotisch. Bei einer Temperatur von 42 °C hingegen erhöhte sich der Anteil abgetöteter Zellen nochmals um ca. 10 %. Die durch magnetische Hyperthermie generierten Temperaturen von 40 °C und 42 °C induzierten innerhalb der Hetero-Sphäroide vorrangig Apoptose bei sinkendem Anteil vitaler Zellen. Bei einer Temperatur von 55 °C (Positivkontrolle) waren nekrotische und apoptotische Vorgänge hingegen gleichermaßen nachzuweisen.

Auch in den PANC-1-Sphäroiden verringerte bereits die alleinige Inkubation dieser mit eisenoxidhaltigen Nanopartikeln (ohne Magnetwechselfeldbehandlung) den Anteil vitaler Zellen innerhalb eines Sphäroids um 15 % im Vergleich zu den nativen Zellen. Parallel dazu erhöhte sich der Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen durch die Nanopartikel-Applikation. Durch Anwesenheit eines Magnetwechselfeldes verstärkte sich dieser Effekt wiederum. So verminderte eine Temperatur von 40 °C generiert durch MNPs die Vitalität auf 36 %. Eine

Temperatur von 42 °C durch MNPs reduzierte die vitalen Zellen pro PANC-1-Sphäroid auf 29 % ($p < 0,01$). Neben der Vitalitätsreduktion stieg der Anteil apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen in Abhängigkeit der Temperatur. Bei einer Temperatur von 40 °C waren somit 51 % der Zellen apoptotisch ($p < 0,01$) und 12 % nekrotisch. Durch eine Temperaturerhöhung auf 42 °C erhöhte sich der Anteil abgetöteter Zellen nochmals um ca. 7 %. Durch magnetische Hyperthermie wurden bei dem Absterben der PANC-1-Sphäroid-Zellen bei allen untersuchten Temperaturen vorrangig apoptotische Prozesse induziert.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine durch Nanopartikel generierte magnetische Hyperthermie mit steigenden Temperaturen zu einer Vitalitätsminderung sowohl in Hetero-Sphäroid- als auch in PANC-1-Sphäroid-Zellen führte. Der zellreduzierende Effekt war im Falle der stromaärmeren PANC-1-Sphäroide stets um ca. 5 % ausgeprägter als in den stromahaltigeren Hetero-Sphäroiden. Zudem war mit steigender Temperatur bei beiden Sphäroid-Gruppen eine Zunahme apoptotischer und nekrotischer Sphäroid-Zellen zu erkennen. Hierbei standen bei der magnetischen Hyperthermie vermehrt apoptotische Vorgänge im Vordergrund.

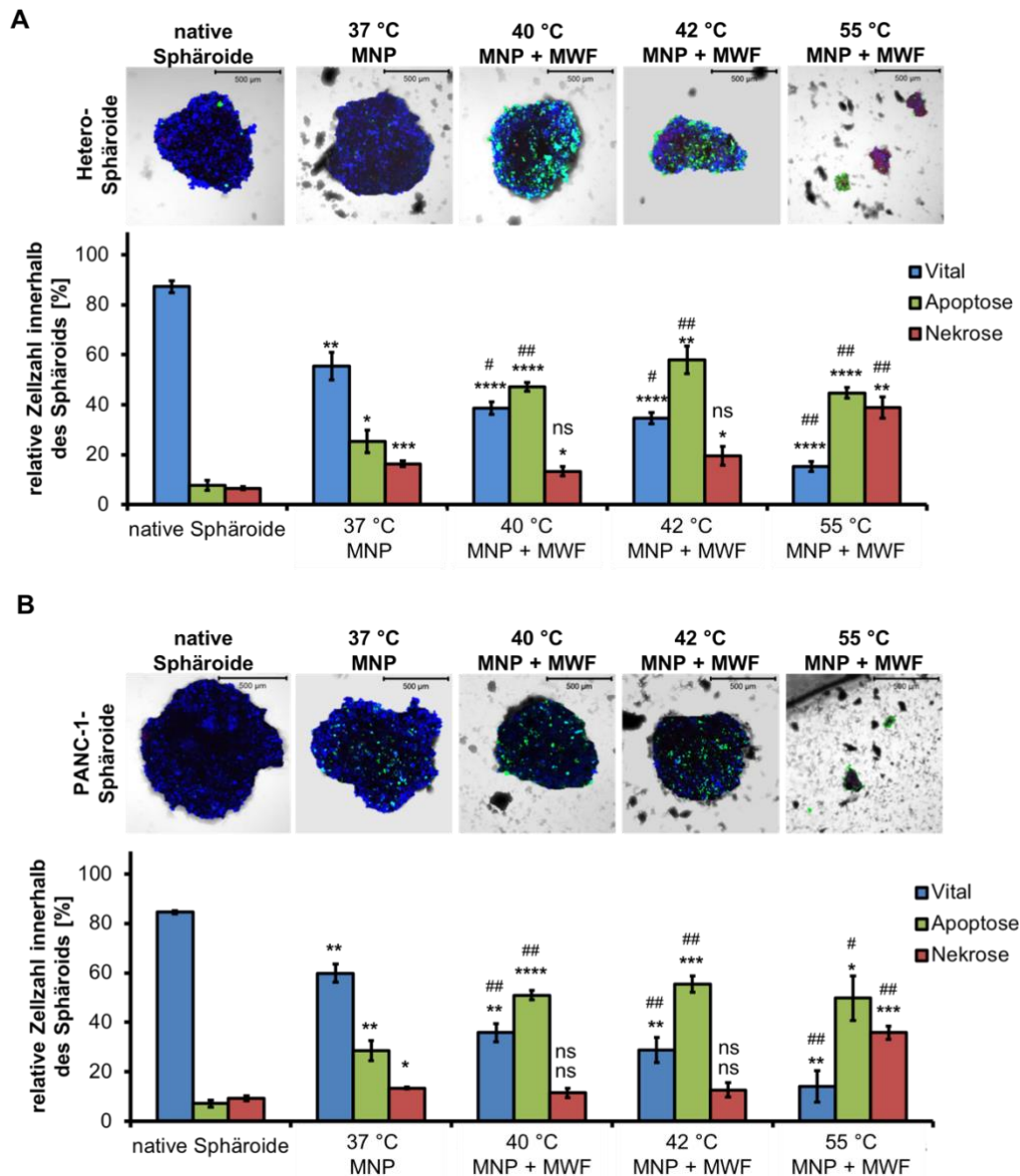


Abbildung 18: Effekte von magnetischer Hyperthermie auf die Zellvitalität von Hetero-Sphäroid- und PANC-1-Sphäroid-Zellen. A) Es wurden jeweils 5.000 PANC-1-Zellen und 5.000 WI-38-Zellen in einem Well (200 µl) ausgesät und B) es wurden jeweils 10.000 PANC-1-Zellen in einem Well (200 µl) ausgesät. Beide Ansätze wurden über einen Zeitraum von 7 Tagen kultiviert, bevor sich eine einstündige Hyperthermie mit Temperaturen im Bereich von 40 °C bis 55 °C anschloss. Parallel dazu wurden unbehandelte Sphäroide als Kontrolle mitgeführt. Generierung der Hyperthermie mit Hilfe magnetischer Nanopartikel in An- und Abwesenheit eines Magnetwechselfeldes (Feldstärke H: 6,62 - 8,49 kA/m, Frequenz f: 1,048 MHz). Dargestellt wird der Anteil vitaler (blau), apoptotischer (grün) und nekrotischer Zellen (rot) in den Sphäroiden nach der Hyperthermie-Behandlung mittels Fluoreszenzmikroskopie. Die ausgewerteten Anteile der vitalen, apoptotischen und nekrotischen Zellen sind bezogen auf die Gesamtzellzahl der fluoreszenzmikroskopisch darstellbaren Zellen pro Sphäroid. Dargestellt sind die gewichteten Mittelwerte mit den entsprechenden Standardfehlern bei dreifacher Versuchsdurchführung (n=3). Es werden die relevanten Signifikanzen bezogen auf die nativen Sphäroide angegeben (untere Reihe; ns = nicht signifikant; * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001; **** = p < 0,0001). Zudem werden die relevanten Signifikanzen bezogen auf die den MNPs ausgesetzten und nicht durch das MWF erwärmten Sphäroide angegeben (obere Reihe; ns = nicht signifikant; # = p < 0,05; ## = p < 0,01).

6.6 Effekt einer milden Brutschrank-Hyperthermie auf die Vitalität von Hetero-Sphäroid- und PANC-1-Sphäroid-Zellen

Abbildung 19 zeigt den Effekt einer einstündigen milden Brutschrank-Hyperthermie mit den in Abschnitt 6.1 ermittelten Temperaturen 40 °C und 42 °C auf die Vitalität von Hetero-Sphäroid- und PANC-1-Sphäroid-Zellen.

In unbehandelten Sphäroiden war der Großteil der Zellen vital und lediglich ein geringer Anteil abgestorbener Zellen zu verzeichnen. Die Erhöhung der Temperatur auf 40 °C bzw. 42 °C mit Hilfe des Brutschranks verminderte stetig den Anteil vitaler Hetero-Sphäroid-Zellen im Vergleich mit den Temperatur-unbehandelten Zellen auf 60 % bzw. 40 % (40 °C mit $p < 0,01$; 42 °C mit $p < 0,0001$). Demgegenüber stieg mit zunehmenden Temperaturen der Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen innerhalb der Hetero-Sphäroide auf ca. 40 % bei 40 °C und auf ca. 60 % bei 42 °C. Bei beiden Temperaturen traten apoptotische und nekrotische Zellen zu annähernd gleichen Anteilen auf. Im Falle der Behandlung der Zellen mit einer Temperatur von 55 °C (Positivkontrolle) überwogen hingegen nekrotische Vorgänge in den Hetero-Sphäroid-Zellen.

Hinsichtlich der PANC-1-Sphäroide wurde durch Temperaturerhöhung auf 40 °C bzw. 42 °C mittels Brutschranks der Anteil vitaler Sphäroid-Zellen im Vergleich mit den Temperatur-unbehandelten Zellen auf 40 % bzw. 36 % reduziert ($p < 0,01$). Dementsprechend stieg mit zunehmenden Temperaturen der Anteil apoptotischer sowie nekrotischer Zellen innerhalb des Sphäroids. Apoptose und Nekrose traten dabei zu annähernd gleichen Anteilen auf. Im Falle der Behandlung der Zellen mit einer Temperatur von 55 °C (Positivkontrolle) ließen sich - entsprechend der Beobachtungen in den Hetero-Sphäroiden - vorrangig nekrotische Vorgänge in den Sphäroid-Zellen verzeichnen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine Brutschrank-Hyperthermie mit steigenden Temperaturen zu einer Vitalitätsminderung sowohl in Hetero-Sphäroid- als auch in PANC-1-Sphäroid-Zellen führt. Der zellreduzierende Effekt war in den PANC-1-Sphäroiden stets ausgeprägter (bei 40 °C um 20 % stärker; bei 42 °C um 4,5 % stärker). Zudem war mit steigender Temperatur eine Zunahme apoptotischer und nekrotischer Sphäroid-Zellen zu erkennen. Die Brutschrank-Hyperthermie führte (entgegen der Ergebnisse der magnetischen Hyperthermie in

Abschnitt 6.5) im Temperaturbereich der milden Hyperthermie in den Zellen gleichermaßen zu Apoptose und Nekrose.

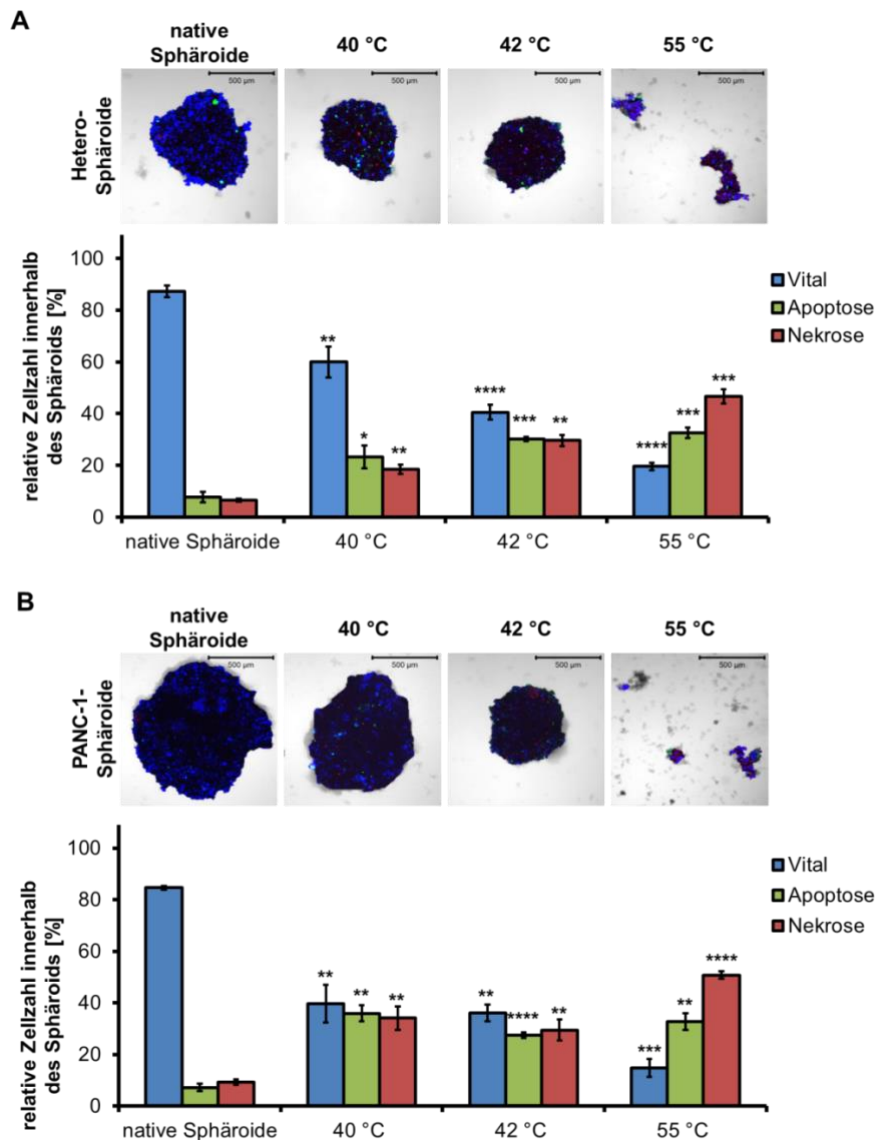


Abbildung 19: Effekte von Brutschrank-Hyperthermie auf die Zellvitalität in Hetero-Sphäroid- und PANC-1-Sphäroid-Zellen. A) Es wurden jeweils 5.000 PANC-1-Zellen und 5.000 WI-38-Zellen in einem Well (200 μ l) ausgesät und B) es wurden jeweils 10.000 PANC-1-Zellen in einem Well (200 μ l) ausgesät. Beide Ansätze wurden über einen Zeitraum von 7 Tagen kultiviert, bevor sich eine einstündige Hyperthermie mit Temperaturen im Bereich von 40 °C bis 55 °C anschloss. Parallel dazu wurden unbehandelte Sphäroide als Kontrolle mitgeführt. Generierung der Hyperthermie mit Hilfe des Brutschranks. Dargestellt wird der Anteil vitaler (blau), apoptotischer (grün) und nekrotischer Zellen (rot) in den Sphäroiden nach der Hyperthermie-Behandlung mittels Fluoreszenzmikroskopie. Die ausgewerteten Anteile der vitalen, apoptotischen und nekrotischen Zellen sind bezogen auf die Gesamtzellzahl der fluoreszenzmikroskopisch darstellbaren Zellen pro Sphäroid. Dargestellt sind die gewichteten Mittelwerte mit den entsprechenden Standardfehlern bei dreifacher Versuchsdurchführung (n=3). Es werden die relevanten Signifikanzen bezogen auf die nativen Sphäroide angegeben (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$).

7 Diskussion

Aufgrund der proteindenaturierenden und zytotoxischen Wirkung von Wärme, stellt diese einen vielversprechenden Ansatz zur Auflösung der Desmoplasie in Pankreaskarzinomen bei gleichzeitiger Reduktion der im Tumor befindlichen Zellen dar. Allerdings ist die Wirkung von Hyperthermie auf das Tumorstroma pankreatischer Tumore bisher nur unzureichend geklärt. In der vorliegenden Arbeit wurde *in vitro* gezeigt, dass eine einstündige milde Hyperthermie bei Temperaturen von 40 °C und 42 °C in der Lage ist die Strukturintegrität kollagener Fasern, welche den Hauptbestandteil des desmoplastischen Tumorstromas darstellen, in 3D-Tumorzell-Sphäroiden aus Pankreaskarzinomzellen und Fibroblasten zu beeinflussen. Weiterhin wurde demonstriert, dass diese milde Hyperthermie, neben der Faserdegradation, den Anteil vitaler Zellen innerhalb der Sphäroide reduzierte.

7.1 Reduktion intakter fibrillärer Kollagenfasern durch milde Hyperthermie

Die Untersuchung der Degeneration kollagener Fasern durch eine milde Hyperthermie zeigte eine stetige Abnahme intakter Kollagenfasern mit zunehmender Versuchstemperatur. Während eine Temperatur von 40 °C den Anteil intakter Kollagenfasern auf rund 27 % im Vergleich zu unbehandelten Proben reduzierte, verloren rund 90 % der Fasern ihre native Struktur nach der Exposition mit 42 °C.

Dieser Effekt lässt sich vermutlich darauf zurückzuführen, dass Temperaturen zwischen 40 °C und 44 °C eine irreversible Aufspaltung von Wasserstoffbrückenbindungen bewirken (Mu et al. 2007). Die in der nativen Form als Tripelhelix vorliegenden Kollagenfasern verlieren durch die Aufspaltung der Wasserstoffbrückenbindungen ihre Tertiärstruktur und defibrillieren. Diesen Vorgang bezeichnet man als Denaturierung (Mu et al. 2007, LI et al. 2010, He et al. 2012). Die wärmebedingte Denaturierung geht mit einer Strukturänderung der kollagenen Fasern einher, welche jedoch nicht mit einer Fragmentierung einzelner Kollagenstränge, wie sie beispielsweise bei enzymatischer Spaltung durch Kollagenasen stattfindet, gleichzusetzen ist (Mu et al. 2007). Der wärmebedingte

Verlust der Tertiärstruktur von Proteinen bedingt in der Regel einen Funktionsverlust des Proteins (Deutzmann und Bruckner 2014). Zudem werden denaturierte Kollagene abgebaut (Deutzmann und Bruckner 2014). Da kollagene Fasern eine Stabilisierungsfunktion in Geweben ausüben, kann bei einem Funktionsverlust der Fasern also davon ausgegangen werden, dass dieser in einer Destabilisierung und Auflockerung von Geweben resultiert (Deutzmann und Bruckner 2014).

In der Arbeit wurde für die Untersuchungen Kollagen als repräsentatives Protein für die extrazelluläre Matrix verwendet, da es zum einen den Hauptbestandteil dieser darstellt und zum anderen die Therapierbarkeit und Prognose pankreatischer Tumore maßgeblich verschlechtert (Shields et al. 2012, Ottaviano et al. 2006, Shields et al. 2011). Da murines Sehngewebe wie das Stroma von desmoplastischen Tumoren, ebenfalls hauptsächlich aus Kollagen Typ 1 besteht, wurde dieses – wie auch von Theodossiou *et al.* - als Kollagenquelle verwendet (Theodossiou et al. 2006). Von anderen Autoren wurden Kollagen Typ 1-Lösungen oder -Gele als Kollagenquellen verwendet (Artym 2016, Rajan et al. 2006). Bedingt durch die geringe Fasergröße der Kollagene von 0,3 µm war in diesen jedoch keine Analyse der Strukturintegrität durch das konfokale Laser-Scanning-Mikroskop möglich (Hulmes 2002). Da die Fasern in Sehnen jedoch gebündelt und in paralleler Anordnung vorliegen, ermöglicht die so potenzierte Kollagenmenge wahrscheinlich die mikroskopische Darstellung (Ottani et al. 2001). Die Quantifizierung intakter fibrillärer Kollagene unter dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop mittels *Second Harmonic Generation* (SHG) stellt eine leistungsfähige und bereits gut etablierte Methode dar (Chen et al. 2012). Da die für die Signalerzeugung notwendige Frequenzverdopplung nahezu ausschließlich durch native, strukturintakte Kollagenfasern hervorgerufen werden kann, korreliert die Intensität des SHG-Signals mit dem Anteil intakter Kollagenfasern in einer Probe (Stylianou et al. 2009, Hui Mingalone et al. 2018, Georgiou et al. 2000). Ein Vorteil der SHG-Mikroskopie im Vergleich zu gleichwertigen Verfahren in Bezug auf die Quantifizierung hyperthermiebedingter Kollagendegeneration, wie der Kalorimetrie oder Raman Spektroskopie, ist die Möglichkeit zur Darstellung und Analyse dreidimensionaler (3D) Strukturen (Dong et al. 2004, Miles et al. 1995, Theodossiou et al. 2002, Cox et al. 2003). Dies ermöglicht einen methoden-

unabhängigen Vergleich Hyperthermie-bedingter Faserdenaturierung in den Sehnen und in den im Folgenden verwendeten 3D-Kulturen.

Aus den genannten Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass eine einstündige milde Hyperthermie mit Temperaturen von 40 °C und 42 °C durch Denaturierungsprozesse den Anteil intakter Kollagenfasern deutlich reduzieren kann.

7.2 Geeignete 3D-Tumorzell-Modelle für die Analyse von Hyperthermie-Effekten auf desmoplastische Pankreaskarzinome

Die Etablierung eines 3D-Tumorzell-Modells für desmoplastische Pankreaskarzinome *in vitro* ergab, dass eine Generierung von makroskopisch sichtbaren, kompakten Sphäroiden sowohl durch PANC-1-Zellen als auch durch die Kombination aus PANC-1-Zellen und WI-38-Zellen bei einer Zellaussaat von 10.000 Zellen pro Well und einer Wachstumsdauer von 7 Tagen möglich war. Eine Kultivierung des PANC-1-Sphäroid-Modells war unter Zugabe einer Kollagenlösung hingegen nicht möglich.

Das Unvermögen von PANC-1-Zellen unter Kollagenzugabe Sphäroide zu generieren, könnte dadurch bedingt sein, dass Kollagenlösungen eine zelladhärierende Wirkung haben. Daher werden Kollagenlösungen häufig zur Beschichtung von Mikrotiterplatten verwendet, um nicht-adhären wachsenden Zellen am Plattenboden anzuheftend zu kultivieren (Yashiki et al. 2001). Der zelladhärierende Effekt der Kollagenlösung schien ausgeprägter zu sein, als das Bestreben der Zellen untereinander adhären zu wachsen. Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen, könnte die fraktionierte Zugabe geringer Mengen kollagener Lösung nach bereits vollzogener Sphäroid-Bildung sein. Allerdings kann es dadurch zu einer Einkapselung des Sphäroids kommen, welche mit einer Minderdiffusion der im Zellkulturmedium enthaltenen Nährstoffe und daraus resultierender Nekrose in den Sphäroidzellen einhergeht (Ling et al. 2007).

Die Untersuchung des Kollagengehalts der Sphäroide zeigte, dass die ohne Zugabe von Kollagenlösung generierten PANC-1-Sphäroide allenfalls geringe Kollagenmengen enthielten und die desmoplastischen Verhältnisse *in vivo* somit nicht widerspiegeln. Der kaum nachweisbare Kollagengehalt in den PANC-1-

Sphäroiden steht im Gegensatz zu bekannten Literaturdaten, die eine Kollagenproduktion in Pankreaskarzinom-Zell-Sphäroiden nachgewiesen haben (Longati et al. 2013, Lohr et al. 1994, Yeon et al. 2013). Die Arbeitsgruppe um Lohr zeigte allerdings, dass die Kollagenproduktion von der verwendeten Zelllinie abhängig ist (Lohr et al. 1994). Während die aus pankreatischen Adenokarzinomen gewonnenen Zelllinien PaCa-2, PaCa-3 und PaCa-44 eine hohe Produktion extrazellulärer Matrixproteine aufwiesen, war diese in der PANC-1-Zelllinie eher mäßig ausgeprägt (Lohr et al. 1994). Dies könnte den geringen Gehalt an Kollagen in den aus der Zelllinie PANC-1 gebildeten Sphäroiden erklären. Möglicherweise kann die lediglich sporadische Detektion von Kollagenen auch auf die Einstellungen des CLSM zurückzuführen sein. Da das für die Versuche verwendete CLSM die Fasern lediglich einen Detektor zur Erfassung des SHG-Signals im *transmitted mode*, also in vorwärtsgerichteter Signalwahrnehmung, installiert hatte. Da jedoch der Großteil des SHG-Signals im *backscattered mode*, also in rückwärtsgerichteter Signaldetektion, wahrgenommen wird, könnte man durch die zusätzliche Installation eines solchen Detektors vermutlich eine verbesserte Darstellung der kollagenen Fasern erhalten (Chen et al. 2012, Georgiou et al. 2000). Auch eine Erhöhung der Laserleistung könnte die Darstellung der kollagenen Fasern mittels SHG verbessern, da die Signalstärke mit der Laserleistung korreliert (Chen et al. 2012, Georgiou et al. 2000). Die Laserleistung wurde für die Versuche mit 15 % allerdings bewusst gering gewählt, um so lediglich die Kollagenfasern als stärkste SHG-Erzeuger zur Frequenzverdopplung anzuregen und artifizielle Signale zu unterdrücken (Georgiou et al. 2000).

Wie in der Arbeit gezeigt werden konnte, wiesen Hetero-Sphäroide im Vergleich zu den PANC-1-Sphäroiden einen 12fachen höheren Gehalt an Kollagen auf. Dies ist vermutlich dadurch begründet, dass in den Hetero-Sphäroiden neben den Krebszellen auch Fibroblasten enthalten waren. Fibroblasten stellen, neben pankreatischen Sternzellen, die Hauptproduzenten der extrazellulären Matrix pankreatischer Tumore dar und sind somit maßgeblich an der Desmoplasie der Karzinome beteiligt (Rasheed et al. 2012). So ist bereits bekannt, dass durch Zugabe der genannten Zelllinien der Gehalt an extrazellulärer Matrix in Krebszell-Sphäroiden gesteigert werden kann (Ware et al. 2016). Aufgrund des erhöhten

Kollagengehalts konnten die Hetero-Sphäroide die desmoplastischen Verhältnisse in Pankreaskarzinomen besser widerspiegeln.

Daraus kann geschlussfolgert werden, dass aus Pankreaskarzinom-Zellen und Fibroblasten kollagenhaltige 3D-Tumorsphäroide kultiviert werden können, anhand derer man die Auswirkungen einer milden Hyperthermie auf die extrazelluläre Matrix pankreatischer Tumoren sowie den enthaltenen Zellen ermitteln kann.

7.3 Nanopartikel-Internalisierung in die Sphäroide

Die Untersuchung der Internalisierung der Nanopartikel demonstrierte in den PANC-1- eine 6fach bzw. in den Hetero-Sphäroiden eine 9fach schlechtere Internalisierung der Partikel im Vergleich zu PANC-1-Monolayerzellen. Es konnte gezeigt werden, dass in den Sphäroiden die Partikel lediglich in die äußeren Zellschichten aufgenommen wurden, während die innenliegenden Sphäroid-Zellschichten vollständig ausgespart wurden.

Ein möglicher Grund hierfür ist, dass die Eisenoxid-Nanopartikel in Monolayer-Kulturen mit einer größeren Zelloberfläche in Kontakt kommen, als in kugelförmigen Sphäroiden. Da die Kontaktfläche zwischen MNPs und Zellen mit der Internalisierung der Partikel korreliert, können die MNPs in Sphäroiden nur zu einem geringeren Anteil aufgenommen werden (Gao et al. 2013). Um mit einer größeren Zelloberfläche in Sphäroiden in Kontakt zu kommen, müssten die MNPs also durch den Sphäroid diffundieren (Goodman et al. 2007, Gao et al. 2013). Wie Goodman *et al.* zeigten, ist eine Penetration der Partikel in den Sphäroidkern jedoch nur unzureichend möglich (Goodman et al. 2007). Da extrazelluläre Matrix, vor allem Kollagen, die Penetration der Partikel durch Bindung dieser zusätzlich hemmt, werden die Partikel in den kollagenreicheren Hetero-Sphäroiden vermutlich geringer internalisiert, als in den PANC-1-Sphäroiden (Stylianopoulos et al. 2010, Gao et al. 2013). Aufgrund der verminderten Internalisierung der Nanopartikel und der Tatsache, dass für die Erzeugung einer Hyperthermie unter dem Magnetwechselfeld eine ausreichende Eisenmenge in den Proben vorhanden sein muss, wurden die Partikel für die Hyperthermie-Experimente unmittelbar vor der Magnetwechselfeldbehandlung mit einer erhöhten Konzentration zugegeben (Andrä et al. 1999). Da Sphäroide das biologische Verhalten *in vivo* besser

abbilden als Monolayer-Kulturen, könnte auch in der *in vivo*-Situation mit einem entsprechenden Nanopartikelbedarf zu rechnen sein (Friedrich et al. 2007).

Schlussfolgernd konnte demonstriert werden, dass die verminderte Kontaktfläche zwischen Zellen und MNPs bei Kultivierung von Zellen in 3D-Modellen zu einer verminderten Internalisierung der Partikel führte und dementsprechend hohe Eisenkonzentrationen für eine Hyperthermie-Generierung in Sphäroidmodellen zugegeben werden müssen.

7.4 Effekt milder Hyperthermie auf die Integrität kollagener Fasern in 3D-Sphäroiden aus Pankreaskarzinomzellen und Fibroblasten

Die Untersuchung des Einflusses der milden Hyperthermie auf die Strukturintegrität von fibrillären Kollagenfasern und dem Sphäroidvolumen in Hetero-Sphäroiden zeigte eine signifikante Reduktion beider untersuchter Parameter verglichen mit unbehandelten Sphäroiden. Hierbei verringerten Temperaturen von 40 °C und 42 °C, unabhängig ob sie mittels Brutschrank oder magnetischer Hyperthermie erzeugt wurden, den Anteil intakter Kollagenfasern auf ca. 10 % und das Sphäroidvolumen auf 90 % bei 40 °C bzw. 70 % bei 42 °C. Wie bereits in Abschnitt 7.1. angeführt, ist diese Faserreduktion vermutlich auf die wärmebedingte Denaturierung von kollagenen Fasern durch Einfluss milder Hyperthermie zurückzuführen (Mu et al. 2007, LI et al. 2010, He et al. 2012). Neben der durch Wärmeinduktion bedingten Faserzerstörung, zeigte auch die alleinige Applikation der MNPs in Abwesenheit eines Magnetfeldes eine Reduktion des Anteils intakter Fasern. Diese könnte durch Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) oder durch aktivierte Proteinase bedingt sein. Es gibt Hinweise, dass MNPs die ROS-Produktion in PANC-1-Zellen induzieren (Ludwig et al. 2017). Freigesetzte ROS können einerseits mit den Kollagenfasern interagieren und diese zerstören, andererseits konnte durch die Arbeitsgruppe um Noh gezeigt werden, dass ROS die Expression von Matrix-Metalloproteinase-1 (MMP-1) in Fibroblasten induzieren (Kerr et al. 1987, Curran et al. 1984, Noh et al. 2017). MMPs sind Proteinase, die einen Abbau von Bestandteilen der extrazellulären Matrix, wie Kollagenen, bewirken (Quan et al. 2013). Durch das Anlegen eines Magnetfeldes und der daraus resultierenden Wärmegenerierung durch die MNPs wurde der faserreduzierende Effekt verstärkt. Diese verstärkte

Wirkung ist vermutlich auf den synergistischen Effekt der Nanopartikel und der Wärme zurückzuführen.

Neben der Faserreduktion war in den Hetero-Sphäroiden durch die Wärmeexposition zudem eine Reduktion des Sphäroidvolumens zu verzeichnen. Quervernetzte kollagene Fasern dienen der Stabilisierung von Geweben (Deutzmann und Bruckner 2014). Da Wärme – wie bereits beschrieben – durch Aufspaltung von Wasserstoffbrückenbindungen zu einem Verlust der Tertiärstruktur von Proteinen und damit zu einem Funktionsverlust von Proteinen führt, kann die Reduktion intakter Kollagenfasern potentiell zu einer Destabilisierung von Geweben führen (Deutzmann und Bruckner 2014). Eine solche Gewebeauflockerung würde den Größenverlust der Sphäroide durch Zerfall dieser begründen. Die Volumenreduktion durch Hyperthermie könnte durch die – bereits zuvor beschriebene – wärmebedingte Denaturierung von Proteinen hervorgerufen worden sein, da diese üblicherweise mit dem Verlust der Tertiärstruktur und der Proteinfunktion einher geht (Deutzmann und Bruckner 2014). Für eine Auflockerung des Tumorgewebes durch Hyperthermie würde zudem das bereits im Mausmodell beobachtete verbesserte Anfluten von Pharmaka im Tumorgewebe nach Wärmeexposition sprechen (Kolosnjaj-Tabi et al. 2014, Kolosnjaj-Tabi et al. 2017, Miyamoto et al. 2016).

Lediglich in den mit Nanopartikeln in Abwesenheit eines Magnetwechselfeldes inkubierten Hetero-Sphäroiden zeigte sich eine Volumenzunahme. Da Gupta *et al.* zeigten, dass einige beschichtete Partikel dazu neigen, sich an der Zelloberfläche anzuhafte, könnte die Zunahme des Volumens der Versuchsobjekte durch anhaftende Nanopartikel an den Sphäroiden bedingt sein (Gupta und Curtis 2004).

Betrachtet man den Effekt einer milden Hyperthermie auf die Strukturintegrität von Kollagenfasern in murinen Sehnen verglichen mit denen in Hetero-Sphäroiden, fällt auf, dass die Kollagenfaserdefibrillation in den Hetero-Sphäroiden bei 42 °C derer in den murinen Sehnen entsprach. Dahingegen war die Faserdestruktion nach einer Hyperthermie-Behandlung bei 40 °C in den Sphäroiden mit einem Anteil intakter Fasern bei ca. 10 % bereits deutlich niedriger als in den Sehnen (Anteil intakter Fasern bei ca. 27 %). Die stärkere Faserdestruktion in den Sphäroiden ist vermutlich auf die unterschiedliche Anordnung der Faserproteine in den Hetero-Sphäroiden und murinen Sehnen zurückzuführen. Während sich die

Fasern in den Sphäroiden zwischen den Sphäroidzellen anordnen, liegen Kollagenfasern in Sehnen dicht gebündelt in paralleler Anordnung vor, um so stärksten mechanischen Beanspruchungen gewachsen zu sein (Ottani et al. 2001, Kopanska et al. 2016).

Da die in der Arbeit dargestellte Reduktion intakter Kollagenfasern potentiell durch Auflockerung des Tumorstromas zu einer Dekompression von Tumorgefäßen führen kann und vasodilatatorische und gefäßschädigende Eigenschaften von Wärme bereits bekannt sind, kann die milde Hyperthermie potentiell zu einer verbesserten Perfusion systemisch verabreichter Pharmaka führen (Multhoff und Gaipl 2010, Hildebrandt et al. 2002, Song et al. 2005).

In Zusammenschau dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass eine einstündige milde Hyperthermie in der Lage ist Kollagenfasern, welche den Hauptbestandteil des Tumorstromas in Pankreaskarzinomen ausmachen, zu degradieren und die Desmoplasie damit potentiell aufzulösen.

7.5 Auswirkungen von Hyperthermie und Stromareduktion auf die Vitalität der Zellen des Tumorgewebes

Die Untersuchungen der Auswirkung einer einstündigen milden Hyperthermie, generiert durch einen Brutschrank, auf die Vitalität von PANC-1-Sphäroid- und Hetero-Sphäroid-Zellen zeigte eine signifikante Reduktion vitaler Zellen. Nach einer Hyperthermiebehandlung mit 40 °C waren in den Hetero-Sphäroiden 60 % und in den PANC-1-Sphäroiden bei 40 % der Zellen vital. Eine Temperatur von 42 °C verminderte den Anteil vitaler Zellen in den Hetero-Sphäroiden auf 41 % und auf 36 % in den PANC-1-Sphäroiden. Der zellreduzierende Hyperthermieeffekt war somit in den PANC-1-Sphäroiden stets ausgeprägter als in den Hetero-Sphäroiden. Bei beiden Versuchstemperaturen waren apoptotische und nekrotische Zellvorgänge mengenmäßig gleichermaßen ausgeprägt. Eine Hyperthermiebehandlung mit höheren Temperaturen (55 °C) führte vorrangig zu Zellnekrosen. Die letale Wirkung milder Hyperthermie beruht auf der temperaturabhängigen Schädigung der DNA, von membranbildenden Phospholipiden sowie von Proteinen wie den DNA-Reparaturenzymen (Hilger 2013). Bedingt durch die thermische Schädigung der Membranen entstehen

zudem ROS, welche wiederum die enzymatische Funktion der DNA-Reparatursysteme beeinträchtigen (Hilger 2013). Die wärmeinduzierten DNA-Schäden können somit nicht mehr durch die DNA-Reparaturproteine behoben werden. Dies führt zu einer fehlerhaften bzw. unvollständigen DNA-Replikation (Roti 2008). Folglich kommt es zu einer Induktion von Apoptose in den Zielzellen (Roti 2008). Das Überwiegen nekrotischer Sterbeprozesse in den mit 55 °C behandelten Sphäroiden ist dadurch begründet, dass bei thermoablativen Temperaturen (ab 45 °C) vorrangig Gewebnekrosen induziert werden (Hilger 2013). Da sich PANC-1- und Hetero-Sphäroide einerseits durch den Kollagengehalt und andererseits durch das Vorhandensein von Fibroblasten in den Hetero-Sphäroiden unterscheiden, kann die verminderte Reduktion vitaler Zellen in Hetero-Sphäroiden im Vergleich zu den PANC-1-Sphäroiden vermutlich auf diese Faktoren zurückgeführt werden. Da Kase *et al.* zeigen konnten, dass das Zellüberleben von Fibroblasten und neoplastisch veränderten Zellen desselben Ursprungsgewebes bei Hyperthermie-Behandlung einer dichten Zellpopulation (wie sie in Sphäroiden vorzufinden ist) gleichermaßen beeinträchtigt ist, ist von einer gleichmäßigen Reduktion von Fibroblasten und Pankreaskarzinomzellen in den Hetero-Sphäroiden nach Wärmeexposition auszugehen (Kase und Hahn 1976). Daher ist die verminderte Zellvitalität in den PANC-1-Sphäroiden verglichen mit den Hetero-Sphäroiden vermutlich eher auf das Tumorstroma zurückzuführen, welches sich möglicherweise thermoprotektiv auf die Zellen auswirkt. Studien zu einem zellprotektiven Effekt der extrazellulären Matrix in Bezug auf eine Hyperthermie-Behandlung gibt es bisher jedoch nicht.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bereits die alleinige Applikation eisenoxidhaltiger Nanopartikel - in Abwesenheit eines Magnetwechselfeldes - in beiden Sphäroid-Modellen zu einer signifikanten Reduktion vitaler Zellen im Vergleich zu nativen Zellen um ca. 30 % führte. Die Reduktion vitaler Zellen durch MNPs beruht vermutlich auf der bereits in Abschnitt 7.4 beschriebenen Produktion von ROS (Ludwig et al. 2017, Eustaquio und Leary 2012). Durch den erhöhten Gehalt intrazellulärer ROS werden sowohl die DNA als auch die DNA-Reparaturenzyme der Zellen geschädigt, sodass in diesen vermehrt Apoptose induziert wird (Ludwig et al. 2017, Eustaquio und Leary 2012, Hilger 2013, Roti 2008). Zudem konnte gezeigt werden, dass durch die einstündige Wärmegenerierung durch Nanopartikeln in Anwesenheit eines Magnetfeldes der

zellreduzierende Effekt im Vergleich zur alleinigen Nanopartikelinkubation nochmals verstärkt wurde. So waren bei einer Temperatur von 40 °C in den Hetero-Sphäroiden noch 39 % und in den PANC-1-Sphäroiden noch 36 % der Zellen vital. Eine Temperatur von 42 °C verminderte den Anteil vitaler Zellen in den Hetero-Sphäroiden auf 35 % und auf 29 % in den PANC-1-Sphäroiden. Die verstärkte Zellreduktion bedingt durch magnetische Hyperthermie ist vermutlich auf die synergistische DNA-schädigende Wirkung von Nanopartikeln und Hyperthermie zurückzuführen. Die DNA-schädigenden Prozesse durch Nanopartikel und Hyperthermie sind in diesem Abschnitt bereits einzeln dargelegt. Wie bereits zuvor durch Brutschrank-Hyperthermie beobachtet, war auch durch magnetische Hyperthermie die Zellreduktion in den PANC-1-Sphäroiden stets ausgeprägter als in den Hetero-Sphäroiden. Die vermehrte Reduktion von Zellen in den PANC-1-Sphäroiden im Vergleich zu Hetero-Sphäroiden lässt sich auf die bereits oben gemutmaßte thermoprotektive Wirkung des Tumorstromas zurückführen.

Vergleicht man die Wirkung beider Hyperthermieformen hinsichtlich der Vitalität der Sphäroidzellen war erkennbar, dass der zellreduzierende Effekt durch magnetische Hyperthermie im Vergleich zur Brutschrank-Hyperthermie bei gleichen Temperaturen stets ausgeprägter war. Darüber hinaus konnte in der Arbeit dargelegt werden, dass die zellreduzierende Wirkung magnetischer Hyperthermie vorrangig auf Apoptose zurückzuführen war, während die milde Brutschrank-Hyperthermie in den Zellen zu gleichen Anteilen Apoptose und Nekrose induzierte. Die vermehrte Reduktion vitaler Zellen und verstärkte Apoptose-Induktion durch die magnetische Hyperthermie könnte auf die bereits beschriebene Nanopartikel-bedingte Erhöhung intrazellulärer ROS zurückzuführen sein, welche bekanntermaßen mit einer DNA-Schädigung und einer daraus bedingten Apoptose-Induktion einhergeht (Ludwig et al. 2017, Eustaquio und Leary 2012, Hilger 2013, Roti 2008, Foldbjerg et al. 2009, Ott et al. 2007, Ueda et al. 2002). Nekrosen gehen im Vergleich zum programmierten Zelltod – der Apoptose – *in vivo* mit einer Gewebeentzündung einher, welche auch auf das umliegende Normalgewebe übergreifen kann (Riede und Werner 2017). Unter der Berücksichtigung der Schonung von Normalgeweben zeigt sich damit ein potentieller Vorteil der Behandlung von Pankreaskarzinomen mittels milder

magnetischer Hyperthermie im Vergleich zu Therapieformen mit höheren Temperaturen oder anders gearteter Hyperthermie-Generierung.

Zusammenfassend stellt die Hyperthermie, unabhängig von der Applikationsform, eine mögliche Therapieoption zur Reduktion vitaler Tumorzellen dar. Da neben der Reduktion von Krebszellen auch Fibroblasten abgetötet werden, kann so potentiell eine desmoplasieverstärkende Stromaprotein-Produktion durch Fibroblasten unterbunden werden (Loeffler et al. 2006).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine einstündige milde Hyperthermie sowohl die im Tumor befindlichen Krebszellen als auch Fibroblasten effizient reduzieren konnte. Da der vitalitätsreduzierende Effekt in den stromaärmeren PANC-1-Sphäroiden stets ausgeprägter war als in den Hetero-Sphäroiden, lässt sich ein thermoprotektiver Effekt des Tumorstromas mutmaßen. Bezüglich der Hyperthermieapplikation zeigte sich die milde magnetische Hyperthermie aufgrund der additiven apoptoseinduzierenden Wirkung der Partikel vorteilhaft gegenüber anderen Formen der Hyperthermie-Generierung.

8 Schlussfolgerungen

Die desmoplastische Stromareaktion pankreatischer Karzinome ist maßgeblich für die schlechte Prognose des Karzinoms verantwortlich, indem es einerseits die Tumorausbreitung fördert und andererseits die Therapierbarkeit des Karzinoms mit Chemotherapie beeinträchtigt. Da sich bisher keine Therapie zur Auflösung der Desmoplasie in der klinischen Routine etablieren konnte, kommt der Erprobung solcher Therapieoptionen ein hoher Stellenwert zu. Die Untersuchung der Auswirkung einer Hyperthermie auf das Tumorstroma desmoplastischer Pankreaskarzinome sowie auf die Vitalität der in dem Tumor enthaltenen Zellen war Gegenstand dieser Arbeit.

Es konnte gezeigt werden, dass 3D-Tumormodelle aus Pankreaskarzinomzellen und Fibroblasten (Hetero-Sphäroide) aufgrund des erhöhten Kollagengehaltes im Vergleich zu Sphäroiden, die ausschließlich aus Pankreaskarzinomzellen generiert wurden (PANC-1-Sphäroide), die *in vivo* Situation desmoplastischer Pankreaskarzinome besser abbilden. Die Behandlung dieser Hetero-Sphäroide mit Temperaturen von 40 °C und 42 °C, die einerseits durch den Brutschrank und andererseits durch die Verwendung magnetischer Nanopartikel generiert wurden, zeigten, dass die milde Hyperthermie den Anteil kollagener Fasern und das Sphäroidvolumen signifikant reduzieren konnte. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die so generierten Temperaturen zu einer deutlichen Reduktion vitaler Zellen sowohl in den Hetero- als auch in den PANC-1-Sphäroiden führte. Da in den PANC-1-Sphäroiden die Zellreduktion stets ausgeprägter war als in den kollagenreicheren Hetero-Sphäroiden, kann geschlossen werden, dass das Tumorstroma möglicherweise eine thermoprotektive Wirkung auf die Sphäroidzellen hat. Übertragen auf die *in vivo*-Situation desmoplastischer Pankreaskarzinome kann die milde Hyperthermie potentiell eine vielversprechende Methode darstellen, die Desmoplasie zu reduzieren, das Tumorgewebe aufzulockern und die im Tumorgewebe befindlichen Zellen abzutöten.

In Bezug auf die Applikationsform der Hyperthermie konnte gezeigt werden, dass sich die magnetische Hyperthermie sowohl auf die Reduktion vitaler Zellen als auch auf den Absterbeprozess der Zellen im Vergleich zu anderen Wärmeapplikationsformen vorteilhaft auswirken kann.

Über die in der Arbeit gewonnenen Erkenntnisse hinaus ist ein vasodilatatorischer Effekt von Wärme bekannt. Durch die Kombination aus Vasodilatation und dem gezeigten Strukturverlust von Faserproteinen durch Hyperthermie können Tumorgefäße potentiell dekomprimiert werden und so die Anreicherung von Chemotherapeutika im Tumorgewebe verbessert werden. Diesen Zusammenhang gilt es jedoch noch nachzuweisen. Auch der Langzeit-Effekt der Hyperthermie-Behandlung auf das Tumorstroma und die Karzinomzellen sowie die Übertragbarkeit der Ergebnisse dieser Arbeit *in vivo* sollte angestrebt werden.

Die Überprüfung der genannten Aspekte kann anhand von Tierversuchen - beispielsweise von Mausmodellen mit *orthotop* oder *ektop* implantierten Pankreaskarzinomzellen (mit oder ohne Stromazellen) – erfolgen. In diesem Modell sollte außerdem die Aufnahme der Eisenoxid-Nanopartikel im Tumorgewebe beispielsweise mittels Berliner-Blau-Reaktion überprüft werden, da sich eine deutlich verminderte Aufnahme der Partikel in der dreidimensionalen Zellkultur im Vergleich zur Monolayer-Zellkultur zeigte. An die Tierversuche könnten sich möglicherweise erste klinische Studien zur Behandlung von Pankreaskarzinomen mittels magnetischer Hyperthermie – additiv zu dem bisher üblichen Therapieregime – anschließen.

9 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Andrä W, d'Ambly CG, Hergt R, Hilger I, Kaiser WA. 1999. Temperature distribution as function of time around a small spherical heat source of local magnetic hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 194 (1):197-203.
- Ansari D, Gustafsson A, Andersson R. 2015. Update on the management of pancreatic cancer: surgery is not enough. *World J Gastroenterol*, 21 (11):3157-3165.
- Artym VV. 2016. Preparation of High-Density Fibrillar Collagen Matrices That Mimic Desmoplastic Tumor Stroma. *Curr Protoc Cell Biol*, 70:10 19 11-10 19 11.
- ATCC®-PANC-1. URL: http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-1469.aspx?geo_country=de Stand: 11.12.2018, 12 Uhr.
- ATCC®-WI-38. URL: http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-75.aspx?geo_country=de#generalinformation Stand: 11.12.2018, 12 Uhr.
- Ayan B, C. CE, K. SC, M. GG. 2017. Phytochemical Inhibition of Multidrug Resistance Protein-1 as a Therapeutic Strategy for Hemangioendothelioma. *Antioxidants & Redox Signaling*, 26 (17):1009-1019.
- Chen X, Nadiarynh O, Plotnikov S, Campagnola PJ. 2012. Second harmonic generation microscopy for quantitative analysis of collagen fibrillar structure. *Nat Protoc*, 7 (4):654-669.
- Chicheł A, Skowronek J, Kubaszewska M, Kanikowski M. 2007. Hyperthermia—description of a method and a review of clinical applications. *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy*, 12 (5):267-275.
- Condeelis J, Segall JE. 2003. Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nat Rev Cancer*, 3 (12):921-930.
- Cox G, Kable E, Jones A, Fraser I, Manconi F, Gorrell MD. 2003. 3-Dimensional imaging of collagen using second harmonic generation. *Journal of Structural Biology*, 141 (1):53-62.
- Curran SF, Amoruso MA, Goldstein BD, Berg RA. 1984. Degradation of soluble collagen by ozone or hydroxyl radicals. *FEBS Letters*, 176 (1):155-160.
- Deutzmann R, Bruckner P. 2014. Extrazelluläre Matrix – Struktur und Funktion. In: Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Hrsg. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 931-951.
- Diop-Frimpong B, Chauhan VP, Krane S, Boucher Y, Jain RK. 2011. Losartan inhibits collagen I synthesis and improves the distribution and efficacy of nanotherapeutics in tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 (7):2909-2914.
- Dong R, Yan X, Pang X, Liu S. 2004. Temperature-dependent Raman spectra of collagen and DNA. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 60 (3):557-561.
- El-Boubbou K. 2018. Magnetic iron oxide nanoparticles as drug carriers: clinical relevance. *Nanomedicine*, 13 (8):953-971.
- Eustaquio T, Leary JF. 2012. Single-cell nanotoxicity assays of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Methods Mol Biol*, 926:69-85.
- Feig C, Gopinathan A, Neesse A, Chan DS, Cook N, Tuveson DA. 2012. The pancreas cancer microenvironment. *Clin Cancer Res*, 18 (16):4266-4276.
- Foldbjerg R, Olesen P, Hougaard M, Dang DA, Hoffmann HJ, Autrup H. 2009. PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. *Toxicology Letters*, 190 (2):156-162.
- Friedrich J, Ebner R, Kunz-Schughart LA. 2007. Experimental anti-tumor therapy in 3-D: spheroids—old hat or new challenge? *Int J Radiat Biol*, 83 (11-12):849-871.
- Gao Y, Li M, Chen B, Shen Z, Guo P, Wientjes MG, Au JLS. 2013. Predictive Models of Diffusive Nanoparticle Transport in 3-Dimensional Tumor Cell Spheroids. *The AAPS Journal*, 15 (3):816-831.
- Gaspar NJ, Li L, Kapoun AM, Medicherla S, Reddy M, Li G, O'Young G, Quon D, Henson M, Damm DL, Muiru GT, Murphy A, Higgins LS, Chakravarty S, Wong DH. 2007. Inhibition of transforming growth factor beta signaling reduces pancreatic adenocarcinoma growth and invasiveness. *Mol Pharmacol*, 72 (1):152-161.

- Georgiou E, Theodossiou T, Hovhannisyan V, Politopoulos K, Rapti GS, Yova D. 2000. Second and third optical harmonic generation in type I collagen, by nanosecond laser irradiation, over a broad spectral region. *Optics Communications*, 176 (1):253-260.
- Gey MH. 2015. *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik: Biosubstanzen, Trennmethoden, Strukturanalytik, Applikationen*. Springer-Verlag.
- Goodman TT, Olive PL, Pun SH. 2007. Increased nanoparticle penetration in collagenase-treated multicellular spheroids. *Int J Nanomedicine*, 2 (2):265-274.
- Goral V. 2015. Pancreatic Cancer: Pathogenesis and Diagnosis. *Asian Pac J Cancer Prev*, 16 (14):5619-5624.
- Gupta AK, Curtis ASG. 2004. Lactoferrin and ceruloplasmin derivatized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeting cell surface receptors. *Biomaterials*, 25 (15):3029-3040.
- Gupta AK, Gupta M. 2005. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 26 (18):3995-4021.
- Hamacher S, Matern S, Roeb E. 2004. Extrazelluläre Matrix - von der Grundlagenforschung zur klinischen Bedeutung. *Dtsch med Wochenschr*, 129 (38):1976-1980.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144 (5):646-674.
- He L, Mu C, Li D, Lin W. 2012. Revisit the pre-transition of type I collagen denaturation in dilute solution by ultrasensitive differential scanning calorimetry. *Thermochimica Acta*, 548:1-5.
- Hegyí G, Szigeti GP, Szasz A. 2013. Hyperthermia versus Oncothermia: Cellular Effects in Complementary Cancer Therapy. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013:672873.
- Hergt R, Dutz S, Müller R, Zeisberger M. 2006. Magnetic particle hyperthermia: nanoparticle magnetism and materials development for cancer therapy. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 18 (38):S2919.
- Hildebrandt B, Wust P, Ahlers O, Dieing A, Sreenivasa G, Kerner T, Felix R, Riess H. 2002. The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Crit Rev Oncol Hematol*, 43 (1):33-56.
- Hilger I. 2013. In vivo applications of magnetic nanoparticle hyperthermia. *Int J Hyperthermia*, 29 (8):828-834.
- Hingorani SR, Harris WP, Seery TE, Zheng L, Sigal D, Hendifar AE, Braiteh FS, Zalupski M, Baron AD, Bahary N, Wang-Gillam A, LoConte NK, Springett GM, Ritch PS, Hezel AF, Ma WW, Bathini VG, Wu XHW, Jiang P, Bullock AJ. 2016. Interim results of a randomized phase II study of PEGPH20 added to nab-paclitaxel/gemcitabine in patients with stage IV previously untreated pancreatic cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 34 (4).
- Hui Mingalone C, Liu Z, Hollander J, Garvey K, Gibson A, Banks R, Zhang M, McAlindon T, Nielsen H, Georgakoudi I, Zeng L. 2018. Second harmonic generation imaging reveals alterations of collagen fibers that correlate with synovitis and cartilage damage in early experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 26:S469-S470.
- Hulmes DJS. 2002. Building Collagen Molecules, Fibrils, and Suprafibrillar Structures. *Journal of Structural Biology*, 137 (1):2-10.
- Incio J, Suboj P, Chin SM, Vardam-Kaur T, Liu H, Hato T, Babykutty S, Chen I, Deshpande V, Jain RK, Fukumura D. 2015. Metformin Reduces Desmoplasia in Pancreatic Cancer by Reprogramming Stellate Cells and Tumor-Associated Macrophages. *PLoS One*, 10 (12):e0141392.
- Instruments M. 2004. Zetasizer nano series user manual. MAN0317, 1.
- Jain RK, Martin JD, Stylianopoulos T. 2014. The role of mechanical forces in tumor growth and therapy. *Annu Rev Biomed Eng*, 16:321-346.

- Hrsg. 2010. Thermotherapie mit magnetischen Nanopartikeln (Nano-Krebs-Therapie). Innovationen in Medizin und Gesundheitswesen, Beiträge des Symposiums.
- Junqueira LC, Cossermelli W, Brentani R. 1978. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Arch Histol Jpn*, 41 (3):267-274.
- Kaatsch P, Spix C, Katalinic A, Hentschel S, Luttmann S, Stegmaier C, Caspritz S, Christ M, Ernst A, Folkerts J, Hansmann J, Klein S. 2015. Krebs in Deutschland 2011/2012 Robert Koch-Institut.
- Kamisawa T, Wood LD, Itoi T, Takaori K. 2016. Pancreatic cancer. *The Lancet*, 388 (10039):73-85.
- Kase KR, Hahn GM. 1976. Comparison of some response to hyperthermia by normal human diploid cells and neoplastic cells from the same origin. *European Journal of Cancer*, 12 (6):481-491.
- Kerr JS, Chae CU, Nagase H, Berg RA, Riley DJ. 1987. Degradation of collagen in lung tissue slices exposed to hyperoxia. *Am Rev Respir Dis*, 135 (6):1334-1339.
- Kolosnjaj-Tabi J, Marangon I, Nicolas-Boluda A, Silva AKA, Gazeau F. 2017. Nanoparticle-based hyperthermia, a local treatment modulating the tumor extracellular matrix. *Pharmacol Res*, 126:123-137.
- Kolosnjaj-Tabi J, Di Corato R, Lartigue L, Marangon I, Guardia P, Silva AKA, Luciani N, Clement O, Flaud P, Singh JV, Decuzzi P, Pellegrino T, Wilhelm C, Gazeau F. 2014. Heat-Generating Iron Oxide Nanocubes: Subtle "Deconstructors" of the Tumoral Microenvironment. *Acs Nano*, 8 (5):4268-4283.
- Kopanska KS, Alcheikh Y, Staneva R, Vignjevic D, Betz T. 2016. Tensile Forces Originating from Cancer Spheroids Facilitate Tumor Invasion. *PLOS ONE*, 11 (6):e0156442.
- Lang G. 2012. Histotechnik: Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik. Springer-Verlag.
- Lauth GJ, Kowalczyk J. 2016. Einführung in die Physik und Chemie der Grenzflächen und Kolloide. Springer.
- LI D-F, MU C-D, ZHANG Q, ZHOU Y-L, LIN W. 2010. EFFECTS OF MICROWAVE IRRADIATION ON COLLAGEN DENATURATION. *Journal of Food Biochemistry*, 34 (6):1319-1331.
- Li L, ten Hagen TLM, Hossann M, Süß R, van Rhoon GC, Eggermont AMM, Haemmerich D, Koning GA. 2013. Mild hyperthermia triggered doxorubicin release from optimized stealth thermosensitive liposomes improves intratumoral drug delivery and efficacy. *Journal of Controlled Release*, 168 (2):142-150.
- Li Q, Chen C, Kapadia A, Zhou Q, Harper MK, Schaack J, LaBarbera DV. 2011. 3D models of epithelial-mesenchymal transition in breast cancer metastasis: high-throughput screening assay development, validation, and pilot screen. *J Biomol Screen*, 16 (2):141-154.
- Ling Y, Rubin J, Deng Y, Huang C, Demirci U, Karp JM, Khademhosseini A. 2007. A cell-laden microfluidic hydrogel. *Lab Chip*, 7 (6):756-762.
- Liu Y, Liu L, Chen M, Zhang Q. 2013. Double thermal transitions of type I collagen in acidic solution. *J Biomol Struct Dyn*, 31 (8):862-873.
- Loeffler M, Kruger JA, Niethammer AG, Reisfeld RA. 2006. Targeting tumor-associated fibroblasts improves cancer chemotherapy by increasing intratumoral drug uptake. *J Clin Invest*, 116 (7):1955-1962.
- Lohr M, Trautmann B, Gottler M, Peters S, Zauner I, Maillet B, Kloppel G. 1994. Human ductal adenocarcinomas of the pancreas express extracellular matrix proteins. *Br J Cancer*, 69 (1):144-151.
- Longati P, Jia X, Eimer J, Wagman A, Witt M-R, Rehnmark S, Verbeke C, Toftgård R, Löhr M, Heuchel R. 2013. 3D pancreatic carcinoma spheroids induce a matrix-rich, chemoresistant phenotype offering a better model for drug testing.
- Ludwig R, Teran FJ, Teichgraber U, Hilger I. 2017. Nanoparticle-based hyperthermia distinctly impacts production of ROS, expression of Ki-67, TOP2A, and TPX2, and induction of apoptosis in pancreatic cancer. *Int J Nanomedicine*, 12:1009-1018.

- Mathew DS, Juang R-S. 2007. An overview of the structure and magnetism of spinel ferrite nanoparticles and their synthesis in microemulsions. *Chemical Engineering Journal*, 129 (1):51-65.
- Miles CA, Burjanadze TV, Bailey AJ. 1995. The kinetics of the thermal denaturation of collagen in unrestrained rat tail tendon determined by differential scanning calorimetry. *J Mol Biol*, 245 (4):437-446.
- Miller S, Gross Jones C, Mitra K. 2017. Chapter 10 - Modeling and Experimental Analysis of Thermal Therapy during Short Pulse Laser Irradiation. In: Becker SM, Hrsg. *Modeling of Microscale Transport in Biological Processes*. Academic Press, 243-259.
- Miyamoto R, Oda T, Hashimoto S, Kurokawa T, Inagaki Y, Shimomura O, Ohara Y, Yamada K, Akashi Y, Enomoto T, Kishimoto M, Yanagihara H, Kita E, Ohkohchi N. 2016. Cetuximab delivery and antitumor effects are enhanced by mild hyperthermia in a xenograft mouse model of pancreatic cancer. *Cancer Sci*, 107 (4):514-520.
- Mu C, Li D, Lin W, Ding Y, Zhang G. 2007. Temperature induced denaturation of collagen in acidic solution. *Biopolymers*, 86 (4):282-287.
- Multhoff G, Gaipf U. 2010. Molekulare und immunologische Effekte der Hyperthermie auf Tumorprogression und Metastasierung. *Der Onkologe*, 16 (11):1043-1051.
- Neesse A, Michl P, Frese KK, Feig C, Cook N, Jacobetz MA, Lolkema MP, Buchholz M, Olive KP, Gress TM, Tuveson DA. 2011. Stromal biology and therapy in pancreatic cancer. *Gut*, 60 (6):861-868.
- Noh EM, Kim JM, Hong OY, Song HK, Kim JS, Kwon KB, Lee YR. 2017. PTEN inhibits replicative senescence-induced MMP-1 expression by regulating NOX4-mediated ROS in human dermal fibroblasts. *J Cell Mol Med*, 21 (11):3113-3116.
- Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. 2007. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*, 12 (5):913-922.
- Ottani V, Raspanti M, Ruggeri A. 2001. Collagen structure and functional implications. *Micron*, 32 (3):251-260.
- Ottaviano AJ, Sun L, Ananthanarayanan V, Munshi HG. 2006. Extracellular matrix-mediated membrane-type 1 matrix metalloproteinase expression in pancreatic ductal cells is regulated by transforming growth factor-beta1. *Cancer Res*, 66 (14):7032-7040.
- Park H, Cho JA, Kim SK, Kim JH, Lee SH. 2008. Hyperthermia on mesenchymal stem cells (MSCs) can sensitize tumor cells to undergo cell death. *Int J Hyperthermia*, 24 (8):638-648.
- Peeken JC, Vaupel P, Combs SE. 2017. Integrating Hyperthermia into Modern Radiation Oncology: What Evidence Is Necessary? *Front Oncol*, 7:132.
- Peng X-H, Qian X, Mao H, Wang AY. 2008. Targeted magnetic iron oxide nanoparticles for tumor imaging and therapy. *International journal of nanomedicine*, 3 (3):311.
- Philip PA, Mooney M, Jaffe D, Eckhardt G, Moore M, Meropol N, Emens L, O'Reilly E, Korc M, Ellis L, Benedetti J, Rothenberg M, Willett C, Tempero M, Lowy A, Abbruzzese J, Simeone D, Hingorani S, Berlin J, Tepper J. 2009. Consensus report of the national cancer institute clinical trials planning meeting on pancreas cancer treatment. *J Clin Oncol*, 27 (33):5660-5669.
- Provenzano PP, Eliceiri KW, Campbell JM, Inman DR, White JG, Keely PJ. 2006. Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. *BMC Med*, 4 (1):38.
- Provenzano PP, Cuevas C, Chang AE, Goel VK, Von Hoff DD, Hingorani SR. 2012. Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell*, 21 (3):418-429.
- Quan T, Little E, Quan H, Qin Z, Voorhees JJ, Fisher GJ. 2013. Elevated matrix metalloproteinases and collagen fragmentation in photodamaged human skin: impact of altered extracellular matrix microenvironment on dermal fibroblast function. *The Journal of investigative dermatology*, 133 (5):1362-1366.

- Rajan N, Habermehl J, Coté M-F, Doillon CJ, Mantovani D. 2006. Preparation of ready-to-use, storable and reconstituted type I collagen from rat tail tendon for tissue engineering applications. *Nature protocols*, 1 (6):2753.
- Rasheed ZA, Matsui W, Maitra A. 2012. Pathology of pancreatic stroma in PDAC. In: Grippo PJ, Munshi HG, Hrsg. *Pancreatic Cancer and Tumor Microenvironment*. Trivandrum India: Transworld Research Network.
- Rehana D, Haleel AK, Rahiman AK. 2015. Hydroxy, carboxylic and amino acid functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, characterization and in vitro anti-cancer studies. *Journal of Chemical Sciences*, 127 (7):1155-1166.
- Riede U-N, Werner M. 2017. Zelluläre Sterbemuster. *Allgemeine und Spezielle Pathologie*:51-54.
- Roderfeld M, Matern S, Roeb E. 2003. Konfokale Laserscanning-Mikroskopie: Der Blick in die Zelle. *DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 128 (48):2539-2542.
- Roesch M, Mueller-Huebenthal B. 2015. Review: the role of hyperthermia in treating pancreatic tumors. *Indian J Surg Oncol*, 6 (1):75-81.
- Roti JLR. 2008. Cellular responses to hyperthermia (40-46 degrees C): Cell killing and molecular events. *International Journal of Hyperthermia*, 24 (1):3-15.
- Sapareto SA, Dewey WC. 1984. Thermal dose determination in cancer therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 10 (6):787-800.
- Schneider C. 2016. *Licht in der Welt der Nanotechnologie: Ein verständlicher Einstieg in die Grundlagen und Anwendungen*. Springer.
- Sciafani F, Iyer R, Cunningham D, Starling N. 2015. Management of metastatic pancreatic cancer: Current treatment options and potential new therapeutic targets. *Crit Rev Oncol Hematol*, 95 (3):318-336.
- Seufferlein T, Porzner M, Heinemann V, Tannapfel A, Stuschke M, Uhl W. 2014. Ductal pancreatic adenocarcinoma. *Dtsch Arztebl Int*, 111 (22):396-402.
- Shields MA, Dangi-Garimella S, Redig AJ, Munshi HG. 2012. Biochemical role of the collagen-rich tumour microenvironment in pancreatic cancer progression. *Biochemical Journal*, 441 (2):541-552.
- Shields MA, Dangi-Garimella S, Krantz SB, Bentrem DJ, Munshi HG. 2011. Pancreatic cancer cells respond to type I collagen by inducing snail expression to promote membrane type 1 matrix metalloproteinase-dependent collagen invasion. *J Biol Chem*, 286 (12):10495-10504.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. 2016. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin*, 66 (1):7-30.
- Song CW, Park HJ, Lee CK, Griffin R. 2005. Implications of increased tumor blood flow and oxygenation caused by mild temperature hyperthermia in tumor treatment. *Int J Hyperthermia*, 21 (8):761-767.
- Stylianopoulos T, Diop-Frimpong B, Munn LL, Jain RK. 2010. Diffusion Anisotropy in Collagen Gels and Tumors: The Effect of Fiber Network Orientation. *Biophysical Journal*, 99 (10):3119-3128.
- Hrsg. 2009. Combined SHG signal information with AFM imaging to assess conformational changes in collagen. 2009 9th International Conference on Information Technology and Applications in Biomedicine.
- Sun C, Lee JSH, Zhang M. 2008. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60 (11):1252-1265.
- Tartaj P, del Puerto Morales M, Veintemillas-Verdaguer S, González-Carreño T, Serna CJ. 2003. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *Journal of physics D: Applied physics*, 36 (13):R182.
- Theodossiou T, Rapti GS, Hovhannisyann V, Georgiou E, Politopoulos K, Yova D. 2002. Thermally induced irreversible conformational changes in collagen probed by optical second harmonic generation and laser-induced fluorescence. *Lasers Med Sci*, 17 (1):34-41.

- Theodossiou TA, Thrasivoulou C, Ekwobi C, Becker DL. 2006. Second harmonic generation confocal microscopy of collagen type I from rat tendon cryosections. *Biophys J*, 91 (12):4665-4677.
- Thiesen B, Jordan A. 2008. Clinical applications of magnetic nanoparticles for hyperthermia. *International Journal of Hyperthermia*, 24 (6):467-474.
- Ueda S, Masutani H, Nakamura H, Tanaka T, Ueno M, Yodoi J. 2002. Redox control of cell death. *Antioxid Redox Signal*, 4 (3):405-414.
- Vazquez R, Larson DF. 2013. Plasma protein denaturation with graded heat exposure. *Perfusion*, 28 (6):557-559.
- von Ardenne M. 1965. In vitro-Messungen als Grundlage der Krebs-Mehrschritt-Chemotherapie. *Naturwissenschaften*, 52 (14):419-426.
- Wang Y-XJ. 2011. Superparamagnetic iron oxide based MRI contrast agents: Current status of clinical application. *Quantitative imaging in medicine and surgery*, 1 (1):35-40.
- Ware MJ, Keshishian V, Law JJ, Ho JC, Favela CA, Rees P, Smith B, Mohammad S, Hwang RF, Rajapakshe K, Coarfa C, Huang S, Edwards DP, Corr SJ, Godin B, Curley SA. 2016. Generation of an in vitro 3D PDAC stroma rich spheroid model. *Biomaterials*, 108:129-142.
- Yashiki S, Umegaki R, Kino-Oka M, Taya M. 2001. Evaluation of attachment and growth of anchorage-dependent cells on culture surfaces with type I collagen coating. *J Biosci Bioeng*, 92 (4):385-388.
- Yeon S-E, No DY, Lee S-H, Nam SW, Oh I-H, Lee J, Kuh H-J. 2013. Application of Concave Microwells to Pancreatic Tumor Spheroids Enabling Anticancer Drug Evaluation in a Clinically Relevant Drug Resistance Model. *PLOS ONE*, 8 (9):e73345.
- Zeng Y, Rucki AA, Che X, Zheng L. 2017. Shifting paradigm of developing biologics for the treatment of pancreatic adenocarcinoma. *J Gastrointest Oncol*, 8 (3):441-448.

10 Anhang

10.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Desmoplastische Stromareaktion in Pankreaskarzinomen.....	7
Abbildung 2: Schematischer Aufbau der Eisenoxid-Nanopartikel fluidMAG/C11-D.....	10
Abbildung 3: Präparation der Achillessehne einer toten NMRI- Foxn1nu/Foxn1nu-Maus.	22
Abbildung 4: Repräsentative Temperaturgraphen der Wasserbad- Hyperthermie.	29
Abbildung 5: Versuchsaufbau für die Brutschrank-Hyperthermie.....	31
Abbildung 6: Repräsentative Temperaturgraphen der Brutschrank- Hyperthermie von Hetero-Sphäroiden und PANC-1-Sphäroiden.	32
Abbildung 7: Versuchsaufbau für die Hyperthermie generiert durch eisenoxidhaltige magnetische Nanopartikel im Magnetwechselfeld.....	33
Abbildung 8: Repräsentative Temperaturgraphen der magnetischen Hyperthermie von Hetero-Sphäroiden (A) und PANC-1- Sphäroiden (B).....	34
Abbildung 9: Effekte verschiedener Temperaturen auf die Struktur fibrillärer Kollagenfasern.....	43
Abbildung 10: Größe der gebildeten PANC-1-Sphäroide in Abhängigkeit von der Zellzahl.	44
Abbildung 11: Generieren von PANC-1-Sphäroiden in An- und Abwesenheit extern zugegebener Kollagenlösung.	45
Abbildung 12: Größenwachstum und Kompaktheit von PANC-1-Sphäroiden in Abhängigkeit der Wachstumsdauer.	46
Abbildung 13: Kollagengehalt von PANC-1-Sphäroiden.....	47
Abbildung 14: Größenwachstum und Kompaktheit von Hetero-Sphäroiden in Abhängigkeit von der Wachstumsdauer.	48
Abbildung 15: Kollagengehalt von Hetero-Sphäroiden.	50
Abbildung 16: Internalisierung von fluidMAG/C11-D-Eisenoxid-Nanopartikeln.	52
Abbildung 17: Effekte von Hyperthermie auf den Kollagengehalt und das Volumen von Hetero-Sphäroiden.....	54

Abbildung 18: Effekte von magnetischer Hyperthermie auf die Zellvitalität von
Hetero-Sphäroid- und PANC-1-Sphäroid-Zellen.57

Abbildung 19: Effekte von Brutschrank-Hyperthermie auf die Zellvitalität in
Hetero-Sphäroid- und PANC-1-Sphäroid-Zellen.59

10.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Geräte.	16
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.	17
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Zelllinien.....	19
Tabelle 4: Eigenschaften des verwendeten Nanopartikels fluidMAG/C11-D.	19
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Chemikalien.	20
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Puffer und Medien sowie deren Zusammensetzung.	21
Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Softwares.	21
Tabelle 8: Eigenschaften der Region of interest (ROI) zur Auswertung der Kompaktheit	25
Tabelle 9: CEM43-Werte der Wasserbad-Hyperthermie.	30
Tabelle 10: CEM43-Werte der Brutschrank-Hyperthermie von Hetero- Sphäroiden und PANC-1-Sphäroiden.	32
Tabelle 11: CEM43-Werte der magnetischen Hyperthermie von Hetero- Sphäroiden und PANC-1-Sphäroiden.	34
Tabelle 12: Mikroskop-Einstellungen zur Generierung eines SHG-Signals in kollagenen Fasern.....	36
Tabelle 13: Eigenschaften der Regions of interest (ROIs).....	36
Tabelle 14: Auflistung der verwendeten Einstellungen für die verschiedenen Fluorophore und deren Bedeutung.	38
Tabelle 15: Schritte der Einbettung von Sphäroiden mittels Gewebeeinbettautomat.....	39
Tabelle 16: Entfernung von Paraffin für die Pikro-Siriusrot-Färbung.....	39
Tabelle 17: Pikro-Siriusrot-Färbung und Dehydrierung.....	40
Tabelle 18: Entfernung von Paraffin für die Berliner-Blau-Reaktion.....	40
Tabelle 19: Berliner-Blau-Reaktion, Kernechtrot-Färbung und Dehydrierung.	41
Tabelle 20: Kodierung der Signifikanzen.....	41
Tabelle 21: Charakterisierung von fluidMAG/C11-D-Eisenoxid-Nanopartikeln.....	51

10.3 Danksagung

Ich möchte mich bei all denen bedanken, die mich bei der Anfertigung der Dissertation begleitet und unterstützt haben.

Mein Dank gilt in erster Linie Frau Prof. Dr. Hilger, die es mir ermöglicht hat an diesem hochinteressanten Projekt zu arbeiten und mir stets mit Rat, konstruktiver Kritik und guten Lösungsansätzen zur Seite stand.

Auch bei den anderen Mitgliedern der AG Experimentelle Radiologie möchte ich mich für die tatkräftige Unterstützung, Methodenlehre und den Beistand bedanken. Zu erwähnen sind hier vor allem Frau Dr. Piehler, Frau Dr. Tansi, Frau Burgold, Frau Göring, Frau Müller und Herr Ehnert. Es war mir eine Ehre, Teil eines so tollen Forscherteams sein zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. Ulf Teichgräber danke ich für die Möglichkeit, am Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie promovieren zu dürfen.

Bei Prof. Dr. Berndt möchte ich mich für sein herausragendes Engagement als Zweitbetreuer bedanken. Vielen Dank für gute Ideen, Ratschläge und Bereitstellung von Materialien und Substanzen.

Dr. Astrid Tannert (IPHT) danke ich für die Einführung in die Handhabung des Multiphotonen-Mikroskops, ohne die meine Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Des Weiteren danke ich dem Förderverein des Universitätsklinikums Jena e.V. und dem Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung für die Unterstützung meiner Arbeit durch die Vergabe eines Promotionsstipendiums.

Außerdem bedanke ich mich bei dem *European Union's Horizon 2020 research and innovation programme No. 685795* für die Finanzierung der Materialien für die Experimente meiner Dissertation.

Ein ganz besonderer Dank gilt außerdem meiner Familie und meinen Freunden. Hervorheben möchte ich hier meine Eltern, ohne die weder das Studium noch die Dissertation möglich gewesen wären. Außerdem hervorzuheben sind Niclas Schmitt, Sophie Wucherpfennig und Ann-Christin Vielwerth. Vielen Dank für den ständigen Rückhalt während der Anfertigung der Dissertation.

10.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. rer. biol. hum. Hilger, Dr. rer. nat. Piehler

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Heidelberg, 20.10.2019

Ort, Datum



Lena Wucherpfennig