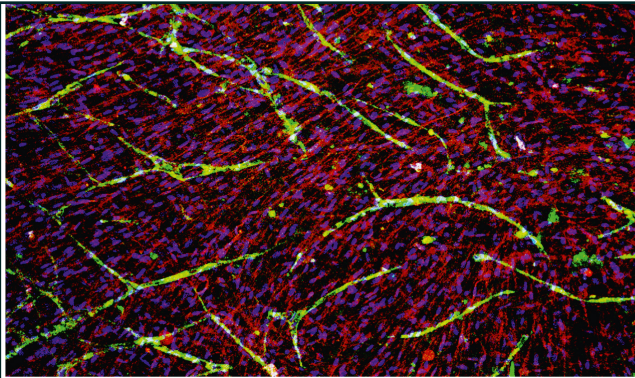




Eva Zittel (Autor)

**Evaluierung neuartiger *in vitro*-Modelle zur  
Untersuchung von Wirkstoffen und therapeutisch  
aktiven Nanopartikeln**



Eva Zittel

**Evaluierung neuartiger *in vitro*-Modelle  
zur Untersuchung von Wirkstoffen und  
therapeutisch aktiven Nanopartikeln**



Cuvillier Verlag Göttingen  
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/7970>

Copyright:

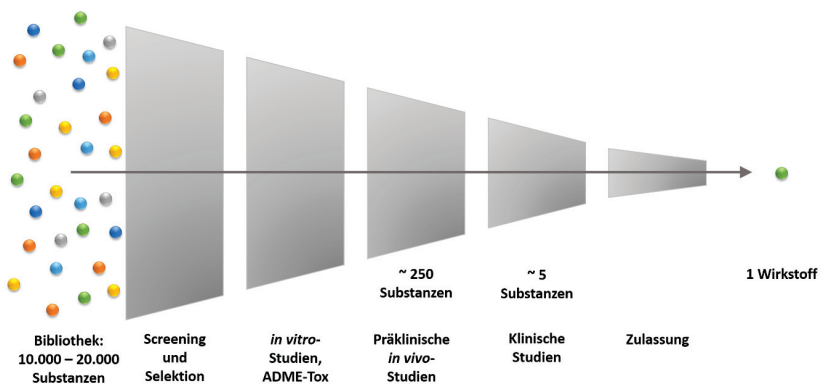
Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentzsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,  
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: [info@cuvillier.de](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>



## 2. Einleitung

Obwohl sich die Wissenschaft und Forschung heutzutage wahrscheinlich schneller entwickelt als jemals zuvor und kontinuierlich Errungenschaften leistet, steht sie weiterhin vor großen Herausforderungen, vor allem im Bereich der Gesundheitsversorgung.<sup>1</sup> Denn trotz vielerlei technischer Fortschritte, beispielsweise in der chemischen Synthese oder bei Computersimulationen von Biomolekülen, gibt es noch immer zahlreiche Erkrankungen, für die es keine ausreichend effizienten Medikamente gibt, darunter weit verbreitete Krankheiten wie Parkinson<sup>2</sup>, Alzheimer<sup>3</sup>, HIV<sup>4</sup> und Krebs<sup>5</sup>. Zwar können die Symptome teilweise behandelt oder der Krankheitsverlauf verzögert werden, jedoch stehen keine Therapien für eine vollständige Heilung zur Verfügung. Hinzu kommen immer wieder neue Krankheitsbilder wie beispielsweise erst kürzlich ausgelöst durch das Zika-Virus<sup>6,7</sup> oder durch multiresistente Bakterien.<sup>8-10</sup> Bei der großen Fülle an neu entwickelten Substanzen und Wirkstoffsystemen besteht eine der größten Herausforderungen in deren Untersuchung und Evaluierung. Dieser Prozess von den ersten Synthesen über zahlreiche Studien bis hin zur Markteinführung dauert heutzutage 12 - 15 Jahre und verschlingt mehrere Milliarden Euro.<sup>11,12</sup> Riesige Substanzbibliotheken, sowohl synthetischer Materialien als auch von Naturstoffen sowie deren Derivaten, werden auf ihre Affinität gegenüber (potentieller) Zielstrukturen, meist Enzymen oder Proteinen, hin analysiert und eingestuft. Leitstrukturen werden ausgewählt und weiter modifiziert, um in der Auslese möglichst gute, eindeutige Treffer zu erzielen.<sup>13,14</sup> Anschließend folgen *in vitro*-Experimente auf vereinzelt Zellen oder Zellschichten.<sup>15,16</sup> (Abb. 1) Bei der Beschleunigung dieser Prozeduren wird hauptsächlich auf einen möglichst hohen Durchsatz gesetzt: immer kleinere Probevolumen und immer mehr Automatisierung. Das 100 µl-Volumen einer 96er-Zellkulturplatte konnte man inzwischen auf Systeme im Nanoliter-Bereich reduzieren.<sup>17</sup> Sortiersysteme, Pipettierroboter und Programme zur (Bild-) Analyse können ohne Unterbrechung Tag und



**Abbildung 1: Stufen in der Medikamentenentwicklung.** (nach B. R. Ware & S. R. Khetani, 2017<sup>11</sup>) Aus einer Substanzbibliothek von 10.000 – 20.000 Verbindungen werden aussichtsreiche Kandidaten selektioniert, angepasst und über *in vitro*-, *in vivo*- und letztlich klinische Phasen evaluiert bis schließlich 1 Wirkstoff als Medikament zugelassen wird.



Nacht arbeiten. Allerdings sind solche Tests natürlich lange nicht ausreichend, um ein potentielles Medikament ausgiebig zu charakterisieren. Daher sind als darauffolgende Stufe eine Reihe von *in vivo*-Studien im Tiermodell vorgeschrieben<sup>15, 16</sup>, ansteigend in der Anzahl an Tieren einer Versuchsgruppe sowie in deren Gattung von Nagern bis hin zu Primaten. Erst danach geht man in die klinische Phase über, in der erste Untersuchungen zur Verträglichkeit des potentiellen Wirkstoffs bei einer kleinen Anzahl gesunder, humaner Probanden vorgenommen werden. Trotz der starken bis dorthin vorgenommenen Selektion scheitern ab diesem Zeitpunkt immer noch über 90 % der Wirkstoffkandidaten.<sup>18-21</sup> Gründe dafür sind beispielsweise organspezifische Toxizität, häufig in der Leber, das Ausbleiben der gewünschten therapeutischen Wirkung, unerwartete Begleiterscheinungen, Probleme bei der Dosierung oder im drastischsten Fall starke Nebenwirkungen, etwa aufgrund von Wechselwirkungen mit dem menschlichen Immunsystem oder spezie-spezifischen Enzymen und Proteinen im menschlichen Körper.<sup>11, 19-23</sup> Diese hohe Misserfolgsquote macht die Wirkstoffentwicklung einerseits sehr kostenintensiv, da der klinischen Phase bereits jahrelange Studien voraus gehen, und andererseits gleichzeitig auch risikobehaftet, weil eine vollständige Übertragbarkeit der Ergebnisse aus Versuchen mit einfachen Kulturen humaner Zelllinien und *in vivo*-Experimenten im Tiermodell auf den menschlichen Organismus nicht gegeben ist.<sup>22-25</sup> Zwar sind diese Systeme schon sehr lange im Einsatz und bieten hilfreiche Bewertungen und fundierte Anhaltspunkte, die humane Physiologie und spezie-spezifische Eigenschaften können aber nur bedingt abgebildet werden.<sup>26-28</sup> Die Probleme der Modelle in Bezug auf die Aussagekraft im menschlichen Organismus wurden bereits in zahlreichen Studien untersucht und aufgezeigt, jedoch mangelt es zumeist an besseren oder umsetzbaren Alternativen.<sup>29-36</sup> Diese Insuffizienz ist unter anderem auch mit dem Ziel einer Behandlung komplexerer Erkrankungen und Krankheitsbilder zu begründen, für die spezifische Wirkstoffe ebenso wie moderne Therapiemethoden gesucht und getestet werden sollen. Daher beschäftigt sich ein weites und aufstrebendes Forschungsfeld mit dem sogenannten *Tissue Engineering*, der Entwicklung neuartiger *in vitro*-Modelle zur Nachbildung organspezifischer Gewebe und Rekonstruktion von Organen.<sup>37, 38</sup> Es handelt sich dabei um Herausforderungen auf einem interdisziplinären Gebiet als gemeinsame Aufgabe für Biologen, Chemiker, Mediziner, Physiker, Materialwissenschaftler und Ingenieure. Die entwickelten Systeme sollen durch den Einsatz humaner Zellen und Gewebe sowie genau regulierbare Versuchsbedingungen humanspezifischere Daten und somit zuverlässigere Prognosen liefern. Dadurch sollen einerseits ungeeignete Wirkstoffe bereits während der präklinischen Phase ausgeschlossen werden können, die Anzahl an durchgeführten sowie notwendigen Tierversuchen verringert werden, und andererseits auch die Sicherheit für die Probanden der klinischen Studien erhöht werden. Solche im Gebiet des *Tissue Engineering* erstellten *in vitro*-Modelle bestehen aus verschiedenen komplexen Kulturen beispielsweise durch die organotypische Kombination unterschiedlicher Zelltypen, durch die dreidimensionale Anordnung der Zellen und den Einsatz von Hydrogelen oder durch dynamische Systeme für miniaturisierte Geweberekonstruktionen, die sogenannten *Organ-on-a-Chip*-Modelle.

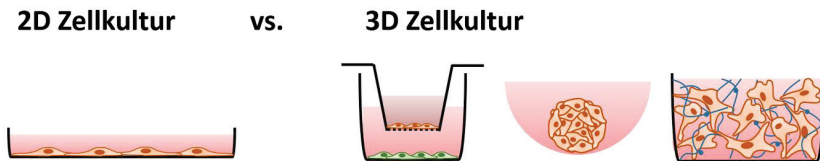


## 2.1. 2D und 3D Zellkultur

Diese weiterentwickelten Zellkultur-Modelle bieten durch den Übergang von den klassischen Versuchen mit zweidimensionalen Mono-Zellschichten hin zu dreidimensionalen Konstrukten und damit zu einer natürlicheren Umgebung der Zellen ein gewebespezifisches Verhalten der Zellen und somit zuverlässigere und aussagekräftigere Resultate.<sup>39-42</sup> Während sich die klassischen 2D Zellschichten auf einer Plastik- oder Glasoberfläche zwar dazu eignen, bestimmte zelluläre Mechanismen oder einfache Interaktionen beispielsweise der Zellmembran zu untersuchen, erscheinen sie für eine zunehmend komplexe Wirkstofftestung nur noch mäßig passend. Im Gegensatz zu der Situation in einem Gewebe weisen Zellen, die auf einer zweidimensionalen Oberfläche kultiviert werden, nur sehr wenige Zell-Zell-Kontakte auf, sondern stehen hauptsächlich in Verbindung mit der adhärennten Wachstumsfläche einerseits sowie der umgebenden Mediumschicht andererseits. Dabei ist das Volumen des Mediums für die entsprechende Kultivierung zwar notwendig, steht aber in einem großen Verhältnis zu den eingesetzten Zellen, so dass beispielsweise eine Anreicherung zellspezifischer Faktoren in entsprechendem Maßstab kaum möglich ist. Die Oberfläche auf der anderen Seite zeichnet sich durch eine hohe Festigkeit und keinerlei Elastizität aus, wodurch die Morphologie und das Verhalten der Zellen, wie spezifische Differenzierung oder genetische Expressionsmuster, geprägt werden. Die Adhäsion der Zellen ebenso wie eine Migration findet nur auf der planaren Ebene statt. Gleichfalls ist eine Interaktion mit extrazellulärer Matrix durch eine Beschichtung der Oberfläche auf diese Ebene beschränkt und die Polarität der Zellen damit vorgegeben. Die Etablierung eines Gradienten von löslichen Stoffen ist im Zweidimensionalen nicht möglich.<sup>40</sup> Dies alles sind gravierende Unterschiede des Zellwachstums in einer typischen (zweidimensionalen) Zellkultur gegenüber dem Gewebe innerhalb eines Organismus, die durch eine Kultivierung in dreidimensionalen Systemen verbessert werden sollen.<sup>43-45</sup> Denn ganz im Gegenteil zu planaren Oberflächen befinden sich Zellen natürlicherweise in einer räumlich komplexen, dreidimensionalen Umgebung und in Interaktion sowohl untereinander als auch mit spezifischer extrazellulärer Matrix. Diese Umgebungsbedingungen beeinflussen die Struktur der Zellen, ihr Adhäsionsverhalten, die Reaktion auf mechanische Einflüsse (Mechanotransduktion) oder die Signalwege innerhalb der Zellen und somit die Antwort auf äußere Einflüsse wie pH-Wert, Ionen-Gradienten oder lösliche Faktoren.<sup>46-49</sup> Über diese wiederum können die Zellen in einem Zellverbund untereinander kommunizieren und somit gegenseitig ihr Verhalten regulieren oder aufeinander abstimmen. Dies wird in dreidimensionalen Zellkulturen simuliert, indem beispielsweise durch das Aussäen in Hydrogelen als Matrix eine Wachstumsfläche in alle drei Dimensionen geschaffen wird, die auch die räumliche Ausbreitung und Migration der Zellen ermöglicht. Polarität und Adhäsionspunkte sind nicht vorgegeben und können mit der Morphologie in der flexiblen Umgebung individuell ausgebildet werden.<sup>39</sup> Gleichzeitig wird das Verhältnis von Zellen und Umgebung angepasst, so dass Zell-Zell-Kontakte vorherrschen und Interaktionen in alle Richtungen stattfinden. Hierbei findet durch die Einbettung kein uneingeschränktes Wachstum statt, vielmehr wird dieses durch sterische Hinderung reguliert. Ebenso ist durch den dreidimensionalen Aufbau die Ausbildung von Gradienten im System möglich.<sup>46-48</sup>

## 2.2. 3D Zellkultur-Modelle

Schon durch relativ einfache Methoden lassen sich die Kultivierungsbedingungen in eine dritte Dimension bringen und dadurch eine deutliche Anpassung im Verhalten der Zellen erzielen. Differenzierte Funktionen und eine gewebeartigere Organisation können in der 3D *in vitro* Kultur erreicht werden.<sup>49</sup> Dazu zählen unter anderem die Kultivierung von Sphäroiden, das Einbringen der Zellen in ein Hydrogel, die Anwendung extrazellulärer Matrix und das Aussäen auf spezielle Trägermaterialien. (Abb. 2) Bei solchen Trägern wird durch eine dreidimensionale Konstruktion bereits die Form für die entstehende Zellkultur vorgegeben. Die gebotene Wachstumsfläche bildet hier keine Ebene sondern erstreckt sich in verschiedene Richtungen, so dass sich die Zellen ebenfalls dreidimensional ausbreiten und interagieren können. Oft werden die Adhäsionspunkte zusätzlich durch spezielle Beschichtung kontrolliert und die Verteilung der Zellen somit gesteuert. So kann beispielsweise eine bestimmte Anordnung verschiedener Zelltypen erreicht werden.<sup>44, 50-52</sup> Auch Hydrogele können als eine solche dreidimensionale Matrix dienen.<sup>53-55</sup> Hier steht ein weites Feld an Materialien und Methoden zur Verfügung: von natürlichen Polymeren wie Alginat oder Agarose über Proteinstrukturen wie Fibrin oder Collagen bis hin zu chemisch synthetisierten, designten und modifizierten Polymeren wie Polyethylenglykol (PEG) oder Gelatin-Methacrylat (GelMA), und vom Schichten von Zellen und Gel über induziertpolymerisierende Suspensionen bis hin zum 3D-Bioprinting. Es muss spezifisch für die jeweilige Anwendung ausgewählt werden, um die richtigen Eigenschaften wie Steifheit, Vernetzungsgrad und Porengröße, Bindungsstellen, Art der Polymerisation und Handhabung bei der Erstellung der Kultur zu erhalten.<sup>56, 57</sup> Dabei muss einerseits die Zielsetzung des jeweiligen Experiments und die Umsetzbarkeit berücksichtigt werden, ebenso wie andererseits die verwendeten Zellen und Medien. Beispielsweise eignen sich Fibringele zur Kultivierung von Fibroblasten, da Fibrin den größten Bestandteil der extrazellulären Matrix dieser Zellen in natürlicher Umgebung ausmacht. Eine Suspension aus den Zellen sowie den Monomeren des Gels kann in Zellkultur-Gefäße eingebracht werden, woraufhin über wenige Minuten die Vernetzung der Gelstruktur stattfindet und die Zellen somit dreidimensional eingebettet werden. Ein anderes Beispiel ist die Kultivierung von Endothelzellen auf einem Gel einer spezifischen Mixtur von Proteinen der extrazellulären Matrix (wie Geltrex®, Matrigel™ oder Cultrex®). Während die Aussaat der Zellen auf einer unbeschichteten Zellkulturplatte zu konfluentem Wachstum führt, wird bei der Kultivierung auf der EZM-Oberfläche eine



**Abbildung 2: Gegenüberstellung von 2D und 3D Zellkultur-Methoden.** Während Zellen in der klassischen 2D Zellkultur in Mono-Schichten auf planaren Plastik- oder Glas-Oberflächen wachsen, bieten die Methoden der 3D Zellkultur Alternativen. Zellen können als Ko-Kultur in Transwell®-Systeme eingebracht, in Sphäroiden kultiviert oder in einer Gel-Matrix etabliert werden.



netzartige Struktur ausgebildet. Diese kann der natürlichen Eigenschaft der Endothelzellen zur Angiogenese, also der Ausbildung neuer Blutgefäße, zugeschrieben werden. Bei anderen Zelltypen ist dieses Verhalten nicht zu erkennen.

Eine Methode zum Erstellen von dreidimensionalen Zellkulturen ohne eine Stützmatrix ist die Kultivierung von Sphäroiden.<sup>58-60</sup> Dabei werden aus adhärent wachsenden Zellen (meist Tumorzelllinien) solide, kugelförmige Zell-Aggregate geformt. Dies ist möglich, wenn den Zellen keine Wachstumsoberfläche geboten wird und sie somit ausschließlich auf die Ausbildung von Kontakten zueinander angewiesen sind, etwa durch das Aussäen von Zellsuspensionen auf beschichteten, zellabstoßenden Oberflächen (wie Agarose oder Agar), in hängenden Tropfen oder durch die Kultivierung in Spinnerflaschen. Solche Sphäroide werden häufig als Modell für avaskuläre Bereiche von Tumoren eingesetzt.<sup>59, 61</sup> Durch den engen Zellverband werden die im Inneren liegenden Zellen, zum Teil vollständig, von der frischen Zufuhr an Nährstoffen aus dem Medium abgeschlossen. Es bildet sich über den Sphäroid hinweg also ein Gradient von den außen liegenden Zellen, die weiterhin proliferieren, über einen hypoxischen Bereich mit geringer Sauerstoffzufuhr bis, je nach Größe, hin zu einem nekrotischen Bereich im Zentrum. Eine solche Verteilung ist auch in Tumorgewebe vorzufinden und bedingt die Regulierung von Zellteilung und Wachstum in den unterschiedlichen Regionen. Außerdem wird durch den bei Hypoxie entstehenden Transkriptionsfaktor HIF (Hypoxie-induzierter Faktor) der VEGF-Signalweg induziert und somit eine Angiogenese angeregt.<sup>62, 63</sup> Mit der Bildung neuer Blutgefäße soll die Versorgung des Gewebes gesichert und einer Nekrose vorgebeugt werden. Durch das oft verhältnismäßig schnelle Wachstum von Tumorgewebe muss für eine ausreichende Nährstoffzufuhr auch entsprechend schnell das vaskuläre System erweitert werden. Dies kann zu einer weniger dichten Barrierefunktion der Endothelschicht führen und somit einer erhöhten Durchlässigkeit von Stoffen aus dem Blutfluss in das Gewebe führen. Gleichzeitig wird die Ausbildung des Lymph-Systems durch das schnelle Wachstum vernachlässigt, was zu einer langsameren Ausschleusung von Stoffwechselprodukten oder anderen Substanzen führt. Beide Symptome sind zusammen als EPR-Effekt bekannt, welcher im folgenden Teil noch genauer erläutert wird. (Kapitel 2.5) Desweiteren kann durch den Zellverband der Sphäroide auch ein Tumor-ähnlicheres Milieu (zum Beispiel mit einem gesenkten pH-Wert und speziellen Proteinen) entstehen. Durch die Abgabe spezifischer Faktoren und die Ausbildung einer typischen extrazellulären Matrix innerhalb des Gewebes durch die Zellen, wird eine andere Mikroumgebung geschaffen als sie bei einer zweidimensionalen Zellschicht möglich ist. Sphäroide bilden daher auch eine gewebe-ähnlichere Oberfläche und somit Angriffsfläche und Zugänglichkeit für potenzielle Wirkstoffe, inklusive der starken Zell-Zell-Interaktionen, der veränderten Dauer zum Ausschleusen von Stoffen oder der Stilllegung von Zellen.<sup>59, 61</sup>

### 2.3. Organ-on-a-Chip-Systeme

Inspiziert durch die Effekte und Erfolge der dreidimensionalen Zellkultur wurden die angewandten *in vitro*-Systeme weiterentwickelt und neue Modelle etabliert. Um die räumliche Anordnung, eine gleichmäßige Versorgung, Interaktionen und Grenzflächen verschiedener Gewebe und auch die dynamische Umgebung eines lebenden Organs besser abzubilden, wurde

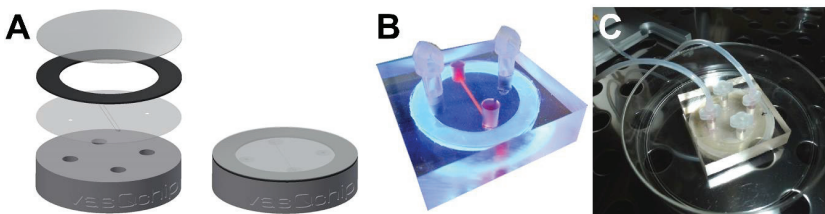


neben den vorgestellten 3D Kulturen auf andere Anwendungen zurückgegriffen oder diese miteinander kombiniert. Eine weit verbreitete Kultivierungsmethode stellen dabei sogenannte Transwell®-Systeme dar.<sup>58</sup> Diese bestehen aus zwei durch eine poröse Membran getrennten Kammern zum Einbringen unterschiedlicher Zelltypen, die über diese Membran in Kontakt stehen. Besonders interessant ist dieses Modell zur Darstellung biologischer Barrieren<sup>64-66</sup>, für Studien zur Chemotaxis<sup>67-69</sup> und zur Untersuchung von Transportvorgängen oder Stoffaustausch der verschiedenen Gewebe.<sup>70, 71</sup> Zentral ist dabei in vielen Fällen das Wechselspiel zwischen dem vaskulären System und einem Organ, also einer Endothel- und einer Epithel-Kultur. Die eingesetzte poröse Membran bietet dabei die Möglichkeit zur Ausbildung einer dichten Endothelschicht, die mit einer anliegenden, organotypischen Kultur in Kontakt steht und die Weitergabe von Nährstoffen oder anderen Substanzen aus der oberen Mediumschicht regulieren kann. Ein Defizit des Systems jedoch ist die statische Kultivierung. Es fehlt eine dynamische Umgebung, wie sie in einem Organismus durch die Blutzirkulation vorliegt und unter anderem essentiell ist für eine natürliche Ausbildung von differenzierter Morphologie, Funktionen und Verhalten der Endothelzellen.<sup>72-74</sup> Für eine weiter verbesserte Nachbildung folgten demnach als nächste Stufe die sogenannten *Organ-on-a-Chip*-Systeme, die die lebenden Zellkulturen mit Mikrostrukturen und mikrofluidischen Strömungen kombinieren.<sup>49, 75-78</sup> Dadurch können miniaturisiert organische Umgebungen geschaffen werden, die in biologischer und chemischer Zusammensetzung sowie durch Einwirkung physikalischer Stimuli Ausschnitte menschlicher Organe wiedergeben. Dieses Konzept ist bereits in zahlreichen Varianten für unterschiedliche Arten von Geweben oder Organen umgesetzt worden, darunter Leber-, Haut-, Nieren- oder Tumor-Modelle, aber auch komplexere Strukturen wie Darm, Lunge oder Blut-Hirn-Schranke bis hin zu Plazenta oder Retina.<sup>77, 79-85</sup> Die Herangehensweisen dabei sind je nach Anwendungsgebiet sehr unterschiedlich und umfassen Modelle für Hochdurchsatz-Versuche, Systeme mit einer möglichst genauen Reproduktion der organspezifischen Physiologie oder zur Kombination mehrerer *in vitro*-Organe bis hin zur Erstellung eines *Body- oder Human-on-a-Chip*-Modells.<sup>86-89</sup> Der besondere Reiz dieser Systeme ergibt sich aus den Vorteilen, die sie sowohl gegenüber den klassischen Zellkultur-Methoden haben wie auch gegenüber den *in vivo*-Versuchen im Tiermodell. Wie in anderen *in vitro*-Versuchen besteht ein großer Vorteil dabei in der Nutzung von humanen Materialien, hier jedoch in einer komplexen Umgebung, so dass eine natürlichere Physiologie der Zellen erreicht werden kann.<sup>49</sup> Hinzu kommen die Möglichkeiten einer konstanten Überwachung und Analyse aller Komponenten sowie die individuelle Beeinflussung einzelner Parameter und Inkubationsbedingungen wie den Umgebungseinflüssen, der Konzentration von Nährstoffen oder Wachstumsfaktoren oder die exakte Dosierung von Wirkstoffen. Dadurch erleichtert sich auch die Reproduzierbarkeit von Versuchsbedingungen und eine höhere statistische Relevanz wird ermöglicht. Unterschiedliche Modelle können dabei zur Untersuchung einzelner Teilaspekte, wie Transportvorgängen oder spezifischen Wirkmechanismen, beitragen und somit durch oft eindeutige Ergebnisse ein klares Gesamtbild entstehen lassen. Im Vergleich zu Tierversuchen sind sie zudem meist günstiger, schneller, eignen sich für ein breiteres Screening von Substanzen und



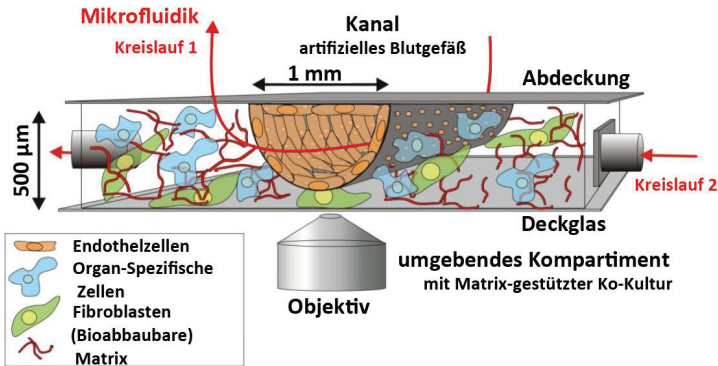
geben Aufschlüsse über Aktivitäten auf zellulärer Ebene (in humanen Geweben). Daneben erlauben sie die gezielte Simulation von Krankheitsbildern, wie Infektionen oder Entzündungen, und deren Vergleich unter verschiedenen Behandlungen.

Viele der bereits etablierten *Organ-on-a-Chip*-Modelle integrieren ein Blutgefäß bzw. die Grenzfläche eines Blutgefäßes zu einem Organ durch eine angeschlossene Mikrofluidik. Diese Systeme sind entweder sehr aufwendig in der Generierung oder es handelt sich dabei zumeist, ähnlich wie bei dem beschriebenen Transwell®-System, um eine flache Membran, die zwei Kompartimente oder Kanäle voneinander abtrennt und eine Besiedelung mit Zellen auf beiden Seiten zulässt. Obwohl so das Defizit der statischen Kultivierung der Endothelzellen behoben ist, hat dieser Aufbau immer noch den Nachteil, dass die ebene Wachstumsfläche nicht der natürlichen runden Form der Blutgefäße entspricht. Eine eckige Kanalform beeinträchtigt die Bildung kontinuierlicher Zell-Zell-Interaktionen und resultiert in anderen Fließverhalten, -geschwindigkeiten und -strömungen und beeinflusst somit die entstehenden Scherkräfte, die auf die jeweiligen Zellen wirken.<sup>72, 90</sup> Um eine natürlichere Kultivierung von Endothelzellen zu ermöglichen und somit ein *in vivo*-ähnliches Blutgefäß zur Untersuchung transendothelialer Transportvorgänge zu erstellen, wurde auch am KIT in einer Zusammenarbeit der Institute für Toxikologie und Genetik (ITG) sowie für Biologische Grenzflächen (IBG-1) ein solches Chip-Modell, der *vasQchip* (ursprünglich bezeichnet als  $\mu$ 3DVasc Bioreaktor), entwickelt.<sup>74, 91, 92</sup> Zentrum dieses Modells ist ein mikrofluidischer Kanal aus einer halbrunden, porösen Membran, welcher durch einen Thermoform-Prozess hergestellt wird und nach der Besiedelung mit Endothelzellen ein durchströmtes Blutgefäß simuliert. (Abb. 3) Dieser Kanal ist umgeben von einem weiteren Kompartiment, das ebenfalls Zugänge für eine Fluidik bietet und der Etablierung einer das artifizielle Blutgefäß umschließenden 3D Zellkultur dient. (Abb. 4) Zusammen wird durch den *vasQchip* somit die Rekonstruktion eines durchbluteten Gewebes ermöglicht, welches als Modell zur Untersuchung von Transportvorgängen aus dem Blutgefäß in ein anliegendes Gewebe (oder umgekehrt) genutzt werden kann. Aufgrund des durchsichtigen Aufbaus und dem Verschluss mit einem dünnen Deckglas ist es möglich, alle Abläufe im Chip jederzeit mikroskopisch zu beobachten und aufzunehmen. Die im Kanal eingebrachten Endothelzellen werden auf der gekrümmten Oberfläche sowie unter dem Einfluss der Scherkräfte des ständigen Mediumflusses kultiviert, so dass Morphologie und Genexpression wie in der natürlichen



**Abbildung 3: Zusammensetzung des vasQchips.** Nach der Herstellung des porösen Mikrokanals wird der vasQchip aus dem PMMA-Block mit vier Luer-Öffnungen, der PC-Membran mit dem Kanal, einem Ring aus Klebefolie als Abstandhalter sowie dem verschließenden Deckglas zusammengebaut (A). So entstehen der Kanal mit Anschlüssen an die Mikrofluidik (rot) sowie das zweite, umgebende Kompartiment (blau) (B). Für die Kultivierung wird das untere Kompartiment des vasQchips verschlossen und der Kanal mit dem Pumpsystem verbunden. Die Fluidik verläuft hier durch die Schläuche und den Kanal von rechts nach links (C).





**Abbildung 4: Schematischer Aufbau des vasQchips.** (nach I. Hebeiß, 2012<sup>91</sup>) Das mikrofluidische Modell eines Blutgefäßes besteht im Zentrum aus einem halbrunden, porösen Kanal, welcher mit einer Schicht von Endothelzellen ausgekleidet wird. Ein umgebendes Kompartiment dient der Ko-Kultivierung eines organotypischen Gewebes. Der transparente Aufbau ermöglicht die mikroskopische Untersuchung und Analyse beispielsweise von transendotheliale Transport oder gewebespezifischer Anreicherung von Substanzen.

Umgebung daran angepasst werden. Diese Endothelschicht aus HUVEC wurde von I. Hebeiß (2012)<sup>91</sup> und D. Ivannikov (2015)<sup>92</sup> etabliert, optimiert und ausführlich charakterisiert. So werden bei der Kultivierung im *vasQchip* eine natürliche Ausrichtung des Aktinzytoskeletts und der Zellmorphologie entlang der Flussrichtung und nur geringe Proliferationsraten, wie sie auch *in vivo* bekannt sind, beobachtet. Außerdem ist eine Langzeitkultivierung der Zellschicht über mehrere Wochen möglich. Die HUVEC erreichen dabei eine hohe Konfluenz und bilden ausgeprägte Zell-Zell-Kontakte (*Tight Junctions*) aus, welche spezifisch nachweisbar sind. Auch die Funktionalität der Endothelschicht konnte gezeigt werden, beispielsweise wurde eine Transmigration von Immunzellen aus der Fluidik in das angrenzende Kompartiment induziert oder die Permeabilität der HUVEC-Schicht quantifiziert. Damit konnte auch die Versorgung des zweiten Kompartiments durch den Mediumfluss im Kanal gezeigt werden, ohne die Notwendigkeit hierfür eine zweite kontinuierliche Fluidik zu verbinden. Generell ermöglicht dieses Kompartiment das Einbringen angrenzender organotypischer 3D Zellkulturen verschiedenster Art. Dabei wurden bereits verschiedene Ansätze verfolgt und umgesetzt, wie die Etablierung einer Blut-Hirn-Schranke oder einer Leber-Kultur.<sup>92</sup> Gegenstand aktueller Projekte sind die Entwicklung von Haut-, Gehirn- sowie Tumorgeweben. Letztere sind von großem Interesse für eine mögliche Testung komplexer, chemotherapeutischer Wirkstoffe, welche ein großes Potential bieten, in konventionellen *in vitro*-Systemen aber nur unzureichend analysiert werden können. So eröffnet der *vasQchip* als Modell des vaskulären Systems einerseits Möglichkeiten zu Untersuchungen von endothelialer Aufnahme sowie des transendothelialen Transports. Durch das Einbringen spezifischer Gewebe als Ko-Kultur lassen sich andererseits Spezifitäten von Substanzen oder (Wirkstoff-) Transportern gegenüber bestimmter Organe oder Tumoren feststellen, was in *in vitro*-Modellen bisher kaum möglich ist.



## 2.4. Tumorthherapie

Die Entwicklung neuer Chemotherapeutika und Wirkstoffe gegen Krebserkrankungen ist noch immer ein weites und wichtiges Forschungsfeld. Nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellen diese in der westlichen Welt die zweithäufigste Todesursache dar. Auch wenn heute etwa die Hälfte aller Betroffenen mit der Diagnose Krebs geheilt werden können und überleben, stellt die gezielte Bekämpfung von Tumorgeweben und Metastasen im menschlichen Körper noch immer große medizinische Herausforderungen dar. Allein in Deutschland erkranken jedes Jahr rund 500.000 Menschen neu an Krebs, etwa eine viertel Million pro Jahr sterben.<sup>93-95</sup> Zur Behandlung sind zahlreiche Chemotherapeutika im klinischen Alltag in Gebrauch. Die Wirkung dieser Stoffe beruht auf ihren zytostatischen Eigenschaften, hervorgerufen durch die Beeinflussung der DNA-Replikation, Induktion von DNA-Schäden, Blockierung von Reparaturmechanismen oder der Interaktion mit der Zellmembran.<sup>96</sup> Einsatz und Dosierung der Medikamente sind jedoch meist durch die starken Nebenwirkungen sehr eingeschränkt, so dass die Bekämpfung von Tumoren oft langwierig und dennoch risikobehaftet bleibt.<sup>97-99</sup> Kanzerogenes Gewebe entsteht durch eine genetische Veränderung in den Zellen, entweder durch vererbte Gendefekte oder durch äußere Einflüsse wie den Kontakt mit bestimmten Chemikalien, die Aussetzung von Strahlung, körperliches Übergewicht, die Infektion mit Papillomviren, die Aufnahme von Aflatoxinen (aus Schimmelpilzen) und andere mehr.<sup>95, 100-106</sup> Wenn die zelleigenen Reparaturmechanismen versagen und auch die Apoptose, der kontrollierte Zelltod, nicht eingeleitet werden kann, sind die Kontrolle über Wachstum und Zellteilung verloren, so dass diese dereguliert stattfinden. Durch die Zellteilung wird die vorliegende Mutation auch auf Tochterzellen weitergegeben, wodurch ein defektes Gewebe entsteht. Bei fortschreitender Ausprägung können sich von diesem Primärtumor wiederum einzelne Zellen lösen, über das Blutssystem im Körper wandern und sich in anderen Organen als Metastasen anlagern. Neben der operativen Entfernung von Tumorgeweben kann eine Therapie mit Chemotherapeutika oder/ und Bestrahlung (Kapitel 2.6) erfolgen. Als Zytostatika greifen Chemotherapeutika in den Wachstumsvorgang der schnell proliferierenden Krebszellen ein, indem essentielle Prozesse der Zellteilung gestört werden. Da diese Wirkung aber generell bei der Proliferation von Zellen eingreift, wie sie auch bei normalen, gesunden Vorgängen im Körper stattfindet, geht die Chemotherapie zumeist mit der Schädigung anderer Organe und unangenehmen Nebenwirkungen (wie Übelkeit, Blutarmut und Haarausfall) einher.<sup>98</sup> Basierend auf diesen Tatsachen wurden verschiedene Ansätze entwickelt, um gewebe- oder tumorspezifische Chemotherapeutika, zum Beispiel durch das Kuppeln mit speziellen Tumormarkern oder durch Verkapselungen des Wirkstoffs, zu generieren. Dadurch soll beispielsweise dafür gesorgt werden, dass sie zielgerichtet zum malignen Gewebe transportiert oder spezifisch aufgenommen werden, dass sie eine spezielle Aktivierung benötigen, um den Wirkstoff freizusetzen, dass sie durch bessere Löslichkeit oder geringere Nebenwirkungen eine höhere Dosierung erlauben, dass sie biologische Barrieren besser überwinden können, oder dass sie geschützt sind vor metabolischem Abbau im Organismus.<sup>107</sup> Dazu eignen sich verschiedene Methoden, wie zum Beispiel die Markierung mit spezifischen Transportermolekülen (wie Peptiden, Peptoiden, Proteinen, kleinen organischen Molekülen, Antikörpern), die Komplexbildung mit organischen



oder anorganischen Stoffen oder die Verpackung beispielsweise in Liposomen, Polymeren, Dendrimeren, organischen Containern oder auch anorganischen Hohlkugeln.<sup>107-110</sup> Ein solches Einschließen von Wirkstoffen kann viele Einschränkungen der herkömmlichen Darreichung umgehen, indem beispielsweise die Löslichkeit verbessert, ein metabolischer Abbau im Organismus verhindert und die lokale Wirkstoffkonzentration erhöht werden kann. So konnten beispielsweise für das Chemotherapeutikum Doxorubicin durch eine Verpackung in Liposomen, welches als Caelyx® bzw. Doxil® seit 1995 klinisch zugelassen ist, erstmals die Nebenwirkungen deutlich verringert werden.<sup>111</sup> Wichtig bei der Verkapselung von Wirkstoffen ist neben einer möglichst hohen Beladungskapazität, den ungewollten Austritt während des Transports im Blutkreislauf so gering wie möglich zu halten und die Freisetzung am Zielgewebe wiederum kontrolliert und am besten vollständig zu erreichen. Für chemotherapeutische Wirkstoffe muss dies somit spezifisch durch das herrschende Tumor-Milieu oder durch eine externe Anregung geschehen. Neben einer thermischen, magnetischen oder Strahlen-Behandlung von außen, kann durch die Wahl des Verpackungsmaterials auch die spezifische Tumor-Umgebung ausgenutzt werden. Aufgrund der hohen Stoffwechselaktivität von kanzerogenem Gewebe herrscht dort ein niedrigerer pH-Wert als in sonstigen Geweben und der Blutbahn (pH-Wert ~6 vs. pH-Wert 7,4),<sup>112</sup> so dass eine säureinduzierte Änderung der Transporter-Hülle für die Freisetzung des Wirkstoffs genutzt werden kann. Dadurch kann der freigegebene Wirkstoff ohne die Verpackung von den Zellen im Gewebe aufgenommen werden. Aber auch eine endosomale Aufnahme des gesamten Transporters in die Zellen ist möglich. Hier wird das System während der endosomalen Reifung ebenfalls einem sauren Milieu von pH = 6.0 - 4.8 ausgesetzt,<sup>113</sup> so dass die Verkapselung geöffnet wird und der Wirkstoff durch einen Endosomausritt ins Zytosol und andere Kompartimente der Zellen gelangt.

## 2.5. Gezielter Transport von Wirkstoffen

Eine gezielte Ansteuerung mit Antikörpern oder gewebespezifischen Liganden ist für Tumorgewebe aufgrund ihrer hohen Diversität und Komplexität sehr schwierig.<sup>107, 114, 115</sup> Es sind über 300 Arten von Krebs bekannt,<sup>95</sup> wobei diese nicht nur untereinander verschieden sind, sondern auch selbst kein homogenes Gewebe bilden und sich über die Zeit je nach Stadium verändern.<sup>116</sup> Daher gibt es für den aktiven Transport von Wirkstoffen verschiedene Ansätze, die als Ziel entweder Rezeptoren verwenden, die zwar nicht ausschließlich am kanzerogenen Gewebe vorzufinden sind, dort aber überexprimiert werden und somit vermehrt vorliegen, oder die nicht den Tumor selbst sondern das umliegende Gewebe ansteuern. Für beide Varianten muss das jeweilige Ziel entsprechend häufig und gleichverteilt vorliegen, um den gewünschten Effekt zu erzielen.

Daneben lässt sich aber auch das in Tumorgeweben vorzufindende Phänomen einer erhöhten Durchlässigkeit und Einbehaltung, der sogenannte EPR-Effekt (*enhanced permeability and retention effect*), für eine passive Anreicherung bestimmter Stoffe im Gewebe ausnutzen.<sup>117-119</sup> (Abb. 5) Diese Art der Ansteuerung zählt zur sogenannten passiven gezielten Pharmakotherapie und beruht auf physikalischen und biochemischen Unterschieden zwischen Tumorgewebe