

***In silico* Analyse der Sauerstoffverteilung in Zellen und
Geweben mittels der Finiten-Elemente-Methode**

Dissertation

zur Erlangung des

DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

an der

Naturwissenschaftlichen Fakultät IV

- Chemie und Pharmazie -

der Universität Regensburg



vorgelegt von

Linda Frank

aus München

im Oktober 2023

***In silico* Analyse der Sauerstoffverteilung in Zellen und
Geweben mittels der Finiten-Elemente-Methode**

Dissertation

zur Erlangung des

DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

an der

Naturwissenschaftlichen Fakultät IV

- Chemie und Pharmazie -

der Universität Regensburg



vorgelegt von

Linda Frank

aus München

im Oktober 2023

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Juli 2020 bis August 2023 am Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik der Fakultät Chemie und Pharmazie der Universität Regensburg.

Die Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Joachim Wegener angefertigt.

Promotionsgesuch eingereicht am: _____

Kolloquiumstermin: _____

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Apl. Prof. Dr. Rainer Müller

Erstgutachter: Prof. Dr. Joachim Wegener

Zweitgutachter: Prof. Dr. Achim Göpferich

Drittprüfer: Prof. Dr. Oliver Tepner

Für meine Eltern

*”Ich komme immer irgendwo an,
indem ich von dort losgehe, wo ich gerade war“*

(Die Abenteuer von Winnie Pooh)



Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Bedeutung von Sauerstoff in lebenden Organismen.....	1
1.2	Gewebemodelle in der präklinischen Forschung	5
1.2.1	<i>In vitro</i> Gewebemodelle	5
1.2.2	<i>In silico</i> Techniken	11
1.3	<i>State-of-the-Art</i> der Methoden zur Sauerstoffmessung.....	18
2	Zielsetzung.....	31
3	Theoretische Grundlagen.....	33
3.1	Impedanzspektroskopie	33
3.1.1	Grundlagen der Impedanzspektroskopie	33
3.1.2	<i>Electric Cell-Substrate Impedance Sensing</i> (ECIS)	37
3.2	Optische Sauerstoffmessung durch Lumineszenz-Löschung	39
3.2.1	Prinzip der optischen Sauerstoffmessung.....	39
3.2.2	Messaufbau zur ratiometrischen <i>in vitro</i> Sauerstoffmessung.....	42
3.3	Numerische Simulationen mit der Finiten-Elemente-Methode	44
3.3.1	Finite-Elemente-Methode (FEM).....	44
3.3.2	Chemischer Stofftransport – Transport verdünnter Spezies	47
4	Material und Methoden.....	51
4.1	Zellkulturtechniken	51
4.1.1	Allgemeine Zellkulturbedingungen	51
4.1.2	Zelllinien.....	52
4.1.3	Subkultivierung	53
4.1.4	Kultivierung von Sphäroiden	54
4.1.5	Zusammensetzung von Medien und Pufferlösungen	55
4.1.6	Kryokonservierung	56

4.1.7	Wachstumsstudien (3D)	57
4.1.8	Proliferationsassays (2D)	58
4.1.8.1	Impedimetrische Bestimmung der Zellproliferation mittels ECIS	58
4.1.8.2	Proliferationsbestimmung mittels PrestoBlue™ Assay	59
4.2	Mikroskopische Techniken	62
4.2.1	Phasenkontrastmikroskopie	62
4.2.2	Konfokale Laser-Raster Mikroskopie.....	63
4.2.3	Lebendfärbung mit Calcein-Acetoxy-methylester	66
4.3	Entwicklung numerischer Modelle mit COMSOL Multiphysics®.....	69
4.3.1	Geometrische Modellierung.....	70
4.3.2	Mathematische Modellierung.....	74
4.3.3	Deformierte Geometrie	79
4.3.4	Zusammenfassung der modelltechnischen Annahmen	80
4.3.5	Modelldiskretisierung und numerische Berechnung	81
4.3.6	Aufbereitung der Simulationsergebnisse	83
5	Untersuchung adhärenter Zellen im <i>Monolayer</i>	87
5.1	Sauerstoffverteilung in Zellen auf Sauerstoff-sensitiven Sensorfolien	90
5.1.1	Experiment und Simulation adhärenter U373 Zellen im <i>Monolayer</i>	90
5.1.2	Einfluss kritischer Parameter auf die <i>in silico</i> Sauerstoffverteilung.....	94
5.1.3	Simulation offener und geschlossener Systeme.....	96
5.1.4	Einflüsse des Multiwellformats und der Höhe der Flüssigkeitssäule ...	99
5.1.5	Diskussion	102
5.2	Sauerstoffverteilung in Zellen auf permeablen Kultursubstraten	111
5.2.1	Einfluss unterschiedlicher Membranen.....	112
5.2.2	Einfluss der Distanz zwischen Zellschicht und Sensorfolie	115
5.2.3	Einfluss der Membran als Diffusionsbarriere	119
5.2.4	Einfluss der Höhe der Flüssigkeitssäule im apikalen Kompartiment .	121

5.2.5	Diskussion	124
5.3	Proliferationsassays mit MCF-7 Zellen.....	131
5.3.1	Impedimetrische Analyse mittels ECIS	131
5.3.2	Fluoreszenzbasierte Analyse mittels PrestoBlue™	134
5.3.3	Diskussion	139
5.4	Ausblick.....	141
6	Untersuchung von 3D Zellaggregaten.....	143
6.1	Morphologische Analyse von Sphäroiden	146
6.1.1	Einfluss der Kulturzeit auf die Morphologie von Sphäroiden.....	146
6.1.2	Einfluss der Adhäsion auf die Morphologie von Sphäroiden.....	150
6.1.3	Diskussion	154
6.2	Sauerstoffverteilung in Sphäroiden	159
6.2.1	Einfluss kritischer Parameter auf die <i>in silico</i> Sauerstoffverteilung	159
6.2.2	<i>In vitro</i> und <i>in silico</i> Sauerstoffgradienten in adhärenen Sphäroiden auf Sauerstoff-sensitiven Sensorfolien	165
6.2.3	Sauerstoffverteilung in suspendierten Sphäroiden.....	175
6.2.4	Vorhersage mittels FEM-Simulationen.....	183
6.2.5	Einfluss der Kulturzeit auf die Sauerstoffverteilung in Sphäroiden.....	188
6.2.6	Diskussion	197
6.3	Chemische Modulation der oxidativen Phosphorylierung.....	206
6.4	Sauerstoffverteilung in adhärenen U373 Sphäroiden auf permeablen Kultursubstraten.....	210
6.4.1	Einfluss unterschiedlicher Membranen	211
6.4.2	Einfluss der Distanz zwischen Sphäroid und Sensorfolie	215
6.4.3	Diskussion	218
6.5	Gesamtdiskussion.....	219
6.6	Ausblick.....	222

7	Zusammenfassung	223
8	Summary	225
9	Literaturverzeichnis.....	227
10	Anhang.....	259
10.1	Appendix	259
10.2	Abkürzungs- und Symbolverzeichnis.....	264
10.3	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	272
10.4	Curriculum Vitae	276
10.5	Danksagung	277
10.6	Eidesstattliche Erklärung	279

1 Einleitung

1.1 Bedeutung von Sauerstoff in lebenden Organismen

Sauerstoff ist ein essenzielles Molekül, das am häufigsten mit Leben assoziiert wird. Menschen, Tiere und Pflanzen benötigen Sauerstoff, was ihn für alle Lebensformen unersetzlich macht. Ein Mensch kann notfalls einen Monat auf Nahrung und eine Woche auf Flüssigkeit verzichten, aber ohne Luft kann er nicht länger als zehn Minuten überleben (Wolfbeis, 2015). Zudem ist eine verminderte Versorgung von Geweberegionen mit Sauerstoff die Ursache für eine Vielzahl pathologischer Zustände, wie der Behandlungsresistenz von Krebs, Asthma, Gefäßerkrankungen oder Fehlgeburten. Somit nimmt die An- oder Abwesenheit von Sauerstoff Einfluss auf die Funktionen des Organismus, welche zum einen lebensnotwendig sind und zum anderen zu Schäden führen können, was in **Abbildung 1** dargestellt ist (Roussakis et al., 2015; Wilson, 2008).

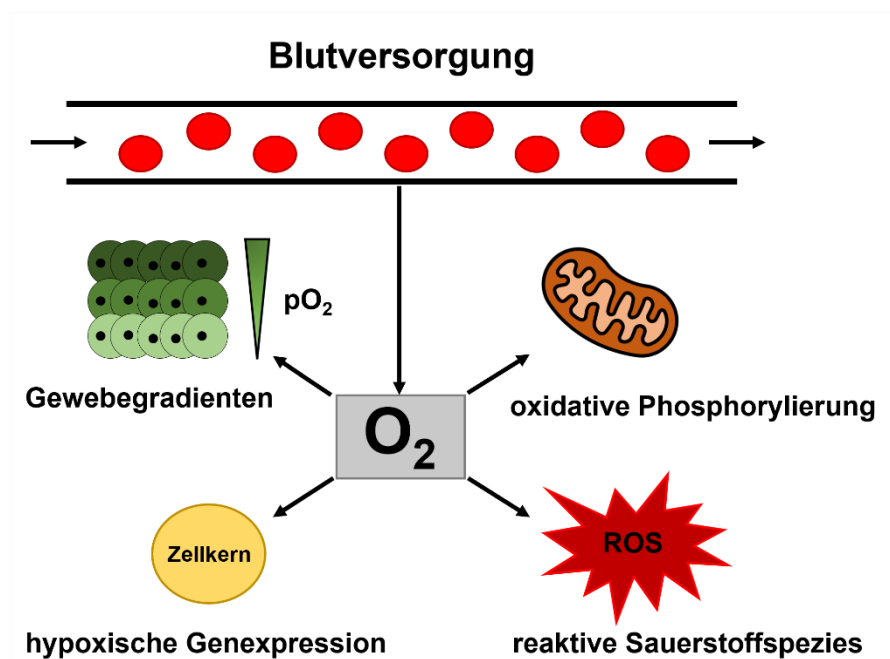


Abbildung 1: Schematische Übersicht über eine Auswahl von Funktionen des Sauerstoffs (O_2) im Organismus sowie die Auswirkungen von dessen An- und Abwesenheit. Sauerstoff ist essenziell für die Produktion von Energie (Adenosintriphosphat ATP) in der oxidativen Phosphorylierung. Allerdings ist dies mit dem Nachteil der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) verbunden. Das Zusammenspiel aus O_2 -Transport und O_2 -Verbrauch führt zudem zu Sauerstoffgradienten im Gewebe. Weiterhin spielt Sauerstoff eine Rolle bei der Genexpression (modifiziert nach P. D. Wagner, 2008).

Die Menge an Sauerstoff in der Atemluft beträgt 21 Volumen-%, was einem Sauerstoffpartialdruck (pO_2) von 160 mmHg entspricht. Über die eingeatmete Luft gelangt das Gas zunächst in die Lunge, woraufhin der Partialdruck auf 105 – 150 mmHg sinkt. Dort sammelt sich der Sauerstoff in kleinen Lungenbläschen, welche über Kapillaren mit dem Blutkreislauf verbunden sind. Über passive Diffusion durch die Alveolär-Membran gelangt er schließlich in den Blutkreislauf und wird über das in den roten Blutkörperchen enthaltene Hämoglobin zu den verschiedenen Gewebearten transportiert (Brahimi-Horn & Pouysségur, 2007; Carreau et al., 2011; Papkovsky & Dmitriev, 2013). Im arteriellen Blut sinkt der pO_2 weiter auf circa 104 mmHg (Brahimi-Horn & Pouysségur, 2007). Die physiologische Verteilung von Sauerstoff im Gewebe hängt letztlich einerseits von dessen Verbrauch im Blutkreislauf ab und andererseits von den Gradienten im Gewebe selbst (Erecińska & Silver, 2001; Grosh et al., 2020). Demnach liegt infolge der Zellatmung die Diffusionsdistanz von Sauerstoff im Gewebe bei circa 100 – 200 μm , wobei experimentelle Studien bereits von einem Sauerstoffpartialdruck nahe 0 mmHg berichteten bei nur 100 μm Entfernung vom Blutgefäß (Brahimi-Horn & Pouysségur, 2007; Carreau et al., 2011; Gatenby & Gillies, 2004). Ein zu geringer Sauerstoffgehalt im Gewebe kann zu Hypoxie führen, welche nach Grosh et al. (2020) in zwei Kategorien eingeteilt werden kann. Bei der pathologischen Hypoxie handelt es sich um eine Langzeitvariante mit 0 – 45,6 mmHg Sauerstoff je Gewebe. Bei einer physiologischen Hypoxie hingegen können noch Maßnahmen ergriffen werden, um die Homöostase aufrechtzuerhalten, wie die Expression von Genen (Erecińska & Silver, 2001). Beispiele hierfür sind das Erythropoetin-Gen oder der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) (Hofer et al., 2002). Einen wichtigen Faktor stellt dabei der Hypoxie-induzierte Transkriptionsfaktor (HIF) dar, welcher ein Heterodimer aus einer α - und β -Untereinheit ist. Im Falle einer normalen Sauerstoffversorgung wird die α -Untereinheit an zwei Prolylreste einer sauerstoffabhängigen Degradationsdomäne (*Oxygen-Dependent Degradation Domain* ODDD) hydroxyliert und durch das Hippel-Lindau Protein abgebaut. Im Falle einer Hypoxie ist diese Hydroxylierung hingegen gehemmt und es kommt unter anderem zur Expression spezieller Gene, welche für die Anpassung der Zellen an die vorherrschenden Bedingungen nötig sind (Bartrons & Caro, 2007). Ein Beispiel ist die Induktion von Enzymen der Glykolyse, bei welcher die

Zellen Energie durch den anaeroben Metabolismus von Glukose mit Laktat als Endprodukt erhalten (Nunes et al., 2019).

Unter aeroben Bedingungen wird die Energie in Form von ATP (Adenosintriphosphat) durch den biologischen Prozess der oxidativen Phosphorylierung gewonnen. Die für die ATP Synthese nötige Energie stammt aus der über mehrere Stufen ablaufenden Reoxidation der Coenzyme NADH/H^+ und FADH_2 mit Sauerstoff in der Atmungskette. Der exakte Ablauf der Atmungskette und der oxidativen Phosphorylierung, welche bei Eukaryoten ausschließlich an der inneren Mitochondrienmembran stattfindet, wird im Folgenden näher erläutert. Sowohl durch den Abbau von Glukose in der Glykolyse mit anschließender oxidativer Decarboxylierung als auch durch den von Fettsäuren durch β -Oxidation wird Acetyl-CoA gewonnen. Dieses wird daraufhin im Citratzyklus abgebaut, wobei aus einem Molekül Acetyl-CoA folgende Produkte entstehen: 2CO_2 , $3 \text{NADH}/\text{H}^+$, 1FADH_2 und 1GTP . Die Reoxidation der genannten Coenzyme mit Sauerstoff erfolgt über die mitochondrialen Enzymkomplexe I – IV in der Elektronentransportkette. Die dabei freiwerdende Energie wird genutzt, um Protonen aus dem Inneren der Mitochondrien nach außen zu pumpen, wodurch ein Protonengradient entsteht, welcher wiederum als Antrieb für die ATP-Synthese dient (von der Saal, 2020). Diese Fähigkeit von aeroben Organismen, Energie aus der sauerstoffabhängigen Oxidation der Coenzyme NADH/H^+ und FADH_2 zu gewinnen, hat allerdings einen Nachteil. Es werden reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet, welche schädlich für Biomoleküle und die Ursache für viele Krankheiten, wie Parkinson, Diabetes oder das Down-Syndrom, sind (J. M. Berg et al., 2018). Die Funktionsweise der Atmungskette kann unter Verwendung von Inhibitoren, wie Antimycin A oder Oligomycin A, untersucht werden. In beiden Fällen handelt es sich um Antibiotika, welche den Verbrauch von Sauerstoff und damit die ATP-Synthese hemmen. Antimycin A inhibiert den Komplex III der Atmungskette, was zum Verlust des elektrochemischen Gradienten führt, während Oligomycin A die ATP-Synthase selbst blockiert. Demnach wird der Protonengradient langsamer abgebaut, der Sauerstoffverbrauch sinkt und die Synthese von ATP kommt zum Erliegen (Harmjanz, 2021).

Während bei der Zellatmung Glukose zu Kohlenstoffdioxid oxidiert und Sauerstoff zu Wasser reduziert wird, läuft in den Chloroplasten grüner Pflanzen der Vorgang in umgekehrter Richtung ab. Das Prinzip der Photosynthese nutzt die Energie des Sonnenlichts, um Sauerstoff und Glukose zu bilden, was wiederum von den meisten aeroben Organismen für die Energiegewinnung benötigt wird. Somit ähneln sich die Photosynthese und die oxidative Phosphorylierung nicht nur in den Abläufen, sondern sie stellen auch einen zusammenhängenden Kreislauf dar, welcher in **Abbildung 2** gezeigt ist (J. M. Berg et al., 2018).

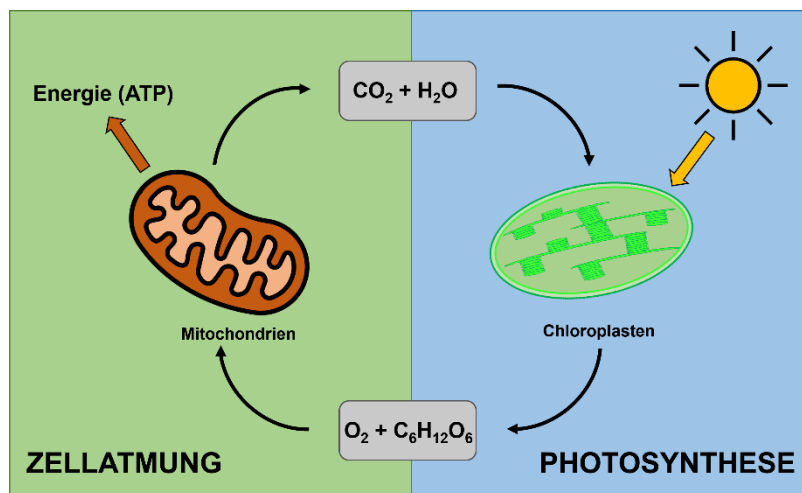


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Kreislaufes aus Zellatmung und Photosynthese. Die Photosynthese nutzt die Energie des Sonnenlichts, um aus Wasser und Kohlenstoffdioxid, Zucker und Sauerstoff herzustellen. Die Produkte werden wiederum unter anderem bei der Zellatmung verbraucht, um Energie (ATP) herzustellen. Neben Energie wird Wasser und Kohlenstoffdioxid gebildet, was wiederum die Grundbausteine für die Photosynthese sind (modifiziert nach Yamori, 2016).

Es wird ersichtlich, welche herausragende Bedeutung Sauerstoff hat. Während aerobe Zellen Sauerstoff für die Energiegewinnung und für die Ausführung wichtiger physiologischer Funktionen benötigen, spiegelt er in photosynthetischen Organismen durch die Anteile der umgewandelten Lichtenergie in chemische Energie deren Effizienz wider. Somit ermöglicht die generische Natur dieses Moleküls dessen Einsatz als Analyten, um zahlreiche Merkmale, Verhaltensweisen und Stoffwechselfparameter lebender Systeme zu untersuchen (Papkovsky & Dmitriev, 2013).

1.2 Gewebemodelle in der präklinischen Forschung

In vitro Zellkulturen und Computersimulationen stellen ein wichtiges Instrument in der biologischen und medizinischen Forschung dar. Durch sie ist es möglich, die Eigenschaften von Geweben zu untersuchen und gleichzeitig Tierversuche zu reduzieren. Im Folgenden wird sowohl näher auf *in vitro* Gewebemodelle (**Kapitel 1.2.1**) als auch auf *in silico* Techniken (**Kapitel 1.2.2**) sowie deren Nutzen eingegangen.

1.2.1 *In vitro* Gewebemodelle

Laut Angaben vom Bundesinstitut für Risikobewertung (2022), einer Einrichtung im Geschäftsbereich des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft, wurden 2021 in Deutschland rund 1,86 Millionen Tiere in Tierversuchen eingesetzt. Im Vergleich zum Jahr 2020 sind die Zahlen zwar um circa 2 % gesunken, aber es bleibt eines der größten Ziele, diese weiter zu reduzieren. Bereits 1959 postulierten Russel und Burch das 3R-Prinzip (*Replacement, Refinement, Reduction*) bezüglich des ethischen Einsatzes von Versuchstieren in der Forschung. Die konsequente Umsetzung dieses Prinzips führte zur Entwicklung von verschiedenen *in vitro* Modellen, welche die physiologischen Bedingungen im Gewebe imitieren können. Diese finden unter anderem in der Krebsforschung Anwendung, da Krebs trotz intensiver Forschung nach wie vor eines der größten globalen Gesundheitsrisiken darstellt (Ahmed, 2023). Aktuell sind mehr als 100 verschiedene Arten von Tumoren bekannt, welche an unterschiedlichen Orten im Gewebe lokalisiert sind. Klassische Behandlungsmethoden, wie Chemotherapie und Bestrahlung, sind wegen des heterogenen Charakters bösartiger Tumore oft nicht wirksam. Aus diesem Grund ist es wichtig, mit Hilfe von Gewebemodellen die Mikroumgebung zu verstehen und die Effizienz möglicher Arzneimittel zu untersuchen (Krzyszczuk et al., 2018).

Zweidimensionale (2D) Zellkultursysteme stellen das am häufigsten genutzte *in vitro* Modell dar, da sie mit ethischer Nachhaltigkeit, einer guten Kontrolle der experimentellen Bedingungen und einer hohen Reproduzierbarkeit überzeugen. Außerdem sind sie im Vergleich zu *in vivo* günstig (Loessner et al., 2013) und die Ergebnisse lassen sich relativ einfach analysieren. Dadurch, dass die Zellen in Form

von Monolagen (*Monolayer*) in Zellkulturgefäßen, wie Petrischalen, kultiviert werden, kommt es allerdings wegen unterschiedlicher Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen zu Abweichungen zwischen *in vitro* und *in vivo*. Außerdem führt die 2D Kultivierung zu einer Änderung des Phänotyps und der Polarität, was wiederum einen Einfluss auf die zellulären Funktionen hat (Breslin & O'Driscoll, 2013; Joseph et al., 2018; Kapałczyńska et al., 2018; Ricci et al., 2013).

Infolgedessen war es nötig, Modelle zu entwickeln, welche das *in vivo* Geschehen repräsentativer wiedergeben. Das Resultat sind dreidimensionale (3D) *in vitro* Gewebemodelle mit einer verbesserten Homöostase und Mikroumgebung. Innerhalb der 3D Zellkultur wird zwischen gerüstfreien Techniken, wie Sphäroiden und Organoiden, und gerüstbasierten (*scaffold*) unterschieden (Costa et al., 2016; Fang et al., 2023).

Multizelluläre Sphäroide wurden erstmals 1970 von Sutherland et al. zur Untersuchung von Tumoren eingesetzt, da diese in vielen Merkmalen übereinstimmen und somit geeignet sind, intervaskuläre Tumormikroregionen und Mikrometastasen zu simulieren (Sutherland, 1988). Bei Sphäroiden handelt es sich um kugelförmige Zellaggregate, mit Zell-Zell und Zell-Matrix Kontakten ähnlich zu *in vivo* Bedingungen (Lazzari et al., 2017; Vinci et al., 2012). Sie können ausschließlich aus einer Zelllinie (homotypisch) oder aus verschiedenen Zelllinien (heterotypisch) bestehen, wobei Letzteres, durch das unterschiedliche Verhältnis von Krebs- zu Stromazellen, die Heterogenität in Tumoren besser abbildet (Costa et al., 2016). Die Wachstumskinetik ist ebenfalls ähnlich zu den meisten avaskulären Tumoren *in vivo* und ist charakterisiert durch eine anfänglich exponentielle Wachstumsphase bis zu Durchmessern von 200 µm – 500 µm, gefolgt von einer Abnahme der Wachstumsrate bis zum Erreichen eines konstanten Volumens (Costa et al., 2016; Sutherland, 1988). Die zweite Phase des Wachstums wurde bereits 1964 mathematisch von Laird durch eine Gompertz-Funktion beschrieben, welche folgende Formel besitzt (Chignola et al., 1995; Laird, 1964):

$$V(t) = V_0 \cdot \exp\left(\frac{\alpha}{\beta} (1 - \exp(-\beta t))\right)$$

(1)

mit $V(t)$ als Volumen des Sphäroids zum Zeitpunkt t , dem Anfangsvolumen V_0 sowie den Konstanten α und β , wobei α die maximale Wachstumsrate und β die Rate ist, mit welcher sich das Wachstum verlangsamt (Ballangrud et al., 1999).

Durch mathematische Modelle ist es somit nicht nur möglich, das Wachstum zu beschreiben, sondern auch die mit dem Wachstum einhergehende schichtweise Organisation der Sphäroide vorherzusagen. Dies liegt darin begründet, dass sich mit zunehmender Größe der Sphäroide ab einem Durchmesser von circa 500 μm unterschiedliche Zonen aus einer proliferativen, einer ruhenden und einer nekrotischen Zone bilden (siehe **Abbildung 3**). Die proliferative Zone, welche in der Regel drei bis fünf Zellschichten umfasst (75 – 220 μm), besteht aus Zellen, die ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt sind und eine hohe Proliferationsrate besitzen. Die ruhenden Zellen in der Mitte sind lebendig, proliferieren aber nicht. Sie bilden den Hauptanteil des Zellaggregats. Die nekrotischen Zellen im Kern hingegen sterben wegen eines Mangels an Sauerstoff (Hypoxie) und Nährstoffen sowie einer steigenden Menge an Stoffwechselabfallprodukten und Kohlenstoffdioxid. Der Grad der Nekrose ist abhängig vom jeweiligen Zelltyp, der Verbrauchsrate und der Packungsdichte der Zellen sowie der Konzentration der Nährstoffe im Medium (Hirschhaeuser et al., 2010; Lazzari et al., 2017; Nath & Devi, 2016; Sutherland, 1988). Diese signifikanten Unterschiede in der Mikroumgebung eines Sphäroids spielen zudem eine entscheidende Rolle bei der Effizienz von Behandlungstherapien, da die Zellen der einzelnen Schichten unterschiedlich auf verschiedene Medikamente reagieren (Costa et al., 2016). Außerdem besitzen die hypoxischen Bereiche im Inneren des Sphäroids, welche 60 % aller nicht-vaskularisierten Tumore *in vivo* aufweisen (Vaupel & Mayer, 2005), eine angesäuerte Mikroumgebung. Gemäß dem Warburg Effekt gewinnen die Zellen Energie indem sie das aus der Glykolyse stammende Pyruvat in Laktat umwandeln, statt es den Mitochondrien im Citratzyklus zuzuführen. Infolgedessen kommt es zu einer Ansäuerung und die Zellen beginnen mit der Produktion von

Faktoren, die wiederum die Transformation zu malignen Zellen sowie deren Überleben fördern (Alfarouk et al., 2014; Koppenol et al., 2011).

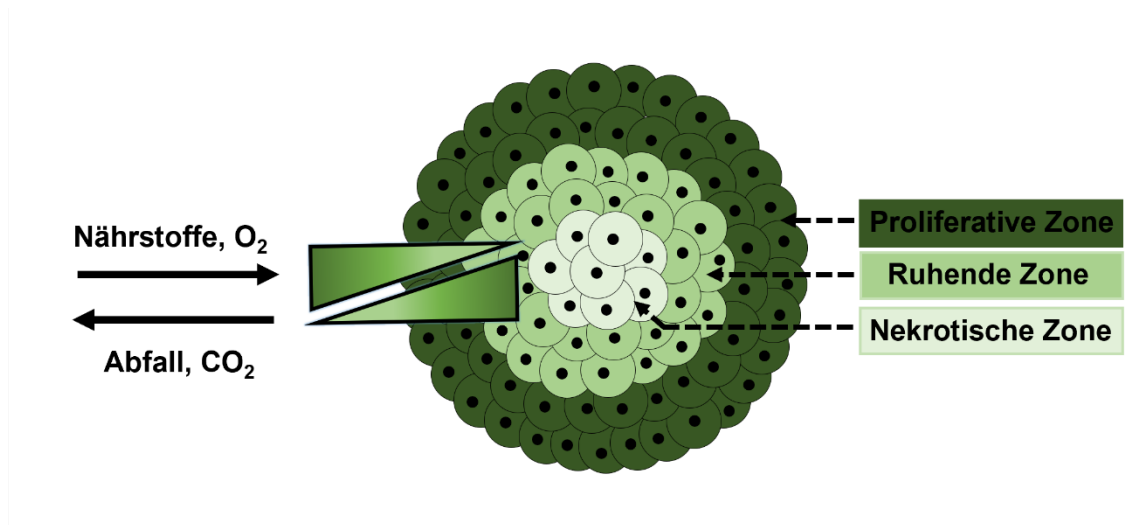


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Mikroumgebung und der Gradienten in Sphäroiden (modifiziert nach Dirheimer et al., 2022; Lazzari et al., 2017). In einem Sphäroid mit einem Durchmesser von circa 500 µm bilden sich unterschiedliche Zonen aus (proliferative, ruhende und nekrotische Zone) sowie Gradienten. Während die Sauerstoff- und Nährstoffkonzentration zum Zentrum hin abnimmt, steigt die von toxischen Abfallprodukten und Kohlenstoffdioxid CO₂ zum Zentrum hin an.

Für die Herstellung von Sphäroiden gibt es verschiedene Methoden, wie die *hanging drop* oder die *liquid overlay* Technik, bei welcher sich die Aggregate selbstorganisiert bilden. Bei ersterer Technik werden kleine Volumina einer Zellsuspension an die Unterseite eines Petrischalendeckels pipettiert, dieser wird anschließend umgedreht und es kommt zur Bildung eines hängenden Tropfens. Durch die Schwerkraft und der natürlichen Tendenz der Zellen aneinander zu haften, wird die Bildung von Sphäroiden induziert. Die zugrundeliegende Oberflächenspannung garantiert, dass die Tröpfchen beziehungsweise die Sphäroide an Ort und Stelle bleiben. Die Methode zeichnet sich durch ihre einfache und schnelle Durchführung aus. Außerdem besitzt sie eine hohe Reproduzierbarkeit, da die Größenvariabilität der generierten Sphäroide sehr gering ist. Andererseits gibt es Grenzen in der resultierenden Größe, da aufgrund der Oberflächenspannung das Volumen des Flüssigkeitstropfens auf 50 µL beschränkt ist. Alternativ dazu aggregieren Zellen bei der *liquid overlay* Technik zu Sphäroiden, indem Substrate mit nicht-adhäsiven Oberflächen verwendet werden (Breslin & O'Driscoll, 2013; Foty, 2011; Swami, 2014). Auf das genaue Vorgehen wird in **Kapitel 4.1.4** näher eingegangen.

Ein weiteres 3D Gewebemodell, welches durch eine gerüstfreie Technik generiert werden kann, sind Organoide. Die Herstellung erfolgt unter Verwendung embryonaler, adulter oder pluripotenter Stammzellen (Fang et al., 2023) und kann mehrere Monate dauern (Gunti et al., 2021). Die verschiedenen Zelltypen bilden dabei spontan selbstorganisierte dreidimensionale Aggregate aus, welche die Struktur und die Funktionalität eines menschlichen Organs imitieren (Shyam et al., 2023). Der Hauptunterschied zu Sphäroiden besteht darin, dass Organoide hochgradig geordnet und polarisiert sind, während Sphäroide unorganisierte Zellcluster nachahmen (Fang et al., 2023). Infolgedessen stellen Organoide ein verbessertes 3D Gewebemodell dar, mit der Möglichkeit, menschliches Gewebe von höherer Komplexität *in vitro* zu untersuchen (Fatehullah et al., 2016; Langhans, 2018).

Im Unterschied zur gerüstfreien Herstellung von 3D Gewebemodellen werden bei gerüstbasierten Techniken die Zellen in 3D Polymergerüste eingebettet (Swami, 2014). Diese Technologie unterstützt die Bildung einfacher mechanischer Strukturen bis hin zu Matrizen, welche der extrazellulären Matrix (ECM) ähneln, und ermöglichen damit die Aggregation, Proliferation und Migration der Zellen (Langhans, 2018). Hydrogele stellen das am häufigsten verwendete Gerüstmaterial dar (Joseph et al., 2018). Dabei handelt es sich um 3D Netzwerke aus hydrophilen Polymeren (Unnikrishnan et al., 2021). Trotz des hohen Wassergehalts (bis zu 95 %) bleibt die 3D-Struktur weitgehend erhalten (Langhans, 2018; Unnikrishnan et al., 2021). Sie ahmen die physiologischen Eigenschaften der ECM von Geweben (Ricci et al., 2013), wie Steifigkeit oder Adhäsivität (Langhans, 2018), nach, wodurch es vermehrt zu Zell-Matrix Interaktionen und damit zur Bildung multizellulärer Zellaggregate kommt (Cui et al., 2017). Es wird zwischen Hydrogelen aus synthetischen und biologischen Materialien unterschieden. In synthetischen Hydrogelen aus Polyethylenglykol oder Polyacrylsäure sind die chemischen, physikalischen und mechanischen Eigenschaften klar definiert (Joseph et al., 2018). So lassen sich die Porengröße oder die Steifigkeit und damit die Charakteristika der extrazellulären Matrix mit dem gewählten Polymertyp oder dem Vernetzungsmechanismus beeinflussen (Blache & Ehrbar, 2020). Außerdem können individuelle zelluläre Funktionen, wie zum Beispiel die Proliferation, durch den gezielten Einbau von Wachstumsfaktoren oder Hormonen in das Hydrogel

gefördert und somit genau untersucht werden (Langhans, 2018). Im Vergleich zu synthetischen besitzen biologische Hydrogele, wie Kollagen oder Matrigel, natürliche Zelladhäsionsmotive für Integrine (Langhans, 2018) und im Falle von Matrigel auch endogene Wachstumsfaktoren (Nunes et al., 2019). Somit werden Integrin-vermittelte zelluläre Signalwege aktiviert und physiologische Zellfunktionen (Langhans, 2018), wie Zellviabilität, -wachstum oder -differenzierung gesteuert (Hoarau-Véchet et al., 2018; Joseph et al., 2018). Die Nachteile biologischer Hydrogele sind, dass sich diese schnell abbauen und schwache mechanische Eigenschaften, wie eine geringe Elastizität, besitzen (Hoarau-Véchet et al., 2018; Shyam et al., 2023). Zudem hängt deren exakte chemische Zusammensetzung von der jeweiligen Charge ab, was zu einer erschwerten Reproduzierbarkeit führt (Nunes et al., 2019; Tibbitt & Anseth, 2009). Hydrogele finden oft Anwendung bei der Kultur und Analyse von 3D Gewebemodellen unter Fluss: der Mikrofluidik (siehe **Kapitel 1.3**). Das wohl bekannteste Beispiel ist ein *organ-on-a-chip*, bei welchem ein künstlich hergestelltes Organ unter Fluss mit Hilfe von im Chip integrierten Sensoren untersucht wird. (Langhans, 2018; van der Meer & van der Berg, 2012).

Das Bestreben *in vivo* Tierversuche zu reduzieren, führte zur Entwicklung verschiedener Gewebemodelle, welche sich hinsichtlich mehrerer Faktoren unterscheiden (siehe **Abbildung 4**). Wegen seiner hohen Reproduzierbarkeit, der geringen Kosten und dem einfacheren Zugang zu Bildgebungs- sowie Analyseverfahren bilden 2D Gewebemodelle nach wie vor das Zellkultursystem, welches am häufigsten verwendet wird (Ahmed, 2023). 3D Gewebemodelle ähneln hingegen mehr dem *in vivo* Szenario im Hinblick auf die Zellheterogenität (Nath & Devi, 2016), die erhaltene Zellmorphologie und -polarität (Kapałczyńska et al., 2018) sowie die physiologischen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte (Kapałczyńska et al., 2018; Lazzari et al., 2017). Sie bilden eine Brücke zwischen *in vitro* 2D Gewebemodellen und Tierversuchen und werden daher zunehmend in der Forschung eingesetzt (Joseph et al., 2018).

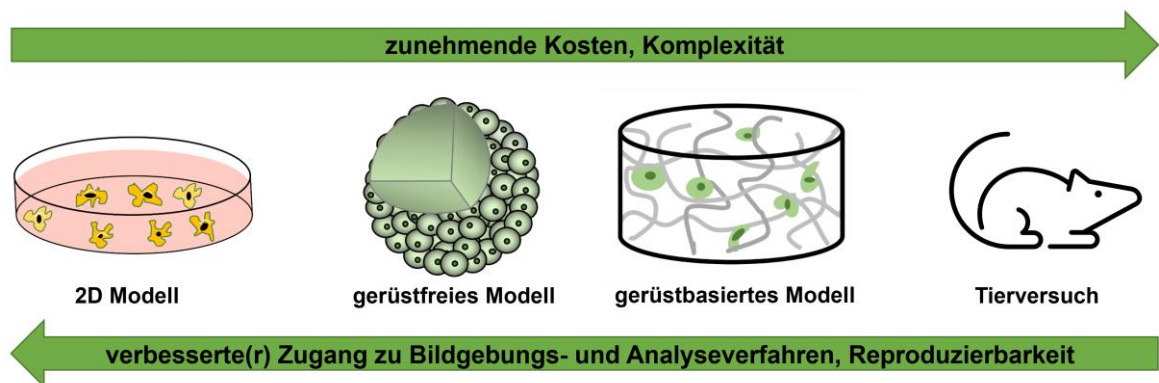


Abbildung 4: Schematische Gegenüberstellung der 2D und 3D *in vitro* Modelle sowie der *in vivo* Tierversuche hinsichtlich der Parameter Kosten, Komplexität, Zugang zu Analyse- und Bildgebungsverfahren und Reproduzierbarkeit (modifiziert nach Alemany-Ribes & Semino, 2014).

1.2.2 *In silico* Techniken

Die Ergänzung experimentell gewonnener Erkenntnisse mit Computersimulationen ermöglicht effizientere Behandlungsmöglichkeiten sowie ein tieferes Verständnis komplexer Systeme (Amereh et al., 2021; Materi & Wishart, 2007).

Die allgemeine Definition einer Simulation ist nach Dokos (2017) die numerische Lösung einer mathematischen oder rechnergestützten Darstellung von physikalischen Systemen. Aufgrund der Tatsache, dass beide Methoden mittels numerischer Verfahren gelöst werden können und rechnergestützte Darstellungen häufig auf mathematischen Gleichungen basieren, werden die Begriffe der mathematischen und computerbasierten Modellierung größtenteils synonym verwendet. Obwohl *in silico* Ansätze bereits ein gängiges Verfahren in den Ingenieurwissenschaften darstellen, entwickelt sich die Nutzung im biomedizinischen Bereich nur sehr träge. Dies kann dadurch begründet werden, dass die Grundlage der Forschung hier komplexe lebende Organismen darstellen (Dokos, 2017). Diese Komplexität führt letztlich auch dazu, dass das Augenmerk bei *in vitro* und *in vivo* Experimenten reduktionistisch auf wenige Aspekte gelegt wird (Materi & Wishart, 2007). Die Durchführung der Experimente ist mit einem teilweise enormen Kosten- und Zeitaufwand verbunden (Malandrino et al., 2018). Loessner et al. (2013) stellten die Kosten und den Zeitaufwand eines etablierten *in silico*, *in vitro* und *in vivo* Modells zur Untersuchung multizellulärer Sphäroide (siehe **Kapitel 1.2.1**) gegenüber. Im Falle, dass die Studie von einem erfahrenen

Wissenschaftler durchgeführt wird, belaufen sich die Gesamtkosten einer Durchführung *in vitro* auf 14500 US-Dollar für einen Zeitraum von circa vier Wochen. Bei einer *in vivo* Studie steigern sich diese auf 35500 US-Dollar und die vierfache Zeit, während ein *in silico* Experiment lediglich eine Woche dauert mit Gesamtkosten von 1500 US-Dollar. Dabei sind die Kosten der *in silico* Experimente auf die des Personals beschränkt, während sich die Gesamtkosten bei *in vitro* und *in vivo* Experimenten aus Personal- und Materialkosten zusammensetzen. Diese Aspekte und die Tatsache, dass es Computersimulationen durch eine systematische Variation zugrundeliegender Parameter ermöglichen, das System unter mehreren Gesichtspunkten zu analysieren (Loessner et al., 2013; Malandrino et al., 2018), führen zu einer zunehmenden Nutzung im Bereich der Naturwissenschaften und Medizin, wie zum Beispiel im Rahmen der Kultur von Organoiden (Thalheim et al., 2022) oder bei der Analyse der Resistenz von Krebstherapien (Bacevic et al., 2017; Yilmaz et al., 2022). Allerdings sind *in silico* Methoden nach Materi und Wishart (2007) nur dann nützlich, wenn folgende Kriterien erfüllt sind:

- 1) Erstellung von Vorhersagen und Extrapolationen, die mit experimentellen Ergebnissen übereinstimmen.
- 2) Testen von Ideen, die mit Laborexperimenten schwer möglich wären.
- 3) Schaffen von tiefergehenden und ganzheitlichen Einblicken in die Funktionsweise eines komplexen biologischen Systems.
- 4) Ermöglichung eines verbesserten Verständnisses und einer detaillierteren Visualisierung.

Infolgedessen können die meisten Fortschritte erlangt werden, wenn *in silico* und *in vitro/in vivo* Studien kombiniert werden. Die Verlässlichkeit der Ergebnisse aus den Computersimulationen wird mit Experimenten evaluiert und ausgehend davon werden neue Hypothesen generiert, neue Experimente entwickelt und bestehende *in vitro* Studien optimiert (Malandrino et al., 2018). Der gesamte Modellierungsprozess kann nach Dokos (2017) in vier Phasen unterteilt werden, welche iterativ aufeinanderfolgen (siehe **Abbildung 5**). Die erste Phase stellt die Formulierung des zugrundeliegenden Modellierungsproblems dar. Dabei werden die Regeln und Gleichungen herausgearbeitet, welche das System charakterisieren. Die meisten Prozesse folgen

dabei physikalischen Gesetzen und können mit gewöhnlichen Differentialgleichungen (ODE) oder partiellen Differentialgleichungen (PDE) beschrieben werden. In der zweiten Phase werden die Ergebnisse der Formulierung in den Computer implementiert, was als Codierung bezeichnet wird. Dafür sind eine Vielzahl von Parametern und Variablen für molekulare Konzentrationen, Diffusionskonstanten oder Reaktionsraten erforderlich, welche teilweise der Literatur entnommen werden können (Materi & Wishart, 2007). Bei unbekannten Werten werden diese unter Berücksichtigung sinnvoller Wertebereiche iterativ angepasst. Nach Ausführung der Simulation werden die Ergebnisse verifiziert, indem geprüft wird, ob diese die gewünschte Verlässlichkeit und Qualität entsprechend der zugrundeliegenden physikalischen Gesetze besitzen. Sollten die Ergebnisse nicht die geforderte Lösung darstellen, muss die Codierung überarbeitet werden. In der vierten und letzten Phase erfolgt die Validierung der Simulation mit experimentell generierten Daten aus *in vitro* oder *in vivo* Studien. Wird das reale System nicht ausreichend durch die Computersimulation beschrieben, müssen zunächst die Parameter und Variablen in der Codierung geändert werden oder gegebenenfalls muss der komplette Modellierungsprozess wiederholt werden.

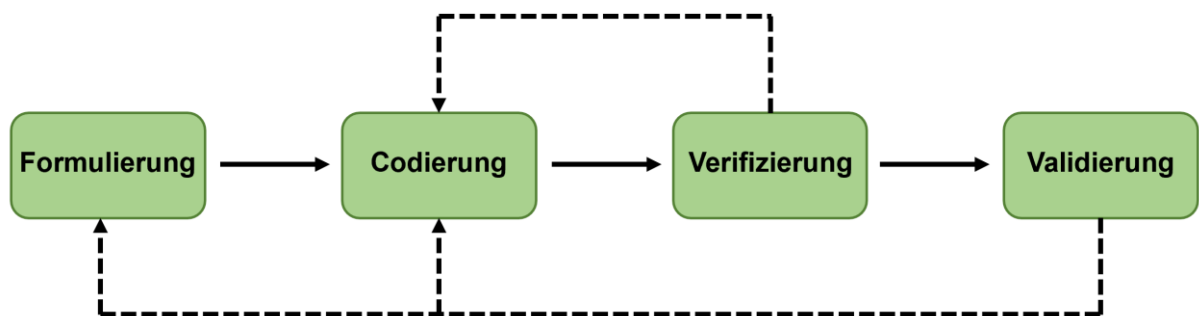


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Phasen eines Modellierungsprozesses (modifiziert nach Dokos, 2017).

Mathematische oder computerbasierte Modelle können linear oder nicht linear, dynamisch oder statisch, deterministisch oder stochastisch sowie kontinuierlich oder diskret sein (Dokos, 2017), wobei im Folgenden näher auf die letzten beiden Modellierungstypen eingegangen wird.

Die Unterscheidung zwischen kontinuierlichen und diskreten Modellen muss unter Berücksichtigung der verschiedenen Raum- und Zeitskalen in der Biomedizin erfolgen (Deisboeck et al., 2011; Materi & Wishart, 2007). Aufgrund der Tatsache, dass die Entwicklung von Krebs einer der komplexesten Prozesse im lebenden Organismus darstellt, erfolgt die Visualisierung der verschiedenen Skalen in **Abbildung 6** anhand des Krebsmodells (Materi & Wishart, 2007).

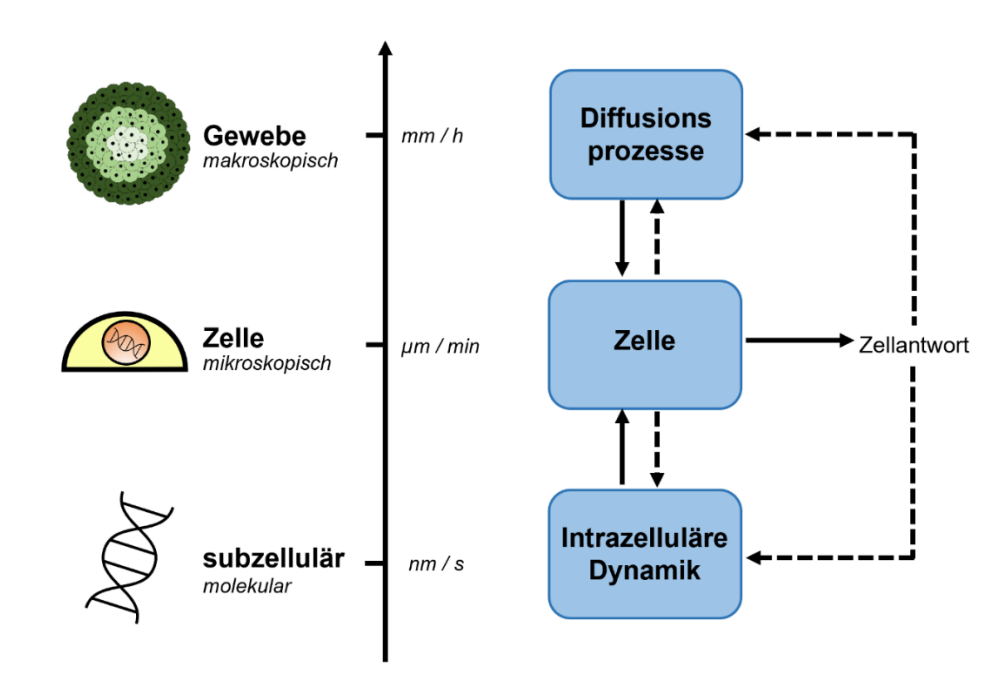


Abbildung 6: Schematische Darstellung der verschiedenen Raum- und Zeitskalen sowie deren Interaktion in der Biomedizin. Die Zelle bildet die mikroskopische Drehscheibe des Systems (μm und min) mit Auswirkungen auf makroskopische und subzelluläre Prozesse. Modelle mit makroskopischen Skalen (mm und h) umfassen das Gewebe im Ganzen sowie die darin ablaufenden Diffusionsprozesse. Intrazelluläre Prozesse quantifizieren subzelluläre Dynamiken, wie Signalkaskaden, mit Raum- und Zeitskalen von Nanometer und Sekunden (modifiziert nach Materi & Wishart, 2007; Stéphanou & Volpert, 2016).

Die makroskopische Ebene bildet dabei das Tumorgewebe selbst, welches auf Millimeter und Stunden skaliert ist. Auf dieser Ebene wird das Gewebe im Ganzen hinsichtlich seiner Form, Heterogenität oder Vaskularisation untersucht. Außerdem erfolgt hier die Quantifizierung von Konzentrationsgradienten verschiedener Moleküle, wie Sauerstoff, Glukose oder Nährstoffen. Die Mikroebene betrachtet die Eigenschaften der Zelle auf kleineren Raum- und Zeitskalen (μm und min), wie die Zellteilung sowie Apoptose und Nekrose. Intrazelluläre Prozesse, wie die

Signaltransduktion oder die DNA-Replikation, werden auf molekularer Ebene im Nanometer- und Sekundenbereich analysiert. Die mikroskopische Zellantwort bildet dabei den Mittelpunkt der einzelnen Ebenen. Diese wird oftmals gemittelt, um eine detailliertere Beschreibung auf makroskopischer Ebene zu erhalten sowie ein verbessertes Verständnis für intrazelluläre Prozesse. Am Beispiel von Krebs führt die genetische Veränderung einer Zelle durch Proliferation, Migration und Interaktion mit anderen Zellen zur Entwicklung von Tumoren, welche wachsen und metastasieren können (Materi & Wishart, 2007; Stéphanou & Volpert, 2016).

Kontinuierliche Modelle behandeln die globalen Eigenschaften des Gewebes auf makroskopischer Ebene. Das Gewebe wird hierbei durch Parameter charakterisiert, welche die Dichte und Volumenanteile unterschiedlicher Zellen sowie Konzentrationsgradienten von Substraten, wie Glukose oder Sauerstoff, betreffen. Die Prozesse folgen dabei oft partiellen Differentialgleichungen und die numerischen Lösungen können relativ einfach analysiert und durch Experimente validiert werden (Deisboeck et al., 2011; Lowengrub et al., 2010). In einem der ersten Kontinuum-Modelle stellte Greenspan (1972) die Entwicklung von Tumoren in Abhängigkeit verschiedener Diffusionsprozesse dar. Er untersuchte die Effekte der hemmenden Wirkung von chemischen Komponenten auf die Proliferation der Zellen und dem damit verbundenen Tumorwachstum. Ähnliches war auch Bestandteil der Studie von Grimes et al. (2016), welche das Wachstum von Sphäroiden in Abhängigkeit vom Sauerstoffverbrauch und der Proliferation quantifizierten. Leedale et al. (2021) beschäftigten sich im Detail mit den Sauerstoffgradienten in Lebergewebe, welches aus Stammzellen gewonnen wurde, und der daraus resultierenden nötigen Optimierung der Zellkulturbedingungen.

Im Vergleich zu kontinuierlichen Modellen befassen sich diskrete Modelle mit detaillierteren mikroskopischen Prozessen, wie dem Verhalten einzelner Zellen untereinander oder mit ihrer Mikroumgebung (Lowengrub et al., 2010; Stéphanou & Volpert, 2016). Dabei stellt jede Zelle eine separate Einheit dar, welche durch verschiedene Eigenschaften und Variablen beschrieben werden kann (Rejniak & McCawley, 2010). Die Eigenschaften wiederum sind auf einem festen Gitter (*lattice-based*) oder auf frei beweglichen Gitterteilen (*lattice-free*) definiert (Deisboeck

et al., 2011). Zelluläre Automaten (*Cellular Automata* CA) sind ein Beispiel für einen gitterbasierten Modellierungsansatz dar. Der Zellularraum besitzt dabei eine gewisse Dimensionalität (2D oder 3D) und umfasst eine unendliche Anzahl von Punkten auf einem fest angeordneten Gitter. Jede Zelle kann dabei eine endliche Zahl an Zuständen annehmen und der Übergang von einem Zustand zum nächsten wird durch definierte Regeln beschrieben. Die Entwicklung einzelner Zellen zum Zeitpunkt $t+1$ ist somit vom eigenen Zustand sowie den Zuständen der Nachbarn zum Zeitpunkt t abhängig (Deisboeck et al., 2011; Materi & Wishart, 2007). Kansal et al. (2000) entwickelten ein dreidimensionales zelluläres Automatenmodell für das Wachstum von Hirntumoren und zeigten damit, dass das makroskopische Wachstum des Tumors mit mikroskopischen Parametern modelliert werden kann. Bei gitterfreien Methoden hingegen, wie der agentenbasierten Modellierung (*Agent-Based Model* ABM), sind sogenannte Agenten (Proteine, Metaboliten, Zellen) autonom in ihrem Handeln und ihren Entscheidungen (Materi & Wishart, 2007). Mit einem solchen Modell untersuchten Carrasco-Mantis, Alarcón und Sanz-Herrera (2023) die Beeinflussung der Vaskulogenese durch die mechanischen Eigenschaften der extrazellulären Matrix und stellten fest, dass mit einer zunehmenden Steifigkeit die Proliferation steigt, während diese mit einer erhöhten Viskoelastizität sinkt. Aufgrund der Tatsache, dass Organismen aus einer Vielzahl von Zellen bestehen, ist es schwierig, diese einzig mit diskreten Modellen zu simulieren, da dies einen enormen Rechenaufwand mit sich bringen würde (Lowengrub et al., 2010).

Eine Möglichkeit, makroskopische und mikroskopische Prozesse und somit kontinuierliche und diskrete Modelle zu kombinieren, stellen Hybrid-Ansätze dar (Materi & Wishart, 2007). Diese können nach Stéphanou und Volpert (2016) in drei verschiedene Typen unterteilt werden: unabhängige, gekoppelte und komplexe Modelle. Eine unabhängige Modellierung ist genau dann möglich, wenn das zugrundeliegende Problem hinsichtlich verschiedener Aspekte unterteilt werden kann, wobei der jeweilige Modellierungsansatz (zum Beispiel kontinuierlich und diskret) der einzelnen Aspekte voneinander abweichen kann. Die beiden Modelle können somit zwei verschiedene Aspekte eines Phänomens betrachten oder das gleiche Phänomen auf zwei unterschiedliche Weisen beschreiben. Schaller und Meyer-Hermann (2006)

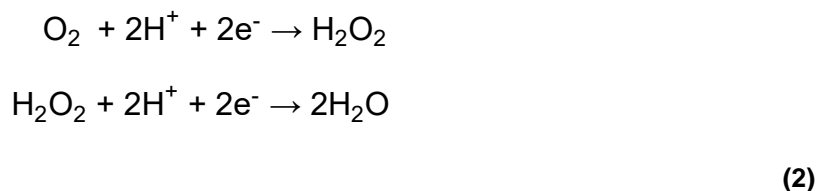
untersuchten mit einem solchen Ansatz die experimentellen Wachstumsstufen eines Sphäroids mit proliferativen und nekrotischen Zellen unter Berücksichtigung verschiedener Nährstoffkonzentrationen, wie Sauerstoff und Glukose. Die Ergebnisse wurden mit denjenigen einer agentenbasierten Modellierung, in welcher die Zellen als Agenten fungierten, verglichen mit dem Resultat, dass das makroskopische Modell, welches numerisch effizienter ist, ausreicht, um die Wachstumsstudien zu erklären. Ähnliches wurde auch von Byrne und Drasdo (2009) berichtet. Die häufigste Art von Hybrid-Modellen stellen die vom gekoppelten Typ dar, deren typische Anwendung bei Problemen mit unterschiedlichen Skalen liegt (siehe **Abbildung 6**). Beispielsweise kann hierbei eine beliebige Variable mittels eines kontinuierlichen Modells evaluiert und das Ergebnis in einem diskreten Modell genutzt werden. Franssen et al. (2019) koppelten ein diskretes Modell, mit welchem die Zelldynamik beschrieben wird, mit einem kontinuierlichen Modell für die Quantifizierung der Metastasierung. Ebenfalls nutzten Sadhukhan und Mishra (2022) ein solches Hybrid-Modell, in welchem makroskopische, mikroskopische und molekulare Prozesse integriert sind, für die Untersuchung des heterogenen Charakters von wachsenden Tumoren sowie deren Invasion in gesundes Gewebe. Die letzte Kategorie an Hybrid-Modellen ist aufgrund seines komplexen Charakters nur schwer zu definieren und zu analysieren, da hier zwischen den zugrundeliegenden Modellarten nicht differenziert werden kann.

In silico Methoden stellen somit eine interdisziplinäre Möglichkeit dar, um *in vitro* und *in vivo* Studien kostengünstig und in kurzer Zeit zu optimieren. Außerdem ermöglichen sie es, Erkenntnisse in der biomedizinischen Forschung zu liefern, welche mit Experimenten nur schwer zugänglich sind. Zudem sind sie ein nützliches Instrument, um den Erkenntnisgewinnungsprozess im Allgemeinen zu verkürzen (Amereh et al., 2021; Materi & Wishart, 2007).

1.3 *State-of-the-Art* der Methoden zur Sauerstoffmessung

Aufgrund der zentralen Bedeutung von Sauerstoff im Zellmetabolismus (siehe **Kapitel 1.1**) ist dessen Quantifizierung mittels Sensormaterialien außerordentlich wichtig. Der Nachweis und die Quantifizierung der Sauerstoffverteilung auf zellulärer Ebene und im Gewebe bilden die Grundlage für das Verständnis der damit verbundenen Prozesse unter normalen physiologischen Bedingungen und für die Beurteilung von Krankheitsverläufen (Roussakis et al., 2015).

Als Goldstandard gelten bis heute elektrochemische Verfahren mit **polarographischen Elektroden**. Die erste Technik, um den Sauerstoffgehalt im Gewebe zu messen, geht auf die Entwicklung der Clark-Elektrode in den 1950er Jahren zurück (Clark et al., 1953). Diese Elektrode besteht gewöhnlich aus einer Silberanode und einer Platinkathode, welche über eine Elektrolytlösung miteinander verbunden und von der Probelösung über eine Membran getrennt sind. Wird die Membran in die Probe getaucht und eine Spannung von circa 0,7 V an der Kathode angelegt wird Sauerstoff gemäß folgender Reaktionsgleichung reduziert:



Mit steigender Spannung wird der Stromfluss immer größer und es entsteht ein proportionales Verhältnis zwischen der Stromstärke und den pro Zeiteinheit zur Elektrode diffundierenden Menge an Sauerstoff. Dadurch ist der Strom ein Maß für den Sauerstoffgehalt (Park et al., 2007). Obwohl die Methode als Goldstandard für die Messung von Sauerstoff gilt und demnach gut etabliert ist, gehen auch einige Nachteile damit einher (Roussakis et al., 2015). So ist diese zum einen durch ihre Invasivität und damit der Schädigung des Gewebes gekennzeichnet (Wolfbeis, 2015). Zum anderen verbraucht die Elektrode Sauerstoff während der Messung, was vor allem bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen, wie in hypoxischen Tumoren, zu falschen Ergebnissen führen kann (Dewhirst et al., 2000; Wolfbeis, 2015). Infolgedessen erfolgten viele Optimierungsansätze mit dem Ziel, die Elektroden für die

Messung des Sauerstoffpartialdruckes im Gewebe geeigneter zu machen. Mikroelektroden mit versenkter Spitze und das Elektrodensystem von Eppendorf sind zwei Ergebnisse dieser Optimierungen. Mit Mikroelektroden wurde die Invasivität und somit Schäden am Gewebe reduziert. Das Elektrodensystem von Eppendorf hingegen nutzt eine computergestützte Methodik, die es erlaubt, die Elektroden auf präzise Art und Weise durch das Gewebe zu bewegen. Dies hat den Vorteil, dass der Sauerstoffverbrauch der Elektrode selbst minimiert wird. Allerdings sind durch die Bewegung der Elektrode keine Wiederholungsmessungen an der gleichen Stelle möglich. Infolgedessen eignet sich das Elektrodensystem von Eppendorf nicht für die zeitaufgelöste Überwachung von Änderungen im Sauerstoffpartialdruck (Dewhirst et al., 2000; Park et al., 2007; Roussakis et al., 2015). Dennoch wurden polarographische Elektroden in vielen Studien genutzt, wie zum Beispiel zur Messung des Sauerstoffpartialdruckes (pO_2) in Sphäroiden in Abhängigkeit von der Größe (Walenta et al., 1990), der Sauerstoffzufuhr (Mueller-Klieser et al., 1986) oder während der Entwicklung nekrotischer Bereiche (Mueller-Klieser et al., 1985). Eine weitere Anwendung von Mikroelektroden ist die in künstlich hergestelltem Gewebe. Durch Messung des Sauerstoffgradienten in Echtzeit kann die Aktivität von künstlichem Gewebe überwacht und somit unter anderem die Kultivierungsbedingung effizienter gestaltet werden (Kagawa et al., 2017). Eine der neuesten Anwendungen von Sauerstoffsensoren auf Basis der Clark-Elektrode stellt ein implantierbarer Miniatursensor dar. Die Mikrosensoren wurden auf Silizium auf Waferebene gefertigt und wurden dazu genutzt die Sauerstoffkonzentration in einem Lungentumor von einem Schaf zu messen (Marland et al., 2020).

Im Vergleich zu polarographischen Elektroden ermöglichen Radioisotopentechniken, wie die **Positronen-Emissions-Tomographie (PET)**, eine dreidimensionale Ganzkörperbildgebung der Stoffwechselvorgänge im Körper (Roussakis et al., 2015). Hierbei binden Moleküle, welche ein Positron emittierendes Isotop besitzen, spezifisch an biologische Strukturen. Solche Moleküle werden *PET-Tracer* genannt. Dabei handelt es sich im Allgemeinen um radioaktiv markierte und niedrigdosierte Substanzen, welche eine hohe Sensitivität und ein geringes toxikologisches Risiko besitzen. Es reichen wenige *PET-Tracer* aus, um ein intensives Signal zu erzeugen.

Die dieser Technik zugrundeliegenden Positronen wurden 1932 von Anderson nachgewiesen. Bei der PET-Untersuchung wird dem Patienten ein PET-*Tracer* verabreicht, welcher auf das zu untersuchende Gewebe abgestimmt ist. Nach einem spontanen β^+ -Zerfall wird ein Positron freigesetzt, das nach einer kurzen Wegstrecke auf ein energetisch geeignetes Elektron trifft. Als Folge wird das Positron ausgelöscht und es werden Gammastrahlungs-Photonen freigesetzt, welche von einem PET-Detektor registriert und mit Unterstützung von Computern zu einem 3D Bild verarbeitet werden. Bei der Auswahl der klinischen Isotope sind viele Faktoren zu berücksichtigen. So spielen beispielsweise die Halbwertszeiten, die Strahlenbelastung, die Herstellung und die Anforderungen hinsichtlich der zugrundeliegenden Fragestellung eine entscheidende Rolle (Bauser & Lehmann, 2012). Der am häufigsten verwendete PET-*Tracer* ist die schwach radioaktiv markierte ^{18}F -Fluordesoxyglukose (^{18}F -FDG), welche sowohl für die Darstellung von Tumoren (Adejolu et al., 2012; Ostertag, 1992) als auch im Rahmen der Demenzdiagnostik (Asenbaum, 2011) Anwendung findet. Unter den endogenen Isotopen (^{11}C , ^{15}O und ^{13}N) werden ^{15}O markierte *Tracer* genutzt, um die Sauerstoffversorgung *in vivo* zu verfolgen. Dabei wird $^{15}\text{O}_2$ kurz inhaliert und anschließend dynamisch gemessen (Bauser & Lehmann, 2012; Magata et al., 2003; Roussakis et al., 2015). Durch die Bestimmung des Zuflusses von $^{15}\text{O}_2$ durch das arterielle Blut können wichtige Parameter, wie das zerebrale Blutvolumen (CBV), die zerebrale Perfusion (CBF) oder die regionale zerebrale Stoffwechselrate von Sauerstoff (rCMRO_2), bestimmt werden (Asenbaum, 2011). Außerdem können Sauerstoffversorgung und -verbrauch im Gewebe quantifiziert werden (Roussakis et al., 2015). ^{15}O markierte *Tracer* finden trotz kleiner Halbwertszeiten (2 min) eine breite Anwendung in der klinischen Forschung, wie bei der Überwachung der Durchblutung in Tumoren (de Langen et al., 2008) oder zur Bestimmung des Grades der zerebralen Ischämie bei Schlaganfällen (Sette et al., 1989) und Hirntumoren (Hino et al., 1990). Aufgrund der Tatsache, dass die PET nur Auskunft über die Stoffwechselaktivität der untersuchten Körperregion gibt, wird diese oft mit Verfahren, wie der Kernspintomographie (MRT) oder der Computertomographie (CT), kombiniert, um ebenfalls Bilder der anatomischen Strukturen zu erhalten. Dies ermöglicht eine genauere und spezifischere Diagnose. Allerdings erfordert es einen enormen Zeitaufwand und kostenintensive Instrumente (Bauser & Lehmann, 2012).

Eine weitere Möglichkeit, um den Sauerstoff messen zu können, bildet die Gruppe der **magnetischen Resonanstechniken** (MR). Dabei wird zwischen Kernresonanstechniken, welche auf der ^{19}F und ^1H -Magnetresonanz basieren, und Techniken auf Grundlage der Elektronenspinresonanz (EPR) unterschieden (Roussakis et al., 2015). Die quantitative ^{19}F -MR Oxymetrie nutzt die Sensitivität von Perfluorkohlenwasserstoffen (PFC) gegenüber Sauerstoff. Durch die lineare Abhängigkeit der Spin-Gitter-Relaxationsrate von ^{19}F in PFCs vom pO_2 ist es möglich, den Sauerstoffgehalt zu quantifizieren. Das jeweilige Kontrastmittel wird minimalinvasiv in das Gewebe injiziert oder systemisch verabreicht, was ebenfalls zu einer Wirkstoffverteilung im ganzen Körper führt (Roussakis et al., 2015; Yu et al., 2013). Liu et al. (2011) berichten von der Messung des regionalen Sauerstoffpartialdruckes mittels ^{19}F in Hexafluorbenzol (HFB) als Kontrastmittel. Dabei wurde in mehreren Organen eines Rattenmodells beobachtet, dass die Inhalation von 100 % Sauerstoff den pO_2 Wert in den Organen erhöht und die Sauerstoffverteilung quantifiziert werden kann. Kadayakkara et al. (2010) nutzten die ^{19}F -Magnetresonanstechnik, um die Tumorlokalisation *in vivo* zu visualisieren. Dazu wurden 9L-Gliomzellen einer Ratte *ex vivo* mit einer Perfluorkohlenwasserstoffverbindung markiert und die beladenen Stammzellen in die Ratte implantiert. Ebenfalls wurde in einem Forschungsbericht der pO_2 der Plazenta in einem *in vivo* Mausmodell mittels ^{19}F -MR untersucht, da die Hypoxie der Plazenta als eine der Hauptursachen für Komplikationen während der fötalen Entwicklung aufgeführt wird (Boehm-Sturm et al., 2021). Trotz all der vielversprechenden Studien stellt der Mangel an geeigneten Scannern für ^{19}F -Messungen eine große Hürde hinsichtlich der klinischen Umsetzung der ^{19}F -Oxymetrie dar (Yu et al., 2013). Während der Sauerstoff bei der ^{19}F -MR mittels perfluorierten Kohlenwasserstoffverbindungen quantifiziert wird, werden beim BOLD-Kontrast (*Blood Oxygenation Level-Dependent*) die magnetischen Eigenschaften der Wasserstoffatome im menschlichen Körper genutzt. Der BOLD-Kontrast wird im Wesentlichen durch Unterschiede in der magnetischen Suszeptibilität von Oxyhämoglobin und Desoxyhämoglobin verursacht. Oxyhämoglobin ist diamagnetisch und hat keinen Einfluss auf das MR-Signal, während Desoxyhämoglobin, als paramagnetische Verbindung, Auswirkungen auf die Homogenität des Magnetfeldes

hat (T. Christen et al., 2013). Aufgrund der hohen zeitlichen und räumlichen Auflösung wurde die BOLD-MR Technik angewendet, um die Oxygenierung in Tumoren zu untersuchen (Dunn et al., 2002). Im Gegensatz zu den zuvor genannten Magnetresonanstechniken nutzt die Elektronenspinresonanz (EPR) paramagnetische Verbindungen zur Detektion, einschließlich Triplett-Molekülen und Radikalen (Tatum et al., 2006). Bei molekularem Sauerstoff handelt es sich um ein paramagnetisches Triplett Radikal mit zwei ungepaarten Elektronen. Allerdings gestaltet sich der direkte Nachweis von Sauerstoff in biologischen Systemen schwierig. Dies liegt darin begründet, dass die Spektrallinien verbreitert sind. Infolgedessen werden exogene paramagnetische Substanzen, welche löslich oder partikelförmig sind, für die Detektion von Sauerstoff herangezogen. Dies wird insofern ermöglicht, da durch Kollision von deren freien Radikalen mit Sauerstoff die Resonanzeigenschaften und somit das EPR-Spektrum verändert werden. Im Vergleich zu löslichen Materialien, wie Nitroxiden oder Triarylmethylradikalen (Roussakis et al., 2015), besitzen partikelförmige Materialien eine 1000 x höhere Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoff und ermöglichen somit eine genaue und sensitive Quantifizierung des pO_2 (Gallez et al., 2004). Die EPR-Oxymetrie wurde bereits für die Detektion des pO_2 während der Anästhesie genutzt (Hou et al., 2003) oder zur Messung der Tumoroxygenierung, um die Hypoxie in Tumoren untersuchen und dadurch den Erfolg der Strahlentherapie verbessern zu können (Elas et al., 2014). Langan et al. (2016) nutzten die EPR-Oxymetrie zur Analyse der Mikroumgebung in Sphäroiden. Durch den Einbau von Lithium Phthalocyanin (LiPc) in Sphäroide während deren Bildung war es nicht nur möglich, die Sauerstoffgradienten innerhalb des Sphäroids zu evaluieren, sondern auch die Zonen in der Mikroumgebung zusammen mit mathematischen Berechnungen zu identifizieren. Die intrazelluläre Sauerstoffverteilung innerhalb von Tumoren mittels *in vivo* EPR untersuchten ebenfalls Chen et al. (2019). Diese nutzten nanoformulierte Triarylmethylradikale, welche durch die Formulierung unter anderem eine verbesserte intrazelluläre Permeabilität aufweisen und somit eine verbesserte *in vivo* Anwendung ermöglichen.

Zu den oben genannten Verfahren bieten **optische Methoden** zur Sauerstoffmessung eine sinnvolle Ergänzung. Bei diesen gibt es nach Wolfbeis (2015) zwei wesentliche

Möglichkeiten: die Messung der Sauerstoffsättigung StO_2 im Blut sowie die Bestimmung der Sauerstoffkonzentration in Zellen und Geweben durch Lumineszenzlöschung (*Quenching*). Die Grundlage für das Verfahren zur Bestimmung der StO_2 , der sogenannten Pulsoxymetrie, bilden unterschiedliche Lichtabsorptionsspektren von Oxyhämoglobin und Desoxyhämoglobin. Durch das Verhältnis beider Messwerte können die Absorptionseigenschaften des arteriellen Blutes und somit auch die Sauerstoffsättigung bestimmt werden. Die Messung erfolgt mittels eines Photometers, welcher an den Finger oder an das Ohrläppchen angelegt wird. In diesem Photometer befinden sich eine Lichtquelle, welche rote und infrarote Lichtwellen aussendet, und ein Detektor, welcher die absorbierten Lichtanteile misst. Die resultierende Sauerstoffsättigung ist ein wichtiger Indikator für die arterielle Sauerstoffversorgung. Allerdings erlaubt die Methode, durch die Beeinflussung der Bindungseigenschaften von Sauerstoff an Hämoglobin (durch beispielsweise den pH-Wert oder Kohlenstoffdioxid), keine Rückschlüsse auf den zugrundeliegenden pO_2 (Bösch & Criée, 2013). Im Rahmen der Corona Pandemie hat das Pulsoxymeter jedoch enorm an Bedeutung gewonnen, da es eine Möglichkeit bietet, die Patienten auch außerhalb klinischer Einrichtungen zu überwachen. Neben der hohen Benutzerfreundlichkeit ermöglicht die Tragbarkeit des Gerätes eine ortsunabhängige Nutzung (Rosic et al., 2022). Der zweite Ansatz zur optischen Sauerstoffmessung basiert auf dem Prinzip der Lumineszenzlöschung von Luminophoren durch Triplett-Sauerstoff, welches im Detail in **Kapitel 3.2.1** erklärt wird. Im Vergleich zum Goldstandard der Clark-Elektrode besticht dieses Konzept im Wesentlichen durch seine Nicht-Invasivität, der guten Präzision und Genauigkeit (X. Wang & Wolfbeis, 2014), der denkbaren Mehrfachsensorik (gleichzeitige Messung von pH-Wert und Sauerstoff) sowie der Möglichkeit, Sauerstoff im Mikrometerbereich über große Flächen abzubilden (Wolfbeis, 2015). Bei den meisten kommerziell erhältlichen Festkörpersensoren sind Luminophore in eine Polymermatrix eingebettet. Die Wahl des Sensorfarbstoffes und des Polymers sind entscheidend für die Funktionsweise des Sensors. Die größte Gruppe der Sensorfarbstoffe bilden Metall-Liganden Komplexe. Diese zeichnen sich durch lang abklingende Emissionen aus, was die Wahrscheinlichkeit für eine effizientes Löschung erhöht (Wolfbeis, 2015). Des Weiteren sollten die jeweiligen Farbstoffe günstig sein und eine hohe Biokompatibilität

sowie Verfügbarkeit aufweisen (Papkovsky & Dmitriev, 2013). In frühen Anwendungen von Sauerstoffsensoren wurden einfache Komplexe aus Ruthenium(II) oder Iridium(II) verwendet, wie bei der intrazellulären Sauerstoffmessung bei Epithelzellen der menschlichen Lunge (Zhong et al., 2003). Ferner setzten Wilson et al. (1992) den Porphyrin-basierten Sensor PdTCPP (meso-tetra(4-carboxyphenyl)porphinylpalladium) im Gehirn von narkotisierten Tieren ein, um die Verteilung des pO_2 nach vorher induzierter Hypoxie zu untersuchen. Die geringe Löslichkeit und schlechte Biokompatibilität dieser anfänglichen Sensoren führte zu einer Reihe von Synthesen, mit dem Ziel, Dendrimere und makromolekulare Sensoren zu entwickeln (Roussakis et al., 2015). Nichols et al. (2014) nutzten das sauerstoffdetektierende Porphyrindendrimer G3-CAOS (*Click-Assembled Oxygen Sensing Probe*), welches dazu in der Lage ist mehrere Zellschichten in Sphäroiden und somit Hunderte von Mikrometern zu durchdringen. In Kombination mit Nahinfrarot-optimierter konfokaler Mikroskopie ermöglicht dies eine tiefenaufgelöste O_2 Bildgebung im Gewebe. Ein häufig verwendeter Sensorfarbstoff für die Messung von Sauerstoff ist PtTFPP (Pt(II)-tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin), der photostabil ist und eine ausgezeichnete Helligkeit sowie eine Lebensdauer von mehreren Mikrosekunden besitzt (Wolfbeis, 2015). Dmitriev et al. (2014) machten Gebrauch von PtTFPP für die hochauflösende 3D Bildgebung der Sauerstoffanreicherung in Sphäroiden, Neurosphären und Gehirngewebeschnitten mit der Phosphoreszenzlebensdauer-Imaging-Mikroskopie. Neben dem Sensorfarbstoff ist auch die Wahl der Materialien für die Polymermatrix, in welche der Farbstoff eingebettet ist, von Bedeutung. In den meisten Sensoren sind Silikonkautschuk oder Polystyrol verarbeitet, welche günstig und hydrophob sind. Außerdem besitzen sie eine gute Permeabilität für Sauerstoff (Wolfbeis, 2015). Allerdings werden vermehrt auch andere Polymere für Sauerstoffsensoren verwendet. Falcucci et al. (2022) berichteten von subkutanen Sauerstoffsensoren auf Basis von Seide. Mit dem Sensorfilm aus Seide und dem Sauerstoff-sensitiven Chromophor PdBMAP (Pd(II)tetramethacryliertes Benzoporphyrin) war die Echtzeit-Messung von Sauerstoff *in vivo* während verschiedener physiologischer Zustände möglich. Außerdem zeigte sich, dass sich der Sensor aufgrund seiner besseren Biokompatibilität und seiner guten mechanischen Fähigkeiten für die subkutane Implantation in Ratten eignete.

Allein aufgrund der großen Auswahl an Farbstoffen und Polymeren ergibt sich für die optische Sauerstoffmessung eine Vielzahl an Sensorformaten, wie planare Sensoren oder solche, die auf Nanomaterialien basieren. Auf die Anwendungsmöglichkeiten *in vitro* und *in vivo* wird im Folgenden genauer eingegangen.

Kellner et al. (2002) nutzten mit Sauerstoffsensoren imprägnierte Folien für eine kontinuierliche und nicht-invasive Verfolgung von Sauerstoffgradienten über den Querschnitt von kultiviertem Gewebe. Die Durchführung der zeitaufgelösten Sauerstoffbildgebung erfolgte dabei mit einem lumineszierenden optischen Sensor von Liebsch et al. (2000). In der ersten *in vivo* Anwendung von planaren Sensoren in Hamstern wurden die Oberflächenwerte für den Sauerstoffpartialdruck über tumorösem und normalem Gewebe gemessen (Babilas et al., 2005). Weiterhin fanden Sensorfolien Anwendung für die gleichzeitige 2D Bildgebung von pH-Wert und pO_2 mit gewöhnlichen RGB-Kameras in chronischen Wunden (Meier et al., 2011). Die Sensorfolie enthielt drei Farbstoffe, deren Emissionspeaks mit den Farbkanälen der Kamera übereinstimmten: PtTFPP für den Nachweis von Sauerstoff, Fluoresceinisothiocyanat (FITC) für den Nachweis des pH-Wertes und DPA (Diphenylantracen) als Referenzfarbstoff. Die Farbstoffe wurden mit der gleichen Wellenlänge angeregt und durch das ratiometrische Intensitätsverhältnis der Sensorfarbstoffe mit dem Referenzfarbstoff wurde das RGB-Bild aufgenommen und die räumliche Verteilung von pH und pO_2 quantifiziert. Durch die Kombination von Sauerstoff-sensitiven Sensorfolien mit dem VisiSens TD System der Firma PreSens Precision Sensing GmbH konnten Schmittlein (2017) und Pütz (2021) im Rahmen ihrer Dissertationen die Sauerstoffgradienten in Zellen und Sphäroiden mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung bestimmen. Dies erfolgte jeweils nach Adhäsion der Zellbeziehungsweise Gewebemodelle auf der Oberfläche der Sensorfolien, welche auf dem Boden von gewöhnlichen Zellkulturplatten angebracht waren. Der Querschnitt durch Zellen und Sphäroide ermöglichte daraufhin die Bestimmung der lateralen Gradienten des Sauerstoffpartialdruckes. Der Limitierung der Messung von der Sauerstoffkonzentration über den horizontalen Querschnitt der Zellkultur wirkten Peniche Silva et al. (2020) entgegen. Sie entwickelten eine 3D Rampe mit einer Sauerstoff-sensitiven Sensorfolie auf der Oberfläche und bauten diese in die mit A549

Zellen ausgesäten Wells ein. Somit war es auch möglich, die vertikalen 3D Sauerstoffgradienten im Medium zu messen, welche sich während der Kulturzeit in Folge der Zellatmung gebildet haben. Der Nachteil der bisher vorgestellten Anwendungen der planaren Sensorfolien ist deren statischer Charakter. Durch eine Kombination aus 24-Well Platten mit integrierten Sensorfolien (*Oxodish Plates OD24*, PreSens Precision Sensing GmbH) und einer Software zur Überwachung von Hypoxie konnten Bagshaw et al. (2019) den perizellulären pO_2 in Echtzeit überwachen. In der Software wurde ein individueller Schwellenwert, welcher auf Hypoxie hinweist, eingegeben, bei dessen Erreichen sich das Medium durchmischt. Somit war es möglich, die Gefahr der Hypoxie zu beseitigen und dem System einen dynamischen Charakter zu verleihen. Diese Dynamik spielt auch eine Rolle bei der Integration von Sauerstoff-Sensorfolien in die Mikrofluidik (Schmittlein et al., 2019). Durch die direkte Messung von Sauerstoff und der Balance von Sauerstoffzufuhr und -verbrauch kann toxischen Mikroumgebungen, welche durch Sauerstoff verursacht werden, und damit auch den negativen Auswirkungen auf Zellvitalität und Proliferation entgegengewirkt werden. Ein mikrofluidisches Sensorsystem wurde auch genutzt, um die Auswirkungen der Hypoxie auf Hepatozyten zu untersuchen (Kang et al., 2020). Hier wurden kranke und gesunde primäre Rattenhepatozyten einem Sauerstoffgradienten von 0,3 – 6,9 % (circa 2 – 52 mmHg) ausgesetzt. Durch die sinkende Sauerstoffzufuhr, welche mittels 2D Sensorfolien detektiert wurde, bildeten sich Hypoxie Gradienten. Dies führte zu einer Verringerung der Lebensfähigkeit derjenigen Zellen, die mit Sauerstoff unterversorgt waren, um etwa 80 % innerhalb von zwei Stunden. Außerdem konnte die zunehmende Expression des Hypoxie-induzierbaren Faktors 1α beobachtet werden. Die Mikrofluidik-Technologie bildet auch die Grundlage für *organ-on-chip*. Diese simulieren Organe unter Zellkulturbedingungen und nutzen Mikrokanäle und Mikrokammern für die Nachahmung der menschlichen Physiologie. Durch diese fortschrittliche Kultivierungsmöglichkeit in Kombination mit integrierten Sensoren konnten Azizgolshani et al. (2021) nicht nur optisch den Sauerstoffverbrauch von Nierenepithelzellen quantifizieren, sondern auch die Barrierefunktion von primärem Dickdarmgewebe mittels elektrischer Sensoren.

Neben all den eben aufgeführten Forschungsfortschritten von planaren Sensoren zur optischen Sauerstoffmessung gewinnen auch die Sensorformate auf Basis von Nanopartikeln zunehmend an Bedeutung. Diese erlauben eine intrazelluläre Sauerstoffmessung. Auch bei diesem Format ist ein Sauerstoff-sensitiver Sensorfarbstoff in ein Polymer, meist in Form von Nanopartikeln, eingebettet (Wolfbeis, 2015). Zheng et al. (2015) konnten damit nicht nur den Sauerstoff in hypoxischem Tumorgewebe messen. Es war auch möglich, geringe Mengen von Krebszellen vor der Entstehung des Tumors anhand ihrer erhöhten Sauerstoffverbrauchsrate während der Proliferation nachzuweisen. Die gleichzeitige Quantifizierung von Sauerstoff und Glukose war Deng et al. (2019) mittels dreifarbig-ratiometrischer Lumineszenz-Nanosensoren möglich. Dabei wurden HeLa Zellen mit den Nanosensoren inkubiert und die Emission nach Zusatz von Glukose (Anstieg der blauen Emission) und nach Reduktion von Sauerstoff (Anstieg der roten Emission) gemessen. Durch die gute Zellpermeabilität und die geringe Zytotoxizität bilden die Nanosensoren die Grundlage für die Entwicklung weiterer Mehrfachsensoren (Wolfbeis, 2015).

Eine weitere bedeutende Anwendung optischer Sensoren zur Messung von Sauerstoff ist die Agilent Seahorse Technologie (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Dieses opto-mechanische System erlaubt die gleichzeitige Messung der Sauerstoffverbrauchsrate (*Oxygen Consumption Rate* OCR) und der extrazellulären Azidifizierungsrate (*Extracellular Acidification Rate* ECAR). Beim sogenannten XF Analyzer von Agilent sind Festkörpersensoren, welche Sauerstoff- und pH-sensitive Fluorophore enthalten, auf einer Art beweglichen Stempel (*cartridge*) angebracht. Während eines Messzyklus wird dieser bis zu 200 μm über den mit Zellen bedeckten Boden spezieller Mikrotiterplatten abgesenkt – dadurch bilden sich Mikrokammern mit circa 2 μL Volumen. Nach Anregung der Fluorophore (λ_{ex} (Sauerstoff) = 532 nm; λ_{ex} (pH) = 470 nm) werden die Änderungen in deren Emissionsintensität gemessen (λ_{em} (Sauerstoff) = 650 nm; λ_{em} (pH) = 530 nm). Dadurch, dass das Verhältnis von Zell- zu Probenvolumen groß ist, ist es möglich, OCR und ECAR schnell und sensitiv zu quantifizieren. Somit bietet diese Technologie eine einzigartige Möglichkeit, die beiden wichtigsten Energieproduktionswege, den der oxidativen Phosphorylierung und

die Glykolyse, zu bewerten (Papkovsky & Dmitriev, 2013; Plitzko & Loesgen, 2018). Die Technik wurde im Laufe der Jahre in zahlreichen Assays verwendet. Wu et al. (2007) haben damit die zellulären Stoffwechselraten der humanen Krebszelllinien H460 und A549 bei Exposition mit verschiedenen pharmakologischen Modulatoren gemessen. Campioni et al. (2022) nutzten das System zur Untersuchung der metabolischen Aktivität von 3D Zellkulturen, wie Sphäroiden, in hoher zeitlicher Auflösung. Zusammen mit dem Seahorse XF Cell Mito Stress Test konnten Rückschlüsse darauf gezogen werden, dass metabolische Unterschiede vor allem von der Zelllinie und weniger von der Sphäroidgröße abhängen. Bei diesem Test wurden sequenziell Entkoppler der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung (Oligomycin, Trifluoromethoxy Carbonylcyanid Phenylhydrazon (FCCP) und Rotenon/Antimycin A) zugegeben, um die Schlüsselparameter der mitochondrialen Funktion zu ermitteln. Einen Mangel der Seahorse Technologie stellt allerdings die Tatsache dar, dass das System aufgrund der Verwendung von Sauerstoff-permeablen Mikrotiterplatten, nicht luftdicht ist, und somit die Diffusion von Sauerstoff ermöglicht. Dies hat wiederum Einfluss auf die Messergebnisse, da der initiale Sauerstoffgehalt somit nicht auf das Volumen des Mediums beschränkt ist (Gao & Ogilby, 1995; Poulsen et al., 2003; Rickard et al., 2020). Außerdem liefert das System keine orts aufgelösten Daten (Rickard et al., 2020).

Aus den bisherigen Ausführungen wird ersichtlich, dass im Laufe der letzten Jahrzehnte viele Methoden für die Sauerstoffmessung entwickelt wurden, welche alle ihre Vor- und Nachteile haben (siehe **Tabelle 1**). Der Goldstandard der polarographischen Elektroden stellt eine etablierte Methode dar, welche eine direkte Messung des pO_2 ermöglicht. Aufgrund des invasiven Charakters eignen sie sich aber nur begrenzt für die Analyse von Zellen und Geweben. Ansätze, wie PET oder EPR, sind aufgrund der kostenintensiven Geräte und der teilweise aufwändigen Durchführung auf klinische Anwendungen begrenzt. Biologische O_2 -Sensortechniken auf Basis der Lumineszenz-Löschung haben neue Möglichkeiten in diesem Bereich eröffnet und das System durch eine Vielzahl von Sensormethoden, welche auf die jeweilige Anwendung individualisiert werden können, revolutioniert. Nichtsdestotrotz

besitzen sie noch großes Potential für weitere Entwicklungen und Optimierungen bezüglich der Überwachung des Sauerstoffgehalts und des Sauerstoffverbrauchs.

Tabelle 1: Zusammenfassung der Vor- und Nachteile verschiedener Methoden für die Sauerstoffmessung (Bauser & Lehmann, 2012; Dewhirst et al., 2000; Nestle et al., 2009; Papkovsky & Dmitriev, 2013; Quaranta et al., 2012; Roussakis et al., 2015; Tatum et al., 2006; X. Wang & Wolfbeis, 2014; Wolfbeis, 2015; Yu et al., 2013)

Methode	Merkmale	Einschränkungen
Polarographische Elektroden	etablierte Methode; direkte Messung des Sauerstoffpartialdrucks pO_2	invasiv; ortsabhängige Punktmessung; Verbrauch von O_2
Radioisotopentechniken (PET)	3D Ganzkörperbildgebung; nicht-invasiv	kurzlebige Marker; Radioaktivität; geringe räumliche Auflösung; teure Instrumente
Magnetische Resonanztechniken (BOLD-MR, EPR)	stabile Marker; nicht-invasiv; gut aufgelöste Daten in wenigen Sekunden; keine Radioaktivität	Mangel an geeigneten Scannern; teure Instrumente; nicht immer quantitativ
Optische Methoden	kein O_2 Verbrauch; nicht-invasiv; Mehrfachsensorik möglich; hohe räumliche Auflösung	Bildung von toxischem 1O_2 ; keine Ganzkörperbildgebung möglich; <i>Photobleaching</i>

2 Zielsetzung

Das Vorhandensein von Sauerstoff in Zellen und Geweben ist ein essenzieller Marker zur Beurteilung der Stoffwechselaktivität, des physiologischen Verhaltens und der Lebensfähigkeit. Zudem resultieren zahlreiche pathologische Zustände aus einer Minderversorgung von Zellen und Geweben mit Sauerstoff (Papkovsky & Dmitriev, 2013; Wilson, 2008). Infolgedessen ist es von enormer Bedeutung, den Sauerstoffgehalt in zellulären Systemen zu untersuchen. Experimentell ist dies optisch über planare Sauerstoff-sensitive Sensorfolien realisierbar. Ein ratiometrisches Sensorsystem auf Basis der Lumineszenz-Löschung schafft die Voraussetzung, die Sauerstoffgradienten über den Querschnitt eines Gewebes kontinuierlich und nicht-invasiv zu verfolgen. Die Ergänzung der experimentell gewonnenen Erkenntnisse mit Computersimulationen ermöglicht ein verbessertes Verständnis für die Prozesse in diesen komplexen zellulären Systemen. Darüber hinaus können Vorhersagen und Extrapolationen erstellt werden, welche *in vitro* nicht möglich wären (Materi & Wishart, 2007).

Das Ziel dieser Arbeit ist es, kontinuierliche *in silico* Modelle mit der kommerziellen Simulationssoftware COMSOL Multiphysics® zu entwickeln, um die Sauerstoffverteilung in Zellen und Geweben zu analysieren sowie deren Atmungsaktivität zu quantifizieren.

Das erste Teilprojekt dieser Arbeit befasst sich mit der Untersuchung adhärenter Zellen im *Monolayer*. Ausgehend von empirischen Daten aus ratiometrischen Sauerstoffmessungen, bei welchen die Sensorfolien als Kultursubstrat für die Zellen dienen, soll das grundlegende *in silico* Modell validiert werden. Darauf aufbauend sollen die lateralen pO_2 Gradienten in Abhängigkeit von verschiedenen Einflussfaktoren (Zelldichte, Zelltyp, Geometrie des Kulturgefäßes, Medienvolumen, Sauerstoffverbrauchsrate) untersucht werden. Ebenso sollen Zellkultursysteme analysiert werden, bei welchen nicht die Sensorfolie als Kultursubstrat dient, sondern permeable Membranen. Diese ermöglichen eine Zellkultur, die den physiologischen Bedingungen näherkommt.

Da adhärenz Zellen im *Monolayer* eine limitierte Ähnlichkeit zum *in vivo* Szenario aufweisen, werden häufig 3D Gewebemodelle verwendet. Diese besitzen verbesserte physiologische Eigenschaften und bilden die Brücke zwischen *in vitro* 2D Zellschichten und Tierversuchen (Campioni et al., 2022; Joseph et al., 2018). Multizelluläre Sphäroide sind hierbei besonders beliebt – sie bilden den Forschungsgegenstand vieler *in vitro* und *in silico* Analysen zur Untersuchung der Wachstumskinetik avaskulärer Tumore, für präklinische Wirkstoffscreenings sowie zur Untersuchung pharmakologischer Prozesse und des Stoffwechsels (Grimes et al., 2016; Grimes, Kelly et al., 2014; Mehta et al., 2012). Im zweiten Teilprojekt dieser Arbeit stehen metabolisch aktive Zellaggregate im Fokus. Analog zum ersten Teilprojekt soll zunächst ein *in silico* Modell sowohl mit empirischen Daten aus Sauerstoffmessungen als auch aus morphometrischen Studien validiert werden. Mittels mehrerer FEM-Analysen soll die Sauerstoffverteilung im Gewebe analog zum experimentellen Vorgehen von der Bildung der Aggregate, über deren Wachstum bis hin zur morphologischen Veränderung, welche im Zuge der *in vitro* Kultur stattfindet, erforscht werden. Zusätzlich sollen die chemische Modulation der oxidativen Phosphorylierung und die Einflüsse permeabler Kultursubstrate auf die Sauerstoffgradienten und den Sauerstoffverbrauch analysiert werden.

Projektübergreifend soll die Zellproliferation in 2D (impedimetrisch und kolorimetrisch) und 3D (mikroskopisch) charakterisiert werden, um Rückschlüsse auf eine phänotypische Veränderung der Zellen ziehen zu können und damit wertvolle Informationen für die Interpretation der lateralen Sauerstoffgradienten in multizellulären Zellaggregaten zu erhalten. Unter Verwendung der Mamma-Karzinom-Zelllinie MCF-7 als Zellmodell soll das Wachstum von 3D Sphäroiden quantifiziert werden und dem Proliferationsverhalten adhärenz Zellen im *Monolayer* gegenübergestellt werden.

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Impedanzspektroskopie

Im folgenden Kapitel werden zunächst die allgemeinen Grundlagen der Impedanzspektroskopie beschrieben (**Kapitel 3.1.1**). Anschließend wird näher auf das nicht-invasive Verfahren des *Electric Cell-Substrate Impedance Sensing* (ECIS) eingegangen. Diese Methode eignet sich dazu, das Verhalten adhärenter Zellen auf planaren Goldelektroden zu überwachen und zu quantifizieren. Folglich wurde das Verfahren in der vorliegenden Arbeit gewählt, um die Proliferation in Echtzeit zu beobachten.

3.1.1 Grundlagen der Impedanzspektroskopie

Bei der Impedanzspektroskopie handelt es sich um eine Technik, welche die nicht-invasive Untersuchung der elektrischen Eigenschaften von Materialien sowie deren Charakterisierung ermöglicht. Eine Anwendung stellt dabei die elektrische Analyse von Gewebe und Organen dar (Grimnes & Martinsen, 2000; Wegener & Seebach, 2014).

Das Grundprinzip der Impedanzspektroskopie wird dadurch beschrieben, dass dem zu untersuchenden System eine sinusförmige Wechselspannung angelegt wird (Ende & Mangold, 1993; Lukic & Wegener, 2015; Wegener & Seebach, 2014).

$$U(t) = U_0 \cdot \sin(\omega t) \quad (3)$$

mit $U(t)$: Spannung zum Zeitpunkt t , U_0 : Amplitude der Spannung und ω : Winkelfrequenz mit $\omega = 2\pi$.

Dies ermöglicht die gleichzeitige Bestimmung des induzierten Stroms, der durch folgende Beziehung festgelegt wird:

$$I(t) = I_0 \cdot \sin(\omega t - \varphi) \quad (4)$$

mit $I(t)$: Stromstärke zum Zeitpunkt t , I_0 : Amplitude der Stromstärke, ω : Winkelfrequenz mit $\omega = 2\pi$ und φ : Phasenverschiebung.

Die im Ohm'schen Gesetz definierte Beziehung zwischen Spannung und Stromstärke wird, im Falle von Wechselstrom, mit der komplexen Größe der Impedanz Z beschrieben:

$$Z = \frac{U(t)}{I(t)} = \frac{U_0 \cdot \sin(\omega t)}{I_0 \cdot \sin(\omega t - \varphi)} \quad (5)$$

Bei einem idealen Ohm'schen Widerstand nimmt die Phasenverschiebung φ in **Gleichung (5)** den Wert 0 an. Für kapazitive oder induktive Elemente hingegen ergibt sich eine Phasenverschiebung von $-\frac{\pi}{2}$ beziehungsweise $+\frac{\pi}{2}$. **Abbildung 7 A** zeigt die schematische Beziehung der Phasenverschiebung φ zwischen der Wechselspannung und dem Wechselstrom.

Durch die Eulersche Formel kann die, durch trigonometrische Funktionen definierte, komplexe Impedanz in Polarkoordinaten umgewandelt werden:

$$Z = \frac{U(t)}{I(t)} = \frac{U_0 \cdot e^{i\omega t}}{I_0 \cdot e^{i(\omega t - \varphi)}} = \frac{U_0}{I_0} \cdot e^{i\varphi} = |Z| \cdot e^{i\varphi} \quad (6)$$

mit $i = \sqrt{-1}$ und $e^{i\varphi} = \cos\varphi + i\sin\varphi$.

Eine weitere Transformation von Polarkoordinaten in kartesische Koordinaten ermöglicht eine Trennung der komplexen Größe in die Werte der realen und imaginären Impedanzkomponenten:

$$Z = R + iX \quad (7)$$

mit dem Realteil $R = \operatorname{Re}(Z) = |Z| \cdot \cos\varphi$ und dem Imaginärteil $X = \operatorname{Im}(Z) = |Z| \cdot \sin\varphi$. Außerdem gilt: $|Z| = \sqrt{\operatorname{Re}^2(Z) + \operatorname{Im}^2(Z)}$ und $\varphi = \arctan \frac{\operatorname{Im}(Z)}{\operatorname{Re}(Z)}$.

Der Realteil $\operatorname{Re}(Z)$ bezeichnet dabei den Widerstand R , bei welchem Stromstärke und Spannung in Phase sind. Der Impedanzbeitrag des Stroms, der mit der Spannung um 90° phasenverschoben ist, wird hingegen durch den Imaginärteil X (Reaktanz)

beschrieben. Die Reaktanz kann kapazitiv oder induktiv sein und wird im entsprechenden Schaltbild als Kondensator C oder Spule L dargestellt.

Graphisch wird die komplexe Impedanz entsprechend **Gleichung (7)** als Vektor in der Gauß'schen Zahlenebene dargestellt (siehe **Abbildung 7 B**).

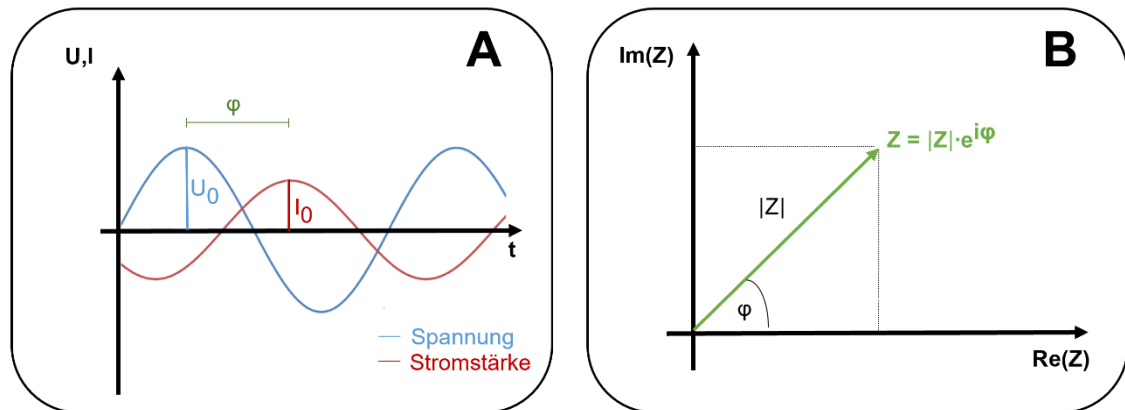


Abbildung 7: (A) Schema der Phasenverschiebung φ zwischen der sinusförmigen Spannung mit der Amplitude U_0 (—) und der sinusförmigen Stromstärke mit der Amplitude I_0 (—) in Abhängigkeit von der Zeit (modifiziert nach Wegener & Seebach, 2014). (B) Graphische Darstellung der komplexen Impedanz als Vektor in der Gauß'schen Zahlenebene mit dem Realteil $\text{Re}(Z)$ als x-Achse und dem Imaginärteil $\text{Im}(Z)$ als y-Achse. Die Länge des Vektors Z steht für den Impedanzbetrag $|Z|$, während die Phasenverschiebung φ zwischen Spannung und Stromstärke den Winkel zwischen der x-Achse und dem Vektor darstellt (modifiziert nach Lvovich, 2012).

Neben der Darstellung der Impedanzdaten in einem Nyquist-Diagramm (**Abbildung 7 B**) gibt es noch die in einem Bode-Plot. Dieser hat gegenüber Ersterem den Vorteil, dass auch Informationen über den Frequenzbereich enthalten sind. In einem Bode-Diagramm werden der Impedanzbetrag $|Z|$ und die Phasenverschiebung φ als Funktion der Frequenz auf einer logarithmischen oder halblogarithmischen Skala aufgetragen. Ein solches Bode-Diagramm für den Fall einer Elektrode, die in direktem Kontakt mit dem Elektrolyten steht, ist in **Abbildung 8 A** gezeigt (Wegener & Seebach, 2014).

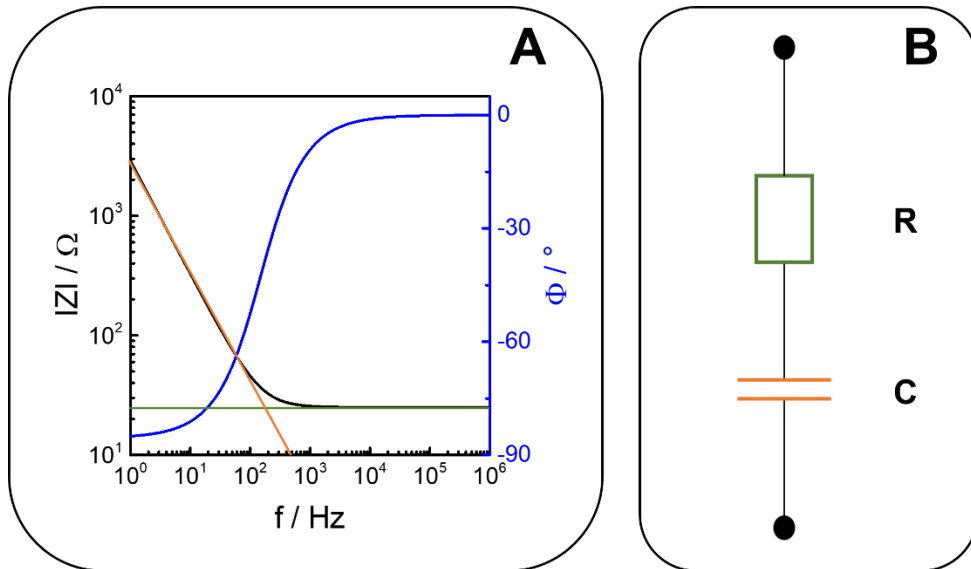


Abbildung 8: (A) Simulierter Bode-Plot und (B) seriell Ersatzschaltbild für eine Elektrode, die in direktem Kontakt mit einem Elektrolyten steht. Im Falle einer Serienschaltung kann die frequenzabhängige Impedanz $|Z|$ als Summe der Impedanzen des Elektrolytwiderstands R und des Kondensators C dargestellt werden. Die horizontale Linie (—) und die Linie (—) mit Steigung (-1) zeigen das Impedanzspektrum des reinen Widerstands und des Kondensators in doppellogarithmischer Darstellung. Die genauen Werte für R und C bestimmen die Lage der beiden Linien (modifiziert nach Wegener & Seebach, 2014).

Die Analyse der experimentellen Impedanzspektren erfolgt meist mit Hilfe von elektrischen Ersatzschaltbildern. Diese wiederum sind durch serielle oder parallele Verknüpfungen elektrischer Bauteile, wie Kondensatoren, Widerständen oder nicht-idealen Elementen (*constant phase element* CPE) charakterisiert. Das Impedanzspektrum in **Abbildung 8 A** kann mittels einer Serienschaltung aus einem Widerstand R und einem Kondensator C analysiert werden (**Abbildung 8 B**). Das Impedanzspektrum des reinen Widerstand R wird dabei durch eine horizontale Linie (—) dargestellt, während das des Kondensators eine Linie (—) mit einer Steigung von (-1) zeigt. Bei hohen Frequenzen wird die Impedanz vom frequenzunabhängigen Ohm'schen Widerstand des Elektrolyten dominiert. Bei kleinen Frequenzen ist der kapazitive Charakter ausgeprägter, was zu einem frequenzabhängigen Anstieg der Impedanz führt. Außerdem induzieren die kapazitiven Eigenschaften des Systems eine Phasenverschiebung $|\phi| < 90^\circ$ zwischen Spannung und Strom.

3.1.2 *Electric Cell-Substrate Impedance Sensing* (ECIS)

Das Prinzip der Impedanzspektroskopie bildet die Grundlage für eine Technik, die von Giaever & Keese in den 1980er Jahren (Giaever & Keese, 1984, 1991) entwickelt wurde und unter dem Namen *Electric Cell-Substrate Impedance Sensing* (ECIS) bekannt ist. Diese labelfreie und nicht-invasive Methode eignet sich dazu, das Verhalten adhärenter Zellen auf planaren Goldelektroden zu überwachen und zu quantifizieren. Hierfür werden Spannungen und Ströme im Bereich von wenigen Millivolt beziehungsweise Mikroampère verwendet und sind folglich nicht schädlich für die Zellen. Die Veränderung der Impedanz lässt Rückschlüsse auf die Reaktion der Zellen bei verschiedenen Stimuli chemischer, biologischer oder physikalischer Art zu. Der automatisierte Ablauf ermöglicht zudem eine kontinuierliche Beobachtung der Zellen über längere Zeiträume und mit einer hohen zeitlichen Auflösung (Lukic & Wegener, 2015). Die vielen Vorteile und der damit einhergehende Informationsgehalt schaffen die Voraussetzung für ein breites Anwendungsspektrum, wie zum Beispiel zur Analyse der Proliferation, Migration oder Invasion von Krebszellen (Hong et al., 2011).

Das Grundprinzip des Verfahrens ist schematisch in **Abbildung 9** gezeigt und beruht darauf, dass die zu untersuchenden Zellen unter gewöhnlichen Zellkulturbedingungen auf zwei planaren Goldfilmelektroden unterschiedlicher Größe kultiviert werden. Die Arbeitselektrode besitzt einen Durchmesser von 250 µm und ist 500 – 1000 x kleiner als die Gegenelektrode. Beide Elektroden sind in koplanarer Anordnung auf dem Boden eines herkömmlichen Zellkulturgefäßes aufgebracht und sind über einen physiologischen Puffer oder das Zellkulturmedium elektrisch miteinander verbunden. Durch Anlegen eines Stroms kleiner Stromstärken wird der frequenzabhängige Wechselstromwiderstand (Impedanz) zwischen den Elektroden gemessen. Aufgrund der Tatsache, dass die Impedanz umgekehrt proportional zur Elektrodenfläche ist, spiegelt die Gesamtimpedanz des Systems dabei vor allem das Verhalten der Zellen auf der kleineren Arbeitselektrode wider. Sobald die Zellen auf den Goldfilmelektroden kultiviert werden, führen die dielektrischen Eigenschaften der Plasmamembran zu einem signifikanten Anstieg der Impedanz über einen breiten Frequenzbereich. Frequenzen, die kleiner als 1 kHz sind, eignen sich vor allem zur Untersuchung von

Veränderungen der Zellform, da hier der Wechselstrom gezwungen ist, über den extrazellulären Weg um die Zellen herum oder unter den Zellen zu fließen. Bei höheren Frequenzen (größer als 10 kHz) fließt der Strom kapazitiv über den transzellulären Weg durch die Zellmembranen (Lukic & Wegener, 2015). Die Tatsache, dass die Impedanz sensitiv auf jegliche Änderung der Elektrodenbedeckung reagiert, begründet umso mehr die Anwendbarkeit der Methode in vielen verschiedenen Assayformen, wie der Untersuchung der Zelladhäsion (Wegener et al., 2000), der Wundheilung (Keese et al., 2004) oder der Zellproliferation (Anwer & Szaszi, 2020).

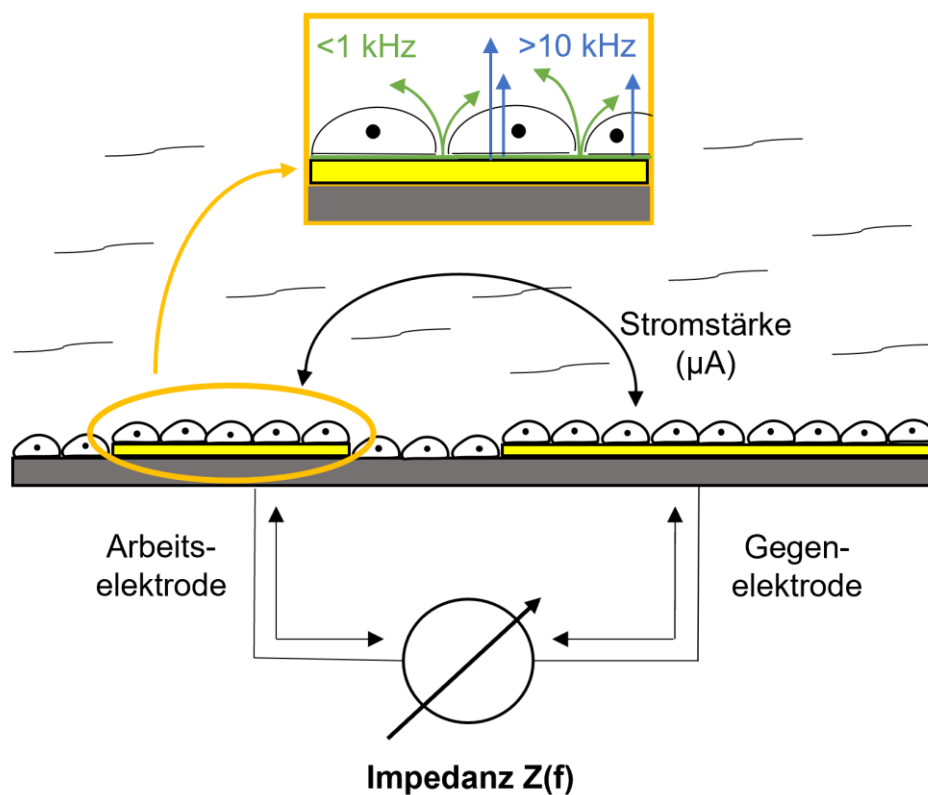


Abbildung 9: Schematische Darstellung des grundlegenden Prinzips der ECIS-Technik. Die koplanar angeordneten Goldfilmelektroden, auf welchen die Zellen kultiviert sind, sind über einen physiologischen Puffer oder Zellkulturmedium elektrisch miteinander verbunden. Nach Anlegen eines kleinen Stroms mit wenigen Mikroampère wird der Wechselstromwiderstand (Impedanz) zwischen der Arbeitselektrode und der 500 – 1000 x größeren Gegenelektrode gemessen. Je nach Frequenzbereich fließt der Wechselstrom entweder parazellulär (grüne Pfeile) oder transzellulär (blaue Pfeile). Somit eignen sich Frequenzen, die kleiner als 1 kHz sind, um Veränderungen in der Zellmorphologie zu untersuchen, da der Strom hier zwischen und unter den Zellen fließt. Bei Frequenzen über 10 kHz fließt der Strom durch Zellen hindurch und somit eignet sich dieser Bereich zur Analyse der Elektrodenbedeckung (modifiziert nach Lukic & Wegener, 2015; Prendecka et al., 2018).

3.2 Optische Sauerstoffmessung durch Lumineszenz-Löschung

In **Kapitel 1.3** wurden zahlreiche Methoden der Sauerstoffmessung sowie deren Vor- und Nachteile dargestellt. Im Folgenden wird genauer auf das Prinzip der optischen Sauerstoffmessung durch Lumineszenz-Löschung (**Kapitel 3.2.1**), insbesondere das ratiometrische Ausleseverfahren (**Kapitel 3.2.2**), eingegangen.

3.2.1 Prinzip der optischen Sauerstoffmessung

Optische Sauerstoffmessungen haben im Laufe der letzten Jahre an Attraktivität gewonnen. Dies liegt vor allem darin begründet, dass die Sensoren keinen Sauerstoff während der Messung verbrauchen. Außerdem handelt es sich um eine nicht-invasive Messmethode mit guter Präzision und hoher Genauigkeit (X. Wang & Wolfbeis, 2014). Vanderkooi et al. beschrieben 1987 eine der ersten optischen Methoden für die Messung der Sauerstoffkonzentration durch Lumineszenz-Löschung. Das Prinzip beruht auf der Energieübertragung zwischen einem Luminophor im angeregten Zustand und molekularem Sauerstoff. Dabei wird die Emission des Luminophors gelöscht (*gequencht*). **Abbildung 10** zeigt das zugehörige Jablonski Diagramm, welches die photophysikalischen Prozesse zwischen Anregung und Emission beschreibt. Der Luminophor wird durch Absorption von Licht einer bestimmten Wellenlänge vom Grundzustand S_0 in die höher angeregten Zustände S_1 oder S_2 , welche energetisch ungünstig und nicht stabil sind, angeregt. Infolgedessen findet eine sofortige und schnelle Relaxation von S_2 zu S_1 durch *Internal Conversion* statt. Die Rückkehr in den Grundzustand erfolgt anschließend nicht direkt, wie bei der strahlungslosen Löschung oder der Fluoreszenz, sondern der Luminophor geht nach einem *Intersystem Crossing* in den angeregten Triplettzustand T_1 über. Im Falle einer Rückkehr des Luminophors in den Grundzustand wäre Phosphoreszenz zu beobachten. Dieses Phänomen ist allerdings sehr unwahrscheinlich, da dieser Übergang zum einen sehr langsam ist und zum anderen wegen einer Änderung des Spins quantenmechanisch verboten ist. Wahrscheinlicher ist ein Energietransfer durch Kollision mit Triplett-Sauerstoff Molekülen 3O_2 , welche im Zellmedium gelöst sind. Dabei gibt der Luminophor die Anregungsenergie ab und kehrt strahlungslos in den elektronischen Grundzustand zurück. Der paramagnetische Sauerstoff nimmt die

Energie auf und geht vom Grundzustand $^3\Sigma_g^-$ in die angeregten Zustände $^1\Delta_g$ oder $^1\Sigma_g^+$. Der entstehende toxische Singulett-Sauerstoff 1O_2 (Klotz et al., 2003) besitzt eine kurze Lebensdauer und kehrt durch Wechselwirkung mit Lösungsmittelmolekülen oder durch Oxidationsprozesse mit benachbarten Molekülen wieder in den Triplettzustand 3O_2 zurück (Papkovsky & Dmitriev, 2013; Quaranta et al., 2012).

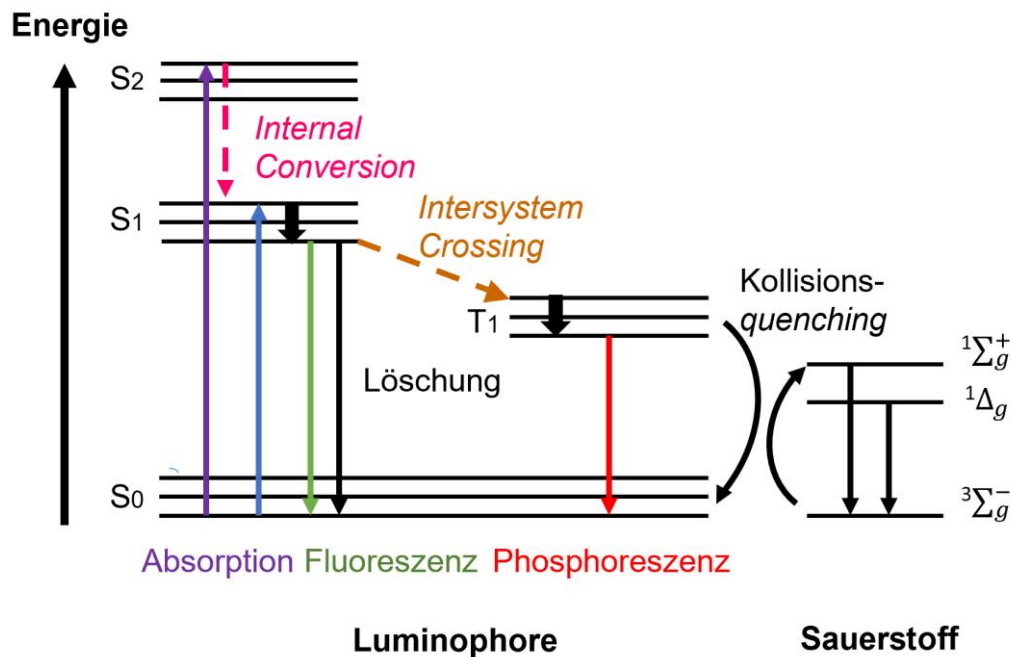


Abbildung 10: Das Jablonski Diagramm zeigt die Vorgänge zwischen Absorption und Emission von Licht durch einen Luminophor (modifiziert nach Quaranta et al., 2012). Nach Anregung mit einem Laser einer bestimmten Wellenlänge erreicht der Luminophor einen elektronisch angeregten Zustand S₁, welcher energetisch ungünstig und nicht stabil ist. Der Übergang zurück in den Grundzustand S₀ geschieht entweder über eine Fluoreszenz Emission oder über Intersystem Crossing in den Triplettzustand T₁. Nach einer Schwingungsrelaxation innerhalb des Triplettzustands T₁ kann der Übergang in den Grundzustand durch die Emission von Phosphoreszenz erfolgen. Die zweite Möglichkeit ist über ein Kollisions*quenching* mit molekularem Sauerstoff. Dabei geht der Sauerstoff in den ersten oder zweiten angeregten Zustand, während der Luminophor strahlungslos in den Grundzustand zurückkehrt.

Das Kollisions*quenching* durch molekularen Sauerstoff führt zu einer Abnahme der Phosphoreszenzintensität I sowie der Lebensdauer τ in einer konzentrationsabhängigen Art und Weise. Der Prozess der Löschung kann durch die Stern-Volmer Gleichung beschrieben werden (Quaranta et al., 2012):

$$\frac{I_0}{I} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_{SV}pO_2 = 1 + k_q\tau_0pO_2$$

(8)

mit I_0 , τ_0 als ungelöschte Intensität und Lebensdauer bei 0 % O_2 ; I , τ als Lumineszenzintensität und Lebensdauer bei 100 % O_2 ; K_{SV} als Stern-Volmer Konstante; k_q als Löschungskonstante, die auf die Diffusionsgeschwindigkeit des Sauerstoffs und des Luminophors bezogen ist (Roussakis et al., 2015) und dem Sauerstoffpartialdruck pO_2 .

Die wichtigsten Detektionsmethoden der Sauerstoffmessung durch Lumineszenz-Löschung sind die Intensitätsmessungen bei einer Wellenlänge, die ratiometrische Messung der Intensität mit einem Referenzfarbstoff oder Messungen, welche auf der Lebensdauer basieren (Dmitriev & Papkovsky, 2012). Die direkteste Methode stellt dabei die Änderung der Intensität bei einer einzigen Wellenlänge dar. Allerdings wird diese auch durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst, wie der Konzentration des Luminophors, Streueffekten oder *Photobleaching* (Quaranta et al., 2012). Im Gegensatz dazu ist die ratiometrische Messung weniger fehleranfällig. Bei der ratiometrischen Methode sind für gewöhnlich zwei Farbstoffe, deren Emissionsspektren nicht überlappen, in ein Matrixmaterial eingebettet. Ein Farbstoff ist Sauerstoff-sensitiv, während der Referenzfarbstoff nicht durch Sauerstoff gelöscht werden kann und dessen Emission unabhängig von der Sauerstoffkonzentration ist. Somit sinkt durch das Kollisions*quenching* mit molekularem Sauerstoff lediglich die Emissionsintensität des Sensorfarbstoffes, während die des Referenzfarbstoffes unverändert bleibt. Aus dem Lumineszenzverhältnis der beiden Farbstoffe kann mittels einer linearen Zwei-Punkt-Kalibration die Konzentration an Sauerstoff in der Umgebung von adhären Zellen oder Sphäroiden bestimmt werden. Dies geschieht im besten Fall bei unterschiedlichen Wellenlängen (X. Wang & Wolfbeis, 2014) durch Verwendung von Bandpassfiltern oder durch digitale Farbkameras mit getrennten RGB Kanälen (Quaranta et al., 2012).

3.2.2 Messaufbau zur ratiometrischen *in vitro* Sauerstoffmessung

Die experimentellen Messungen zur Bestimmung der Sauerstoffkonzentration in adhären Zellen und adhären Sphäroiden, welche dieser Arbeit zugrunde liegen, wurden von Tobias Naber mit dem System VisiSens TD (PreSens Precision Sensing GmbH, Regensburg, Deutschland) in zwei verschiedenen Modifikationen mit unterschiedlicher räumlicher Auflösung durchgeführt. Das VisiSens TD basiert auf der ratiometrischen Methode aus **Kapitel 3.2.1**. Es detektiert die Lumineszenzintensität von zwei Farbstoffen, die immobilisiert in Polymermatrizen optischer Sensorfolien (SF-RPSu4, PreSens Precision Sensing GmbH, Regensburg, Deutschland) eingearbeitet sind. Aufgrund der höheren Sensitivität empfehlen sich biokompatible Polymere, welche eine hohe Permeabilität und Diffusion für Sauerstoff besitzen (Papkovsky & Dmitriev, 2013). Die genaue Zusammensetzung der Sensorfolie ist ein Betriebsgeheimnis und ist nicht bekannt. Die Sauerstoff-sensitiven Sensorfolien besitzen eine Dicke von 150 – 190 μm und bestehen aus drei Schichten, deren Querschnitt in **Abbildung 11** gezeigt ist.

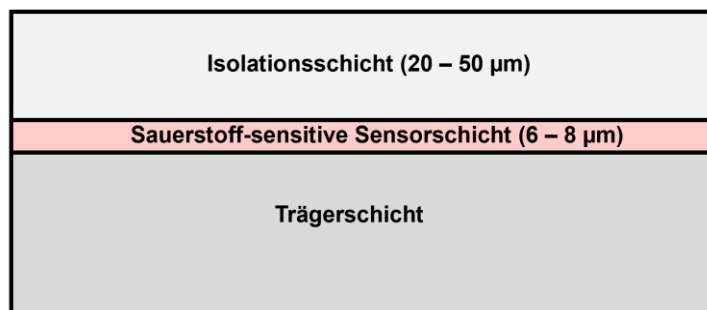


Abbildung 11: Querschnitt der planaren Sauerstoff-sensitiven Sensorfolie, welche aus drei Schichten mit einer Gesamtdicke von 150 – 190 μm besteht. Die oberste Schicht ist eine Isolationsschicht (Dicke: 20 – 50 μm), welche nicht auf Änderungen der Sauerstoffkonzentration reagiert. Die Sensorschicht mit einer Dicke von 6 – 8 μm enthält den Sauerstoff-sensitiven Farbstoff und den Referenzfarbstoff. Die unterste Schicht bildet die transparente Trägerschicht aus Polyester, welche nicht-permeabel für Sauerstoff ist (modifiziert nach X. Wang & Wolfbeis, 2014).

Die transparente Trägerschicht aus Polyester, welche nicht-permeabel für Sauerstoff ist, bildet die Basis der Sensorfolie. Die mittlere Sensorschicht mit einer Dicke von 6 – 8 μm enthält den Sauerstoff-sensitiven Farbstoff und den Referenzfarbstoff. Die oberste optische Isolationsschicht auf Silikonbasis ist Sauerstoff-permeabel, reagiert

allerdings nicht auf Änderungen in der Sauerstoffkonzentration. Diese besitzt eine Dicke von 20 – 50 μm und blockiert das Umgebungslicht. Die Isolationsschicht wurde im Zuge aller Messungen entfernt, um den Zellen eine bessere Adhäsion auf dem Sensor zu ermöglichen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Sensorfolien, vor Licht geschützt, gelagert. Eine schematische Skizze des Messprinzips am Beispiel eines adhärennten Sphäroids ist in **Abbildung 12** dargestellt. Die Sphäroide wurden zunächst auf die Sauerstoff-sensitive Sensorfolie transferiert. Anschließend folgt der Adhäsionsprozess über den Zeitraum von 24 Stunden. Für die Sauerstoffmessung ist das überstehende Medium mit Sauerstoff gesättigt. Durch das Verhältnis der emittierten Lumineszenzintensitäten des Sensor- und Referenzfarbstoffes, welche in eine biokompatible Polymermatrix eingebettet sind, kann die Sauerstoffkonzentration bestimmt werden. Bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen ist die Emissionsintensität des Sensorfarbstoffes groß, während diese durch Kollisions*quenching* mit molekularem Sauerstoff bei hohen Sauerstoffkonzentrationen abnimmt. Die Emissionsintensität des Referenzfarbstoffes bleibt hingegen unabhängig von der vorliegenden Sauerstoffkonzentration.

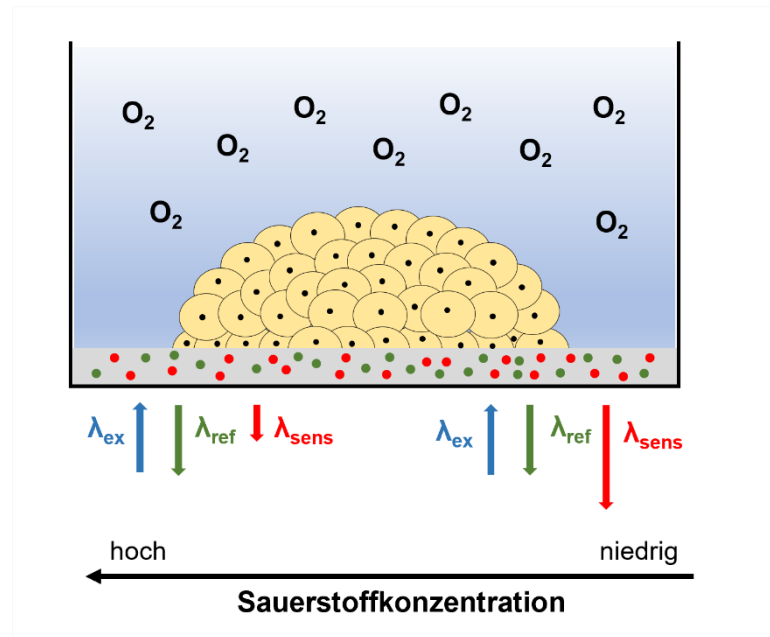


Abbildung 12: Schematische Skizze des ratiometrischen Messprinzips zur Bestimmung der Sauerstoffkonzentration in einem Querschnitt von adhärennten Sphäroiden.

3.3 Numerische Simulationen mit der Finiten-Elemente-Methode

Viele Simulationsprogramme zur Bearbeitung wissenschaftlicher und technischer Probleme beruhen auf der Finiten-Elemente-Methode (FEM). Dabei handelt es sich um ein numerisches Verfahren mit dessen Hilfe partielle Differentialgleichungen gelöst werden können. In dieser Arbeit wurde die kommerzielle Simulationssoftware COMSOL Multiphysics® (im Folgenden lediglich mit COMSOL bezeichnet) verwendet, welche ebenfalls auf der FEM basiert. Die Simulationsplattform ist modular aufgebaut und kann in vielen Anwendungsgebieten, wie der Elektromagnetik oder im Bereich der Chemie- und Verfahrenstechnik, genutzt werden. Im Folgenden wird die Finite-Elemente-Methode (**Kapitel 3.3.1**) sowie das in dieser Arbeit verwendete Softwaremodul mit den zugrundeliegenden Differentialgleichungen beschrieben (**Kapitel 3.3.2**).

3.3.1 Finite-Elemente-Methode (FEM)

Viele physikalische Probleme werden mittels partieller Differentialgleichungen (PDE) beschrieben. Diese können allerdings zumeist nicht mit analytischen Methoden gelöst werden. Infolgedessen werden sie mit verschiedenen Diskretisierungsmethoden, wie die der finiten Elemente, approximiert und durch numerische Methoden gelöst. Die Vorgehensweise der komplexen FEM beinhaltet zwei elementare Konzepte. Zunächst wird die PDE in die sogenannte schwache Form überführt. Deren abhängige Variable wird daraufhin mittels einer endlichen Linearkombination von Basisfunktion approximiert. Die Bildung der schwachen Form ist die Basis der FEM, da hiermit die Integralform formuliert wird, welche die Grundlage der numerischen Berechnung liefert. Dieser elementare Schritt wird im Folgenden sehr vereinfacht am Beispiel der eindimensionalen Diffusionsgleichung erläutert, welche über dem Gebiet $x \in [0;1]$ durch folgende PDE definiert ist (Dokos, 2017):

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2}$$

(9)

mit dem Diffusionskoeffizient D , der Konzentration c und der Zeit t .

Des Weiteren werden für **Gleichung (9)** nach Dokos (2017) folgende Anfangs- und Randbedingungen angenommen:

$$c(x,0) = c_0(x), c(0,t) = p(t), D \frac{\partial c}{\partial x} \Big|_{x=1} = q(t) \quad (10)$$

Gesucht ist demnach eine Funktion $c(x,t)$, $x \in [0;1]$, sodass die **Gleichungen (9)** und **(10)** erfüllt sind.

Um nun die schwache Form zu erhalten, werden zuerst beide Seiten der PDE mit einer Testfunktion $w(x) \in V$ multipliziert, wobei V definiert ist durch:

$$V = \{w(x) : w(x) \in H^1, w(0) = 0\} \quad (11)$$

mit H^1 als Menge aller quadratisch integrierbaren Funktionen, die eine quadratisch integrierbare schwache Ableitung besitzen.

Anschließend wird über das Gebiet integriert mit der schwachen Integralform als Ergebnis, welche alle Rand- und Anfangsbedingungen enthält sowie für alle $w \in V$ gilt:

$$\frac{d}{dt} \int_0^1 cw \, dx + \int_0^1 D \frac{\partial c}{\partial x} \frac{dw}{dx} \, dx = q(t)w(1) \quad (12)$$

Die erhaltene schwache Form wird daraufhin über die Methode der finiten Elemente gelöst, indem die abhängige Variable in jedem Knotenpunkt x durch eine endliche Menge von Basisfunktionen Ψ_i approximiert wird (siehe **Abbildung 13**). Die Basisfunktionen Ψ_i in **Abbildung 13** sind stückweise lineare Funktionen, welche wegen ihrer Form oft als Dreiecksfunktionen bezeichnet werden, und sind lediglich in einem kleinen Intervall um den Knoten ungleich 0.

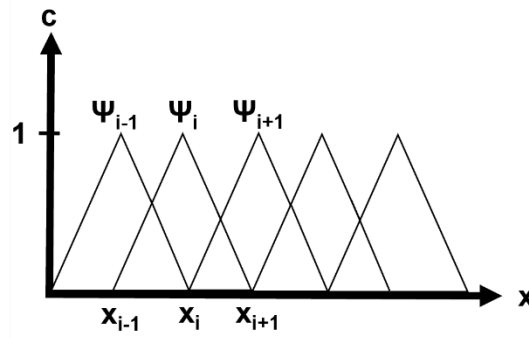


Abbildung 13: Diskretisierung des Intervalls mit drei Knotenpunkten x_{i-1} , x_i , und x_{i+1} , welche zwei benachbarte Elemente aufspannen. Die einzelnen Basisfunktionen $\Psi_i(x)$ approximieren die abhängige Variable c (modifiziert nach Dokos, 2017; Goering et al., 2010).

Für den eindimensionalen Fall werden diese Basisfunktionen folgendermaßen gewählt und definiert (Dokos, 2017):

$$\Psi_i(x) = \begin{cases} \frac{x - x_{i-1}}{x_i - x_{i-1}} & x_{i-1} \leq x < x_i \\ \frac{x_{i+1} - x}{x_{i+1} - x_i} & x_i \leq x < x_{i+1} \\ 0 & x < x_{i-1}, x \geq x_{i+1} \end{cases}$$

(13)

$$\Psi_i(x_j) = \begin{cases} 0 & i \neq j \\ 1 & i = j \end{cases}$$

(14)

Somit wird für die schwache Form in **Gleichung (12)** die abhängige Variable $c(x,t)$ durch folgende Linearkombination finiter Basisfunktionen approximiert

$$c(x,t) \approx \sum_{i=1}^N c_i(t) \Psi_i(x)$$

(15)

mit den Koeffizienten $c_i(t)$, welche dem Wert der abhängigen Variable $c(x,t)$ ausgewertet am jeweiligen Knotenpunkt zum Zeitpunkt t entsprechen.

Für die anfänglich nicht näher definierten Testfunktionen werden nach der Galerkin-Methode ebenfalls die Basisfunktionen gewählt, sodass gilt:

$$w_j(x) = \Psi_j(x) \quad (j = 1, \dots, N) \quad (16)$$

Anschließend wird die schwache Form in **Gleichung (12)** folgendermaßen durch die Approximationen in **Gleichung (15)** und **(16)** substituiert:

$$\frac{d}{dt} \int_0^1 \left(\sum_{i=1}^N c_i(t) \Psi_i(x) \right) \Psi_j(x) dx + \int_0^1 D \frac{\partial}{\partial x} \left(\sum_{i=1}^N c_i(t) \Psi_i(x) \right) \frac{d\Psi_j(x)}{dx} dx = q(t) \Psi_j(1) \quad (17)$$

Das Umstellen von **Gleichung (17)** liefert ein lineares Gleichungssystem mit n Gleichungen, in welchem lediglich die n gesuchten Parameter c_i unbekannt sind. Dieses kann daraufhin mittels klassischer Methoden gelöst werden.

Zusammenfassend bildet die finite-Elemente-Methode ein numerisches Werkzeug zur Lösung partieller Differentialgleichungen. Durch die Diskretisierung des zugrundeliegenden Gebietes in einfache Teilgebiete, wie zum Beispiel Dreiecke, wird das analytisch nicht lösbare Problem in ein algebraisches umgewandelt. Anschließend wird an endlich vielen Knotenpunkten der unbekannten Funktion ein lineares Gleichungssystem erzeugt, nach dessen Lösung die Werte der Unbekannten näherungsweise bestimmt sind. Die resultierende Lösung bildet schließlich eine hinreichend genaue Lösung der anfänglichen PDE.

3.3.2 Chemischer Stofftransport – Transport verdünnter Spezies

Die räumliche und zeitaufgelöste Verteilung von Sauerstoff in Zellen und Geweben wurde mit dem Interface „Chemischer Stofftransport – Transport verdünnter Spezies“ in einem kontinuierlichen Modellierungsansatz analysiert. Dieses Interface ist im Modul „Chemical Reaction Engineering“ in COMSOL enthalten und ermöglicht die Simulation von Diffusionsprozessen und der zugrundeliegenden Reaktionskinetik (COMSOL, 1998-2022). Das mathematische Modell zur Beschreibung der Diffusion und

Veratmung von Sauerstoff in *in vitro* Gewebemodellen wird dabei durch folgende allgemeine partielle Differentialgleichung beschrieben:

$$\frac{\partial c_{O_2}(x,y,z,t)}{\partial t} = D_{\text{Gewebe}} \nabla^2 c_{O_2}(x,y,z,t) - R_{O_2}(x,y,z,t) \quad (18)$$

mit der intrazellulären Sauerstoffkonzentration c_{O_2} , dem Diffusionskoeffizient von Sauerstoff im Gewebe D_{Gewebe} , der intrazellulären Sauerstoffverbrauchsrate R_{O_2} , der Zeit t und dem Nabla-Operator ∇ .

Diese Gleichung ist unter der Annahme gültig, dass die Verteilung von Sauerstoff innerhalb des Gewebes ausschließlich von Diffusions- und Veratmungsprozessen abhängt. Im Medium oder wässriger Lösung hingegen, welches das Gewebe umgibt, finden lediglich Fick'sche Diffusionsprozesse statt. Somit vereinfacht sich die oben genannte Gleichung um den Parameter R_{O_2} . In beiden Fällen, der Diffusion im Gewebe und im Medium, wird der Diffusionskoeffizient als konstant angenommen, da er unabhängig von örtlichen Raumkoordinaten ist.

Die Sauerstoffverbrauchsrate R_{O_2} innerhalb des Gewebes wurde nach Longmuir et al. (1971) mit der Michaelis-Menten-Reaktionskinetik beschrieben und findet einschlägige Anwendung in der Literatur (Grimes, Fletcher & Partridge, 2014; Magliaro et al., 2019; Wilson et al., 1988; Zhao et al., 2005). Demnach ändert sich **Gleichung (18)** wie folgt:

$$\frac{\partial c_{O_2}(x,y,z,t)}{\partial t} = D_{\text{Gewebe}} \nabla^2 c_{O_2}(x,y,z,t) - \frac{R_{\max} \cdot c_{O_2}(x,y,z,t)}{c_{O_2}(x,y,z,t) + K_{MM, O_2}} \quad (19)$$

mit der maximalen Sauerstoffverbrauchsrate R_{\max} und der Michaelis-Menten Konstante K_{MM, O_2} (repräsentiert die Sauerstoffkonzentration, bei welcher der Verbrauch 50% von R_{\max} ist).

Eine Veranschaulichung des Sauerstoffverbrauchs als Funktion der Sauerstoffkonzentration im Gewebe nach Michaelis-Menten wird in **Abbildung 14** dargestellt.

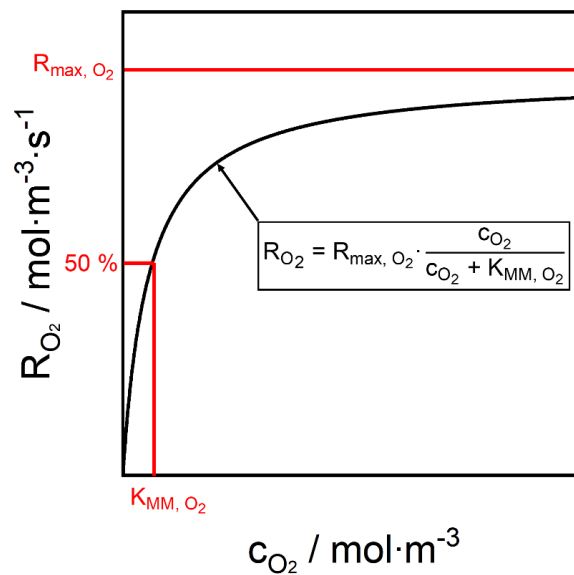


Abbildung 14: Darstellung des Sauerstoffverbrauchs als Funktion der Sauerstoffkonzentration im Gewebe gemäß der Michaelis-Menten Reaktionskinetik mit einer maximalen Sauerstoffverbrauchsrate R_{\max} in $[\text{mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}]$ und der Michaelis-Menten Konstante K_{MM} , welche für die Sauerstoffkonzentration in $[\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}]$ steht, bei welcher der Verbrauch halb so groß von R_{\max} ist.

Die Hauptannahme, welche aus der mathematischen Modellierung des Sauerstoffverbrauchs mit Michaelis-Menten resultiert, ist, dass die Sauerstoffverbrauchsrate R_{O_2} auf eine nicht-lineare Art und Weise von der lokalen Sauerstoffkonzentration abhängt. Des Weiteren erreicht R_{O_2} für höhere Sauerstofflevel einen Art Sättigungswert R_{\max} , welcher im Gewebe selbst als konstant angenommen wird. Nicht zuletzt legt die Form der Gleichung für den Sauerstoffverbrauch nahe, dass die Michaelis-Menten Konstante ebenfalls einen Einfluss auf den Kurvenverlauf hat. Allerdings ist dieser gering, da die Werte, laut Literatur, mit circa $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ (Casciari et al., 1992b; Papas et al., 2005; Shourabi et al., 2021) kleiner sind als die mittlere Sauerstoffkonzentration von circa $10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ in normoxischem Gewebe (McKeown, 2014).

4 Material und Methoden

Im Anhang befindet sich eine detaillierte Liste der Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.

4.1 Zellkulturtechniken

Im Folgenden Kapitel werden alle Zellkulturtechniken erläutert, welche im Rahmen dieser Arbeit angewendet wurden.

4.1.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Mit dem Ziel eine Kontamination zu verhindern, wurde die gesamte Zellkulturarbeit unter sterilen Bedingungen in einer Laminar-Flow-Haube (HERAsafe, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) durchgeführt. Sämtliche unsterilen Verbrauchsmaterialien und Substrate wurden entweder durch 20-minütiges Autoklavieren bei 120 °C und 2 bar (Autoklav DX-45, Systec GmbH & Co. KG, Linden, Deutschland) oder durch das Argon Plasma (30 s - 1 min; PDC 32G-2 Harrick Plasma, Ithaca, USA) sterilisiert. Medien oder Lösungen wurden, sofern sie nicht bereits steril geliefert wurden, steril filtriert (0,2 µm Porendurchmesser, TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz). Die Zellen wurden in T25 Zellkulturflaschen aus Polystyrol (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) mit einer Wachstumsfläche von 25 cm² und einem Volumen von 4 mL Medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) kultiviert. Die Aufbewahrung der Zellen erfolgte in einem gewöhnlichen Zellkulturinkubator (Heraeus, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bei einer Temperatur von 37 °C, einem CO₂-Gehalt von 5 % und relativer Luftfeuchtigkeit von 95 %. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt (4 mL), um eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen zu gewährleisten. Die Subkultivierung erfolgte einmal pro Woche unter Verwendung eines bestimmten Protokolls (siehe **Kapitel 4.1.3**).

4.1.2 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden die zwei adhärenenten Zelllinien, MCF-7 und U373-MG verwendet, welche im Folgenden genauer beschrieben werden.

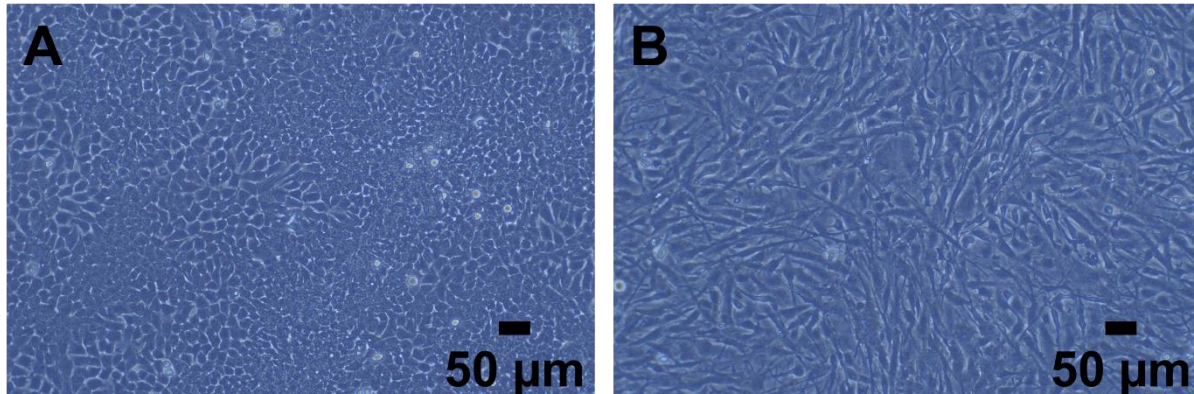


Abbildung 15: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen der Zelllinien, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Konfluente *Monolayer* von MCF-7 Zellen (**A**) und U373-MG Zellen (**B**).

Die Zelllinie MCF-7 aus **Abbildung 15 A** wurde nach der **Michigan Cancer Foundation-7** benannt und stammt aus dem Pleuralerguss einer 69-jährigen Erkrankten (Soule et al., 1973). Es handelt sich um die am meisten untersuchte Brustkrebszelllinie (A. V. Lee et al., 2015) und gilt als nicht-invasiv und wenig aggressiv. Sie besitzt zum einen eine Morphologie, die Epithelzellen sehr ähnlich ist, und zum anderen die Fähigkeit multizelluläre 3D Aggregate zu bilden (Comşa et al., 2015; Gest et al., 2013). Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Prof. Göpferich vom Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie der Universität Regensburg zur Verfügung gestellt.

Die **Abbildung 15 B** zeigt humane Glioblastomzellen der Linie U373-MG (im Folgenden als U373 abgekürzt). Sie stammen von einem malignen Tumor eines 50-jährigen Mannes. Sie besitzen eine gliale Morphologie und zeichnen sich durch eine Vielzahl schmaler, lang gestreckter Zellen aus. Außerdem weisen sie nur ein mäßig dichtes Cytoplasma aus und werden, ähnlich den MCF-7 Zellen, verwendet, um 3D Gewebemodelle, wie Sphäroide, *in vitro* zu kultivieren (Bigner et al., 1981; Sivakumar et al., 2020). Zur Verfügung gestellt wurde die Zelllinie von Prof. Buschauer vom Lehrstuhl für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Universität Regensburg.

4.1.3 Subkultivierung

Die Subkultivierung beider Zelllinien erfolgte einmal wöchentlich unter Verwendung des Protokolls, das in **Tabelle 2** gezeigt ist. Alle Reagenzien und Pufferlösungen wurden dazu im Wasserbad (TW12, Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland) auf 37 °C vorgewärmt, bevor sie auf die Zellen gegeben wurden.

Zunächst wurde das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen zweimal mit einer phosphatgepufferten Kochsalzlösung (PBS⁻, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gewaschen. Dies dient dem Zweck, tote Zellen und zweiwertige Ionen (Mg²⁺/Ca²⁺) zu entfernen. Nach dem Waschprozess wurde 1 mL Trypsin (0,05 % (w/v) Trypsin-EDTA in PBS⁻, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) auf den Zellrasen gegeben und für fünf Minuten bei 37 °C inkubiert, um die Zellen von dem Substrat und untereinander abzulösen. Die proteolytische Spaltung der Zell-Substrat und Zell-Zell-Kontakte wurde durch Zugabe von 10 mL des jeweiligen Zellkulturmediums abgestoppt. Anschließend wurde die Zellsuspension 5 – 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert (Heraeus 1-SR, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA). Nach Absaugen des Überstands wurde das aus der Zentrifugation resultierende Zellpellet in 4 mL Medium resuspendiert. Für darauffolgende routinemäßige Passagen erfolgte die Aussaat in einem Verdünnungsverhältnis von 1:10 (U373) und 1:40 (MCF-7) in neue T25 Zellkulturflaschen. Für Experimente oder die Kultivierung von Sphäroiden wurden die Zellen zunächst mit einem Hämozytometer vom Buerker-Typ (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen, Deutschland) gezählt und auf die gewünschte Zelldichte verdünnt, bevor sie in die jeweiligen Substrate ausgesät wurden.

Tabelle 2: Protokoll für die Subkultivierung der beiden Zelllinien MCF-7 und U373.

Zelllinie	Waschen mit PBS ⁻	Zugabe von Trypsin/PBS ⁻ (0,05 % (w/v) / mL	Inkubation mit Trypsin/PBS ⁻ (37 °C) / min	Medium für Inaktivierung des Enzyms / mL	Zentrifugation (RT) / min
MCF-7	2x	1	5	10	5 (200 x g)
U373	2x	1	5	10	10 (110 x g)

4.1.4 Kultivierung von Sphäroiden

Die Sphäroide, welche im Rahmen dieser Arbeit genutzt wurden, wurden nach der *liquid overlay* Methode generiert. Diese wurde erstmals von Costächel et al. (1969) und Yuhas et al. (1977) beschrieben und wird in **Abbildung 16** schematisch dargestellt. Sie beruht auf dem Prinzip, dass die Adhäsion der Zellen durch nicht-haftende Substratoberflächen verhindert wird und die Zellen folglich 3D Aggregate, sogenannte Sphäroide, bilden. Eine geeignete Methode, um solch nicht-haftende Oberflächen zu bilden, stellt die Beschichtung mit Agarose dar (Carlsson, 1977; Haji-Karim & Carlsson, 1978).

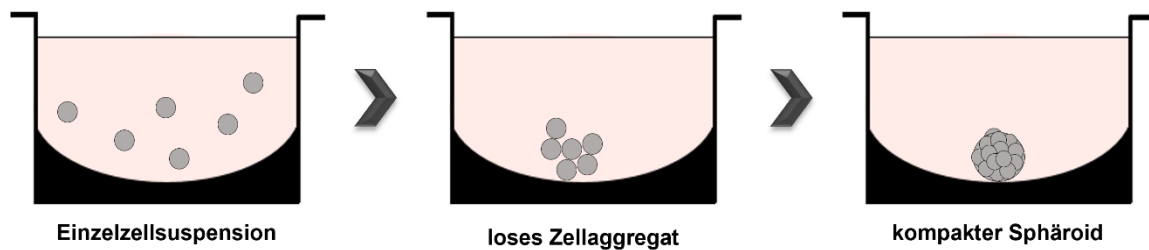


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Kultivierung von Sphäroiden mit der *liquid overlay* Methode. Die Zellen werden in ein Well mit einer nicht-haftenden Substratoberfläche ausgesät. Dies führt zunächst zu der Bildung von losen Zellaggregaten und letztlich zu einem kompakten Sphäroid.

Gemäß der *liquid overlay* Methode wurden 96-Well Platten (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) mit einer 1,5 %igen (w/v) Agaroselösung aus Agarosepulver (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) in serumfreien Zellkulturmedium beschichtet (50 μ L/Well). Die Zellen wurden entsprechend dem Protokoll in **Kapitel 4.1.3** subkultiviert. Die Zellsuspension wurde daraufhin auf eine Zelldichte von 200k Zellen·mL⁻¹ mit Zellkulturmedium, welches mit HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure, 20 mM, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) versetzt wurde, verdünnt. Dies dient dem Zweck, den pH-Wert während der Zeit der Inkubation bei 0 % CO₂ im physiologischen Bereich zu halten. Anschließend wurden die Zellen in unterschiedlichen Zellzahlen in die mit Agarose beschichteten Wells ausgesät (200 μ L/Well). Die Platte wurde mit Parafilm (Pechiney Plastic Packaging INC., Chicago, USA) umwickelt und auf einen Orbitalschüttler (KM-2 AKKU, Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland)

innerhalb eines Inkubators (37 °C, 0 % CO₂, Memmert GmbH & Co. KH, Schwabach, Deutschland) gestellt. Durch das vierstündige Schütteln bei 120 U/min direkt nach Aussaat, gefolgt von 24 Stunden bei 50 U/min, wurde die Bildung der Sphäroide unterstützt. Nach Abschluss des Aggregationsprozesses wurde die Platte in einen Inkubator mit Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO₂) überführt und dort bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.1.5 Zusammensetzung von Medien und Pufferlösungen

Je nach Zelllinie sind Kulturmedien unterschiedlicher Zusammensetzung nötig. Diese sowie andere Medien und Pufferlösungen, welche in dieser Arbeit verwendet wurden, werden in **Tabelle 3** und **Tabelle 4** gelistet. Bis zur Verwendung erfolgt eine Aufbewahrung bei 4 °C.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Zellkulturmedien für die jeweilige Zelllinie. FCS: fetales Kälberserum.

Zelllinie	Kulturmedium	FCS / % (v/v)	L-Glutamin / mM	Penicillin/Streptomycin / µg·mL ⁻¹	Pyruvat / mM
MCF-7	Minimum Essential Medium Eagle (MEM-Eagle) 2,2 g·L ⁻¹ NaHCO ₃ 1 g·L ⁻¹ D-Glukose	10	2	100	1
U373	Minimum Essential Medium Eagle (MEM-Eagle) 2,2 g·L ⁻¹ NaHCO ₃ 1 g·L ⁻¹ D-Glukose	5	2	100	-

Tabelle 4: Zusammensetzung von Medien und Pufferlösungen für die Subkultivierung und Experimente.

Name	Zusammensetzung
Leibovitz Medium (L-15)	ohne Phenolrot + 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (100 µg·mL ⁻¹)
PBS ⁻	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄
Trypsin/PBS ⁻	PBS ⁻ mit 0,05 % (w/v) Trypsin und 1 mM Etyhlendiamintetraacetat (EDTA)

4.1.6 Kryokonservierung

Mit dem Ziel der Kryokonservierung wurden die Zellen in Kulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75 cm² (Sarstedt AG & Co. KG., Nümbrecht, Deutschland) kultiviert, bis eine Konfluenz von circa 80 % erreicht wurde. Daraufhin wurde eine gewöhnliche Subkultivierung, wie in **Kapitel 4.1.3** beschrieben, durchgeführt mit dem Unterschied, dass die Resuspension des Zellpellets in einer kryoprotektiven Lösung aus 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) in FCS erfolgt. Diese Lösung verhindert die Bildung von Eiskristallen und somit die Schädigung der Zellmembran. Die resultierende Zellsuspension wurde in 1,5 – 1,8 mL Kryoröhrchen (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz) aufgeteilt und in einem zweistufigen Verfahren eingefroren. Dabei wurden die Kryos zunächst über Nacht in einem Isopropanol Bad (Mr. Frosty[™], Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) bei -80 °C (HERAfreeze[™], Thermo Fisher Scientific Inc., Marietta, USA) mit einer konstanten Kühlrate von 1 °C/min runtergekühlt, bevor sie für die Langzeitlagerung bei -178 °C in einen flüssigen Stickstofftank (German Cryo GC-BR2150 M, Jutta Ohst german-cryo GmbH, Jüchen, Deutschland) überführt wurden.

Die eingefrorenen Zellen wurden reaktiviert, indem die jeweiligen Aliquots zunächst für zwei Stunden im Gefrierschrank (-20 °C, Constructa-Neff Vertriebs-GmbH, München, Deutschland) und anschließend im Wasserbad aufgetaut wurden. Die Zellsuspension wurde in ein steriles Zentrifugenröhrchen (50 mL, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) überführt, tropfenweise mit dem jeweiligen Zellkulturmedium (zehnfache Menge der Zellsuspension) versetzt und im jeweiligen Programm (siehe **Tabelle 2**) zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurde das Zellpellet resuspendiert und in vier T25 Kulturflaschen mit unterschiedlichen Verdünnungsfaktoren (1:2, 1:4 und zweimal 1:8) ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Medium (4 mL) gewechselt, um tote Zellen und verbleibende DMSO-Rückstände zu entfernen. Eine weitere Subkultivierung erfolgte mit Erreichen einer Konfluenz von 90 %.

4.1.7 Wachstumsstudien (3D)

Mit den Sphäroiden, welche gemäß dem Protokoll aus **Kapitel 4.1.4** generiert wurden, wurden Wachstumsstudien durchgeführt. Dazu wurde das Wachstum von MCF-7 Sphäroiden (initiale Zellzahlen: 4k, 12k, 16k und 20k Zellen/Well; Vergrößerung: 4x) und U373 Sphäroiden (initiale Zellzahlen: 6k und 10k Zellen/Well; Vergrößerung: 10x) über den Zeitraum von sechs Tagen beobachtet und durch Aufnahmen an einem inversen Phasenkontrastmikroskop (Nikon Diaphot, Nikon Instruments Europe, Amsterdam, Niederlande) dokumentiert. Die Durchmesser der Sphäroide wurden mittels der Software NIH ImageJ ermittelt, indem manuell zwei orthogonale Durchmesser gemessen wurden und anschließend der Mittelwert beider Werte gebildet wurde.

Wachstumsstudien von U373 Sphäroiden mit größerer initialer Zellzahl (20k, 30k und 45k Zellen/Well), welche ebenfalls Bestandteil dieser Arbeit sind, wurde auf gleiche Art und Weise von Simone Bäumler durchgeführt und dokumentiert.

4.1.8 Proliferationsassays (2D)

Im Folgenden werden zwei Proliferationsassays beschrieben, welche im Rahmen dieser Arbeit angewendet wurden. In beiden Fällen wurden MCF-7 Zellen in einer geringen Zelldichte ausgesät und die Gesamtzunahme der Zellzahl wurde zeitabhängig auf unterschiedliche Art und Weise bestimmt.

4.1.8.1 Impedimetrische Bestimmung der Zellproliferation mittels ECIS

Für den Proliferationsassays mittels Impedanzmessung wurde das im Handel erhältliche Gerät ECIS Z-Theta (Applied BioPhysics Inc., New York, USA) verwendet. Alle Messungen wurden in einem Inkubator mit dem integrierten ECIS-Messsystem bei 37 °C und 5 % CO₂ durchgeführt. Dieses besteht aus einem Lock-In Verstärker, einem internen Oszillator, einem Halter für zwei 8-Well Elektrodenarrays und einem Relais, welcher das Umschalten zwischen den Elektroden der unabhängigen Wells ermöglicht. Bei den 8-Well Elektrodenarrays (siehe **Abbildung 17**) handelt es sich um 8W10E+ Arrays (Applied BioPhysics Inc., New York, USA) mit einem Arbeitsvolumen von 400 µL. In jedem Well, welches eine Substratfläche von 0,8 cm² besitzt, befinden sich 40 kreisförmige Elektroden in einer interdigitierenden Elektronenstruktur angeordnet. Jede Elektrode besitzt einen Durchmesser von 250 µm. Aufgrund der Tatsache, dass durch die Elektrodenstruktur der gesamte Boden des Wells erfasst ist, kann eine große Anzahl an Zellen überwacht werden.

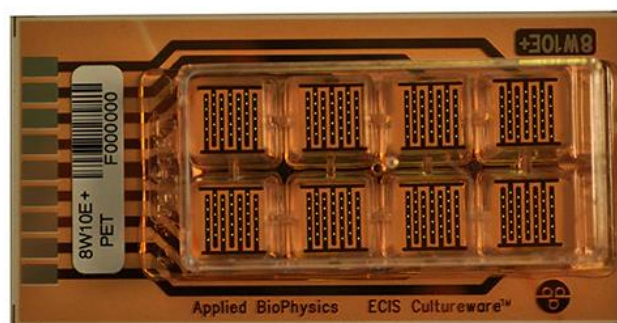


Abbildung 17: Im Handel erhältliche ECIS-PET-Goldelektrodenarrays vom Typ 8W10E+ von Applied BioPhysics (Das Foto wurde von www.biophysics.com entnommen).

Der Assay wurde im MFT-Modus (*Multi-Frequency/Time*) mit sechs individuellen Frequenzen (4 kHz, 8 kHz, 16 kHz, 32 kHz, 40 kHz und 64 kHz) durchgeführt, um die sensitivste Frequenz für diesen Assay bestimmen zu können.

Die beiden Arrays wurden zu Beginn 30 s im Argon Plasma sterilisiert und gereinigt. Um die Adhäsion der Zellen zu verbessern, wurde anschließend jedes Well mit einer Poly-L-Lysin-Lösung der Konzentration $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (200 μL , Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) beschichtet. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurde die Lösung abgesaugt und die Arrays wurden einmal mit Zellkulturmedium gewaschen. Die Messung wurde daraufhin mit der Aufnahme einer *Baseline* der zellfreien Elektroden, welche mit 400 μL Medium bedeckt waren, gestartet. Nach drei Stunden wurde die Messung gestoppt und die Zellen wurden in fünf unterschiedlichen Zelldichten ($15\text{k Zellen}\cdot\text{cm}^{-2}$, $20\text{k Zellen}\cdot\text{cm}^{-2}$, $25\text{k Zellen}\cdot\text{cm}^{-2}$, $50\text{k Zellen}\cdot\text{cm}^{-2}$ und $100\text{k Zellen}\cdot\text{cm}^{-2}$) auf den Elektrodenarrays ausgesät. Die ersten drei Zelldichten wurden in Vierfachbestimmung ($n = 4$) in einem Experiment getestet, während die Zelldichten von $50\text{k Zellen}\cdot\text{cm}^{-2}$ und $100\text{k Zellen}\cdot\text{cm}^{-2}$ in Zweifachbestimmung ($n = 2$) analysiert wurden. Mit dem Ziel einer homogenen Sedimentierung der Zellen wurden die Arrays für 15 Minuten in der Sterilbank stehen gelassen, bevor sie wieder in die *Holder* des Messgerätes eingebaut wurden. Nach circa 93 Stunden wurde die Hälfte des Mediums gewechselt, um die Nährstoffversorgung aufrechtzuerhalten und die Zellen nicht zusätzlichen Scherkräften auszusetzen. Die Messung wurde nach 130 Stunden beendet. Für weitere Messungen, in welchen nur die Zelldichten $15\text{k Zellen}\cdot\text{cm}^{-2}$, $20\text{k Zellen}\cdot\text{cm}^{-2}$ und $25\text{k Zellen}\cdot\text{cm}^{-2}$ getestet wurden, wurden jeweils zwei neue Elektrodenarrays verwendet, da ein Entfernen der Zellen nur schwer möglich war.

4.1.8.2 Proliferationsbestimmung mittels PrestoBlue™ Assay

Bei PrestoBlue™ handelt es sich um ein membrangängiges Reagenz, welches auf der Reduktion des nicht-fluoreszierenden Resazurin zum pink-fluoreszierenden Resorufin beruht, wobei NADH/H^+ als Elektronendonator fungiert (siehe **Abbildung 18**). Durch die Tatsache, dass die Reduktion nur durch lebendige und metabolisch aktive Zellen erfolgen kann, entsteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Fluoreszenz und der Zahl lebender Zellen. Somit eignet es sich ideal zur quantitativen Messung der Zellproliferation und ist zudem schnell, effizient, einfach und günstig (Lall et al., 2013; O'Brien et al., 2000; Präbst et al., 2017).

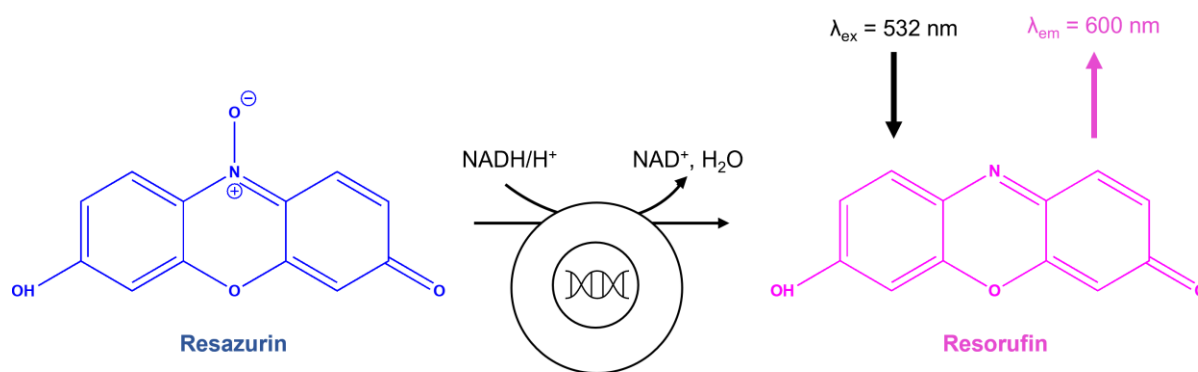


Abbildung 18: Schematische Darstellung des Resazurin-basierten Assays zur Bestimmung der Zellviabilität und-proliferation. Das nicht-fluoreszierende blaugefärbte Resazurin diffundiert in die Zelle und wird dort, unter Oxidation von NADH/H⁺, zum pink-fluoreszierenden Resorufin reduziert. Durch Anregung des membranpermeablen Resorufin bei einer Wellenlänge von 532 nm kann die Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen werden (modifiziert nach Präbst et al., 2017).

Zur Bestimmung der Zellproliferation mit PrestoBlue™ wurde zunächst eine Kalibration durchgeführt. Dazu wurde eine 96-Well Platte, wie in **Kapitel 4.1.8.1** beschrieben, mit einer Poly-L-Lysin-Lösung der Konzentration 100 µg·mL⁻¹ (100 µL/Well) beschichtet. Nach der einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen in unterschiedlichen Zelldichten (10k Zellen·cm⁻², 20k Zellen·cm⁻², 50k Zellen·cm⁻², 100k Zellen·cm⁻², 150k Zellen·cm⁻² und 250k Zellen·cm⁻²) in je eine Spalte der 96-Well Platte ausgesät, wobei die erste Spalte als Negativkontrolle dient und nur mit Medium befüllt wurde. Nach einer Inkubationszeit von 20 Stunden (37 °C, 5 % CO₂) wurde das Medium entfernt und die Zellen wurden einmal mit L-15 Medium gewaschen. Anschließend wurde in jedes Well 100 µL der PrestoBlue™-Lösung (10 µg·mL⁻¹ in L-15 Medium, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) zugegeben und die 96-Well Platte wurde für eine Stunde bei 37 °C und 0 % CO₂ (MMM Medcenter Einrichtungen GmbH, Planegg / München, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität der zellfreien und zellbedeckten Wells am Fluoreszenz Plattenleser TecanGENios (Tecan GmbH, Crailsheim, Deutschland) gemessen. Die Messparameter waren dabei wie folgt: $\lambda_{\text{ex}} = 532 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 600 \text{ nm}$, gain = 62, bottom modus. Zur Bestimmung der Proliferationsrate mit PrestoBlue™ wurden vier 96-Well Platten ebenfalls mit einer Poly-L-Lysin-Lösung beschichtet und für eine Stunde inkubiert, bevor drei unterschiedliche Zelldichten (15k Zellen·cm⁻², 20k Zellen·cm⁻² und 25k Zellen·cm⁻²) in je zwei Spalten pro Platte ausgesät wurden, wobei die erste Spalte

erneut als Negativkontrolle dient. Jede Zelldichte wurde somit in 16-facher Bestimmung ($n = 16$) pro Experiment und pro 96-Well Platte gemessen. Im 24 Stunden Rhythmus nach Zellaussaat wurde je eine Platte zunächst mikroskopiert und anschließend wurde, wie bei der Kalibration beschrieben, das PrestoBlue™ Reagenz zugegeben. Im Rahmen der Datenanalyse wurden die Fluoreszenzintensitäten für jede Zelldichte und jeden Zeitpunkt (24 h, 48 h, 72 h und 96 h nach Zellaussaat) um die Werte der Negativkontrollen korrigiert, gemittelt und anschließend auf den Wert nach 24 Stunden normiert.

4.2 Mikroskopische Techniken

Alle mikroskopischen Techniken, welche im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, werden im Folgenden genauer erläutert. Des Weiteren wird näher auf die fluoreszenzbasierte Färbetechnik mit Calcein-Acetoxy-methylester (Calcein-AM) eingegangen, welche die detaillierte Untersuchung dreidimensionaler Zellaggregate ermöglicht.

4.2.1 Phasenkontrastmikroskopie

Die Technik der Phasenkontrastmikroskopie (PKM) wurde erstmal von Frits Zernike in den 1930er Jahren beschrieben (Zernike, 1935, 1942) und ermöglicht die Darstellung ungefärbter zellulärer Strukturen mit gutem Kontrast und großer Objektähnlichkeit (Bommer, 1952).

Die Grundlage der Technik beruht auf den Eigenschaften von Licht als elektromagnetische Welle. Infolgedessen besitzt sichtbares Licht eine charakteristische Amplitude und Phase (Droop et al., 2022). Tritt Licht nun in Wechselwirkung mit sehr dünnen, transparenten Objekten, wird es in der Phase zurückgehalten. Ein derartiger Phasenkontrast kann allerdings vom menschlichen Auge nicht wahrgenommen werden. Die Phasenkontrastmikroskopie ermöglicht es nun, diese Phasenverschiebungen des Lichtes sichtbar zu machen. **Abbildung 19** zeigt eine schematische Skizze der verschiedenen Bestandteile eines handelsüblichen Phasenkontrastmikroskops und den optischen Weg des Lichtes von der Lichtquelle bis zum menschlichen Auge oder einer Kamera. Das Licht einer polychromatischen Lichtquelle wird über eine Sammellinse auf die Ringblende im Kondensor geleitet und anschließend auf die Probe fokussiert. Je nach Brechungsindex der Probenbestandteile werden die Lichtstrahlen mehr oder weniger stark durch Beugung abgelenkt. Ungebeugte Lichtstrahlen erfahren keine Phasenverschiebung, während das gebeugte Licht bei den meisten biologischen Proben in der Regel um circa $1/4$ der Wellenlänge ($1/4 \lambda$) phasenverschoben wird. Die durch das Präparat gebeugten Lichtstrahlen passieren anschließend den Phasenring, welcher optisch konjugiert zur Ringblende ist, nicht und bleiben unbeeinflusst. Die ungebeugten Lichtstrahlen hingegen treffen auf den Phasenring und werden um $1/4 \lambda$

beschleunigt. Als Resultat ist eine Phasenverschiebung von einer halben Wellenlänge ($\frac{1}{2} \lambda$) zwischen gebeugtem und ungebeugtem Licht zu verzeichnen. Infolge dieser Phasendifferenz kommt es in der Zwischenbildebene zu Interferenzvorgängen mit Hell- und Dunkelkontrasten als Ergebnis einer nun deutlich reduzierten Amplitude des Lichtes, was die zu untersuchende Probe nun für das menschliche Auge sichtbar macht (Neumann et al., 2014).

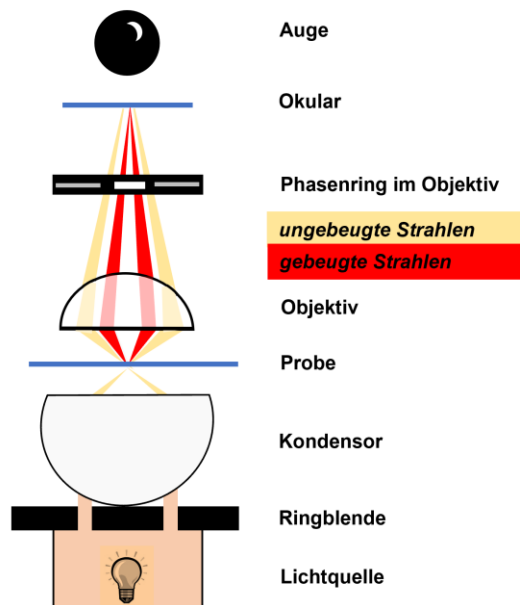


Abbildung 19: Schematische Skizze der einzelnen Bestandteile und des Bildentstehungsprozesses in einem Phasenkontrastmikroskop (modifiziert nach Neumann et al., 2014).

Die phasenkontrastmikroskopischen Aufnahmen dieser Arbeit wurden mit einem Nikon Diaphot Mikroskop (Nikon Instruments Europe, Amsterdam, Niederlande) mit dem vierfachen (PLAN, 4 x, NA = 0,13) und zehnfachen (E, 10 x, NA = 0,25) Vergrößerungsobjektiv durchgeführt. Das Mikroskop ist zusätzlich mit einer Nikon D5000 Digitalkamera (Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) ausgestattet.

4.2.2 Konfokale Laser-Raster Mikroskopie

Die konfokale Laser-Raster Mikroskopie (*confocal laser scanning microscopy* CLSM) ermöglicht es optische Schnitte einer fluoreszenzgefärbten biologischen Probe zu erzeugen. Solch optische Schnitte entstehen konkret dadurch, dass die Probe mit einem fokussierten monochromatischen Laserstrahl punktförmig gescannt wird und

das Licht außerhalb der Fokusebene mittels Lochblenden (*Pinholes*) eliminiert wird. Durch die erhöhte axiale und laterale Auflösung und die Fähigkeit Sequenzen optischer Schnitte auf verschiedenen Ebenen zu sammeln, eignet sich diese Art der Mikroskopie vor allem für die Untersuchung von Zellen und Geweben, die dicker als $2\text{ }\mu\text{m}$ und mit einem oder mehreren Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt sind (Paddock, 1999, 2000). Das Prinzip dieser Technik wurde 1955 erstmals von Marvin Minsky beschrieben, 1957 patentiert (Minsky, 1988) und ist schematisch in **Abbildung 20** skizziert.

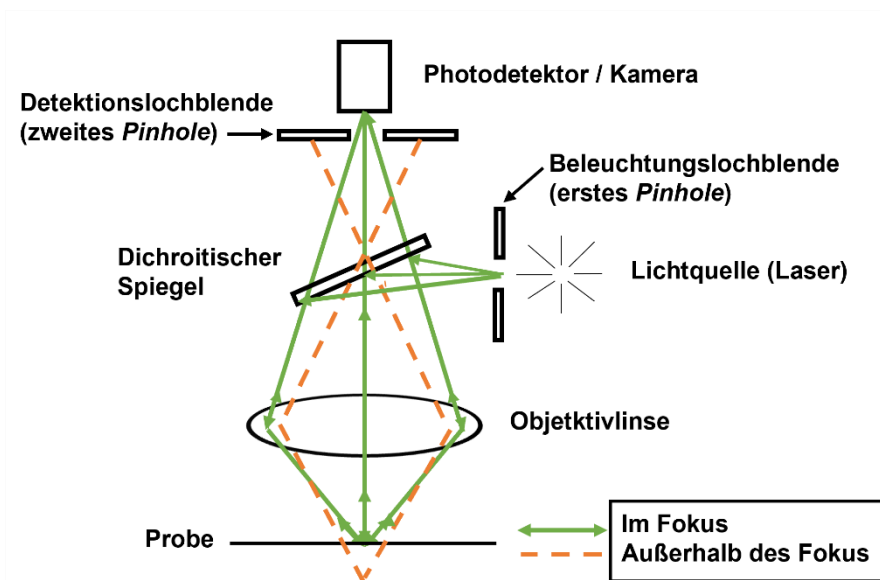


Abbildung 20: Schematische Skizze des Aufbaus eines konfokalen Laser-Raster Mikroskops (modifiziert nach Paddock, 2000; Stephens & Allan, 2003).

Das Licht eines monochromatischen Lasers passiert die Beleuchtungslochblende, woraufhin es fokussiert wird, um eine punktförmige Lichtquelle zu erzeugen. Der dichroitische Spiegel reflektiert daraufhin das Anregungslicht. Anschließend wird das Laserlicht mit Hilfe des Objektivs auf die Probe fokussiert und es werden lediglich die Fluorophore im Lichtweg angeregt. Das emittierte Licht der Fokusebene gelangt über den dichroitischen Spiegel zur Detektionslochblende und schließlich zum Detektor (Photomultiplier oder CCD-Kamera). Die optische Konjugation aus Beleuchtungs- und Detektionsblende ermöglicht somit ausschließlich die Detektion von Licht aus der gewählten Fokusebene, während reflektiertes oder emittiertes Licht aus anderen Ebenen (außerfokales Fluoreszenzlicht) ausgeblendet wird. Diese Tatsache schafft

die Voraussetzung für eine axiale Auflösung, welche durch den Durchmesser der Detektionslochblenden vorgegeben wird. Durch das punktförmige Scannen der biologischen Probe bei einer definierten xy-Ebene und der damit einhergehenden erhöhten lateralen Auflösung wird ein 2D Bild generiert. Durch eine zusätzliche Veränderung der z-Position kann eine 3D Analyse des Präparats erfolgen, ohne dieses physikalisch zu zerstören (Paddock, 2000; Park et al., 2004; Renz, 2013; Stephens & Allan, 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das konfokale-Laser-Scanning-Mikroskop Eclipse 90i mit C1 Scaneinheiten (Nikon Instruments Europe, Amsterdam, Niederlande) genutzt und die Sphäroide wurden mittels der Software EZ-C1 (Nikon) aus verschiedenen Blickwinkeln (xy, yz und yz; siehe **Abbildung 21**) analysiert.

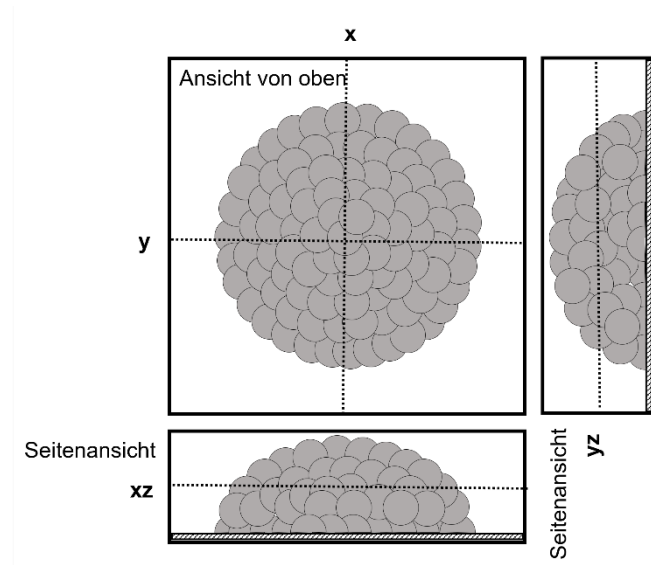


Abbildung 21: Schematisches Prinzip der konfokalen Laser-Raster Mikroskopie. Die Ansicht von oben zeigt einen optisch konfokalen Schnitt der xy-Ebene eines Sphäroids. Außerdem sind die entsprechenden Seitenansichten (xz,yz) abgebildet, die es ermöglichen, die Höhe des adhärenen Sphäroids zu ermitteln.

Die Bilder wurden unter Verwendung eines 10 x Trockenobjektivs (PLAN, 10 x, NA = 0,25), mit einer Auflösung von 1024x1024 Pixel und einem *Pinhole* S ($\varnothing = 30 \mu\text{m}$) gescannt. Die Ebenenstapel (z-stacks) für die 3D Analyse von Sphäroiden wurden mit einer Schrittgröße von $2 \mu\text{m}$ aufgenommen.

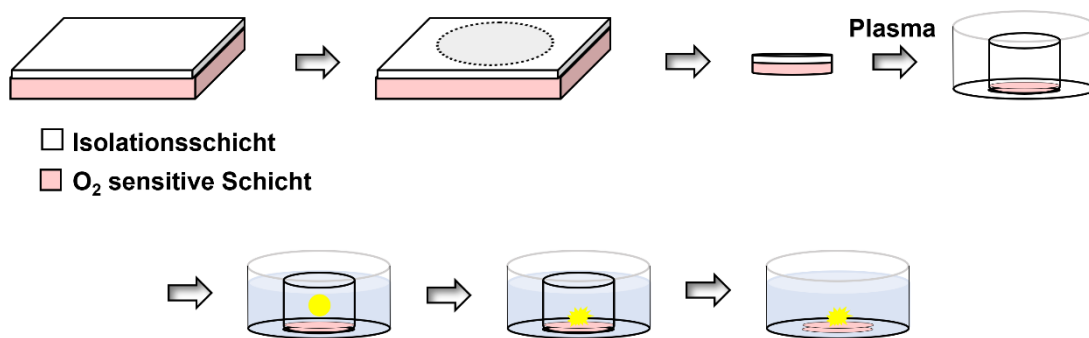


Abbildung 23: Schematische Darstellung der Vorbereitung der Sauerstoff-sensitiven Substrate. Zunächst wurde die Isolationsschicht entfernt und kreisförmige Folienspots ausgestanzt. Die Folienspots und die Glasringe wurden daraufhin für eine Minute im Argonplasma sterilisiert, bevor sie in eine Petrischale mit einem Durchmesser von 3,5 cm geklebt wurden. Nach 24-stündigem Trocknen des Silikonklebers zum Befestigen der Glasringe wurden die Sphäroide mittig in die Messkammer platziert und die Substrate wurden für 24 Stunden inkubiert (37 °C, 0 % CO₂), um eine Adhäsion der Sphäroide zu ermöglichen. Nach Vollendung des Adhäsionsprozesses wurde das L-15 Medium aus der Messkammer abgenommen und eine mit Calcein-AM versetzte L-15 Lösung wurde zugegeben. Zuletzt erfolgte, nach Entfernen des Glasringes, die Untersuchung mit einem konfokalen Laser-Raster Mikroskop.

Dazu wurden selbstklebende Folienspots mit einem Durchmesser von 0,7 cm ausgestanzt und zusammen mit Glasringen ($\varnothing_{\text{außen}} = 9 \text{ mm}$, $\varnothing_{\text{innen}} = 6 \text{ mm}$, Höhe = 1 cm, Wanddicke = 1,5 mm, Glasbläserei der Universität Regensburg, Regensburg, Deutschland) im Argonplasma für eine Minute sterilisiert. Die sterilen und hydrophilisierten Sensorfolien wurden daraufhin in eine Petrischale mit einem Durchmesser von 3,5 cm (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) geklebt. Anschließend wurden die Glasringe, welche als Messkammer für die Sphäroide dienten, mit Silikonkleber (Korasilon Paste, Kurt Obermeier GmbH & Co. KG, Bad Berleburg-Raumland, Deutschland) um den Sensorspot fixiert. Nach 24-stündigem Trocknen des Klebers, bei Raumtemperatur und von Licht geschützt, wurden 200 μL L-15 Medium in den Innenraum des Glasringes und 1,5 mL außerhalb zugegeben, um ein Austrocknen zu vermeiden. Zuletzt wurden mindestens zwei Sphäroide möglichst mittig in die Messkammer platziert und die Petrischalen für 24 Stunden in den Inkubator (37 °C, 0 % CO₂) gestellt, um eine Adhäsion der Sphäroide zu ermöglichen. Nach Vollendung des Adhäsionsprozesses wurde eine 1 mM Stammlösung von Ca-AM in DMSO (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) auf

eine Endkonzentration von 2,5 μM in L-15 Medium verdünnt. Anschließend wurde das L-15 Medium vorsichtig aus den Messkammern abgenommen, 100 μL der Färbelösung langsam entlang der Wand des Glasringes zugegeben und die Sphäroide für drei Stunden bei 37 °C und 0 % CO_2 inkubiert. Die fluoreszenzmarkierten Sphäroide wurden mit einem konfokalen Laser-Raster Mikroskop untersucht. Dazu wurden zunächst die Glasringe entfernt, um den Fokus zu verbessern. Calcein-AM wurde mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und die grüne Fluoreszenz wurde mit einem 515/30 nm Filter detektiert. Die Sauerstoff-sensitive Sensorfolie wurde bei 408 nm angeregt und die rote Emission wurde über einen 650 nm Langpassfilter aufgezeichnet. Die resultierende Höhe und der Durchmesser der adhärenen Sphäroide wurden anschließend mit der Software Nikon EZ-C1 und NIH ImageJ bestimmt.

Der Prozess zur Vorbereitung der Sauerstoff-sensitiven Substrate erfolgt auf ähnliche Art und Weise für die ratiometrische Sauerstoffmessung (siehe **Kapitel 3.2.2**). Die Unterschiede liegen lediglich darin, dass die Sensorfolie direkt auf den Boden einer 96-Well Platte angebracht wurde. Außerdem wurde keine Calcein-AM Lösung zugegeben, sondern nur das Medium gewechselt.

4.3 Entwicklung numerischer Modelle mit COMSOL Multiphysics®

Die Entwicklung numerischer Modelle mit COMSOL Multiphysics® ist bei jeder Anwendung ähnlich und wird über den *model builder* gesteuert, welcher von der Erstellung der Geometrie bis zu den Ergebnissen der Simulation leitet. Die einzelnen Schritte, welche im Folgenden als „Knoten“ bezeichnet werden, sind dabei miteinander verbunden. Folglich handelt es sich um einen sukzessiven Arbeitsablauf, welcher schematisch in **Abbildung 24** zusammengefasst ist.

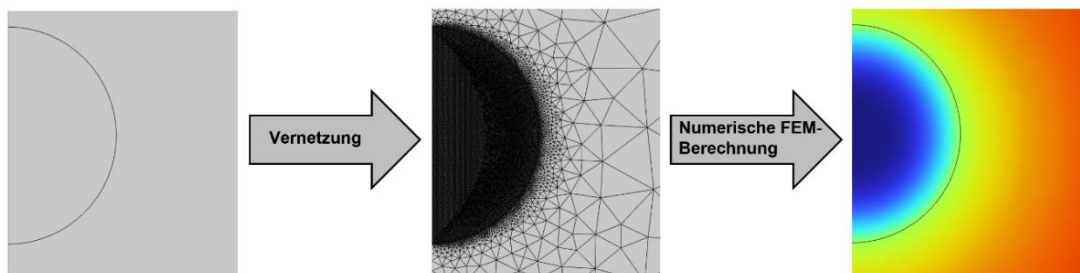


Abbildung 24: Schematischer Ablauf der Entwicklung eines numerischen Modells mit COMSOL Multiphysics®.

Der erste Schritt besteht in der Erstellung der Geometrie. Dabei wird zuerst die Raumdimension (0D, 1D, 2D, 2D-achsensymmetrisch oder 3D) bestimmt. Um die Rechenzeit zu verkürzen, wird die Geometrie vereinfacht, indem vorhandene Symmetrien genutzt werden. Anschließend folgt die mathematische Modellierung. Dabei werden Gleichungen, Parameter, Variablen und Randbedingungen den Gebieten sowie Rändern der Geometrie zugewiesen. Im zweiten Schritt erfolgt durch eine Vernetzung die Diskretisierung des geometrischen Objekts in eine Vielzahl von kleinen, endlichen Bereichen (finite Elemente). Je kleiner die Vernetzung ist, desto genauer ist die Lösung, aber umso größer ist die Berechnungszeit. Die Form der Elemente hängt von der Dimension der zugrundeliegenden Geometrie ab. Handelt es sich um ein zweidimensionales Modell, bilden diese Dreiecke oder Rechtecke, während die Elemente bei 3D Geometrien Tetraeder und Quader sind. Im letzten Schritt werden die numerischen FEM-Berechnungen mittels eines direkten oder iterativen Lösungsverfahrens durchgeführt. Die Ergebnisse können zuletzt auf individuelle Art und Weise ausgewertet und dargestellt werden. Um eine einheitliche

Darstellung von Simulations- und experimentellen Messergebnissen zu gewährleisten, wurden alle Daten aus COMSOL exportiert und mit dem wissenschaftlichen Analyse- und Darstellungsprogramm Origin2022 visualisiert.

Die Diffusionsprozesse und die Verbrauchskinetik von Sauerstoff wurden im Rahmen dieser Arbeit sowohl in 2D Gewebemodellen (*Zellmonolayer*) als auch in 3D Gewebemodellen (Sphäroide) untersucht. Es wurde die Sauerstoffverteilung in adhären Zellen sowie in Sphäroiden unterschiedlicher Morphologien (adhärent und in Suspension) auf permeablen und impermeablen Substraten simuliert. Der Aufbau der verschiedenen Modelle wird entsprechend des Ablaufes in **Abbildung 24** im Folgenden genauer erläutert.

4.3.1 Geometrische Modellierung

Die zu modellierenden Objekte können aufgrund der vorliegenden Symmetrien zu einer *2D-achsensymmetrischen* Geometrie entlang einer vertikalen z-Achse vereinfacht werden. Dies hat den Vorteil, dass die Rechenleistung verkürzt und der Speicherplatz minimiert wird. Ausgehend von *2D-achsensymmetrischen* Lösungen können anschließend im *Postprocessing* 3D Plots und Animationen generiert werden.

96-Well Platte

Entsprechend den zugrundeliegenden experimentellen Methoden wurden die Diffusion und der Verbrauch von Sauerstoff in Sphäroiden in Suspension (**Abbildung 25 A**), in adhären Sphäroiden (**Abbildung 25 B**) sowie in adhären Zellen im *Monolayer* (**Abbildung 25 C**) in einem Well einer 96-Well Platte modelliert und simuliert. Ein Well einer 96-Well Platte besitzt eine konische Form. Durch die Tatsache, dass das Well allerdings nicht bis zum Rand mit Flüssigkeit befüllt ist, kann diese Konizität vernachlässigt werden und es wurde in allen Fällen ein rechteckiges Well mit einem Durchmesser von 6,39 mm modelliert sowie einem Volumen an Medium von 200 μL .

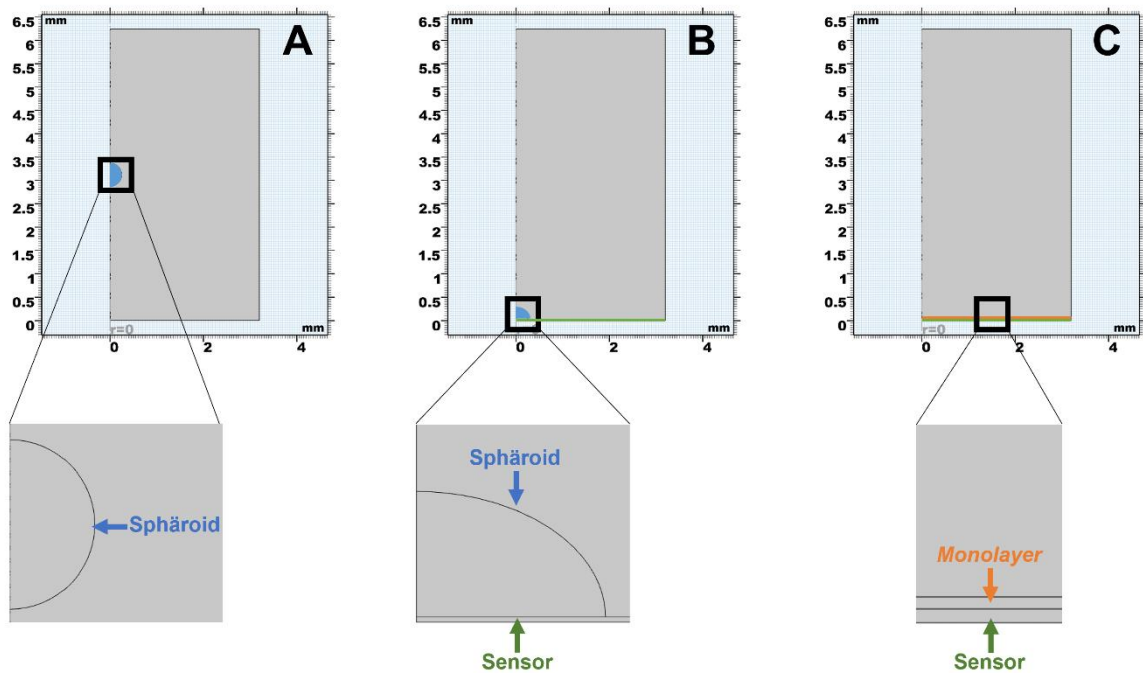


Abbildung 25: Geometrie von Gewebemodellen in einem Well einer 96-Well Platte in COMSOL. Die Geometrien sind *2D-achsensymmetrisch* entlang einer zentralen vertikalen Achse an der Position $r = 0$ mm. **(A)** zeigt die Geometrie eines Sphäroids in Suspension, **(B)** eines adhärenen Sphäroids auf einer Sauerstoff-sensitiven Sensorfolie und **(C)** adhärenen Zellen im *Monolayer*, ebenfalls direkt auf einer Sensorfolie.

Der Sphäroid in Suspension (**Abbildung 25 A**) befindet sich mittig im Well und es wurde eine sphärische Geometrie mit dem Radius r angenommen. Dieser Radius ist je nach Sphäroid unterschiedlich und kann experimentell durch die Aussaatdichte der Zellen kontrolliert werden. Es wurde angenommen, dass alle Zellen gleichmäßig innerhalb der Sphäre verteilt sind. **Abbildung 25 B** zeigt die ellipsoide Geometrie eines adhärenen Sphäroids mit spezifischer Höhe h und Radius r . Die genauen Werte sind Bestandteil der experimentellen Untersuchungen und werden in **Kapitel 6.1.2** beschrieben. Der Sphäroid befindet sich direkt auf einer Sauerstoff-sensitiven Sensorfolie mit einer durchschnittlichen Höhe von $7 \mu\text{m}$ (siehe **Kapitel 3.2.2**). Da die Isolationsschicht im Rahmen der Messungen entfernt wurde und die Trägerschicht nicht-permeabel für Sauerstoff ist, wurden diese im Rahmen der Modellierung ignoriert. Die geometrische Form der Sensorfolie wurde als Rechteck gewählt, da dieses in 3D einen Zylinder darstellt, welcher wiederum der realen Geometrie entspricht. Ähnliches gilt für die adhärenen Zellen im konfluenten *Monolayer*.

in **Abbildung 25 C**, welche ebenfalls direkt auf der 7 μm hohen Sensorfolie lokalisiert sind und für die eine Höhe von 5 μm angenommen wurde. Diese stimmt mit der, in der Literatur berichteten, durchschnittlichen Höhe einer Zelle von 4 – 7 μm überein (Bartolini et al., 2018; Lo et al., 1995; Parak et al., 1999). Eventuelle Höhenunterschiede der Zellen sowie die Zellzwischenräume wurden hier nicht berücksichtigt. Die Höhen und Radien der Gewebemodelle wurden in der Simulation als konstant angenommen, da die Diffusionszeit im Vergleich zur Dynamik des Zellzyklus (Proliferation) viel schneller ist (Bull et al., 2020).

Permeable Kultursubstrate

Der Einsatz von permeablen Kultursubstraten stellt eine beliebte *in vitro* Messmethode zur Untersuchung von Transportprozessen, der epithelialen Barrierefunktion oder der Blut-Hirn-Schranke dar (Hatherell et al., 2011; Henry-Vitrac et al., 2006; Hilgers et al., 1990; Urban, 2019; Xu et al., 2014). Zudem wären multiple Messmodi, wie beispielsweise die Untersuchung der Atmungsaktivität sowie des pH-Wertes von Gewebe, möglich. Permeable Kultursubstrate (siehe **Abbildung 26**) bestehen aus einem Kunststoffgerüst, für den Einbau in die Messkammern, und einer porösen Membran als Wachstumssubstrat für die Zellen. Der Membraneinsatz wird in die Messkammer gehängt und mit der Zellschicht als Diffusionsbarriere entstehen zwei unabhängige Bereiche, welche als apikales und basolaterales Kompartiment bezeichnet werden. Die Flüssigkeitssäulen beider Bereiche sind meist gleich hoch, sodass kein Fluss zwischen den Kompartimenten entsteht, welcher wiederum Einfluss auf das 2D Gewebe nehmen würde.

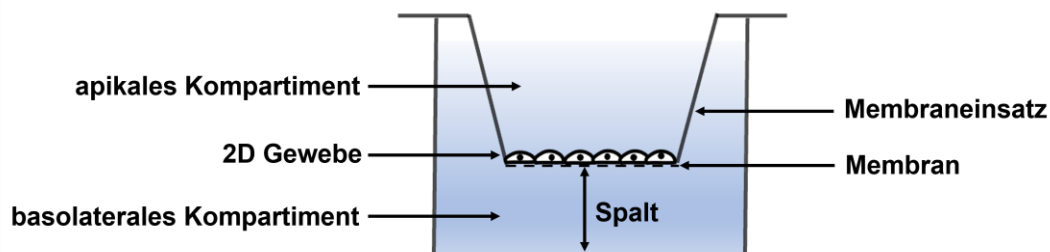


Abbildung 26: Schematische Skizze des Aufbaus eines Kultursubstrates mit permeabler Membran, auf welcher das Gewebe kultiviert wird. Durch die Funktion einer Diffusionsbarriere teilt das Gewebe das System in zwei unterschiedliche Kompartimente auf, ein basolaterales und ein apikales (modifiziert nach Hilgers et al., 1990).

Für die Simulation adhärenter Sphäroide und adhärenter Zellen im *Monolayer* auf permeablen Kultursubstraten wurden die Geometrien eines Wells handelsüblicher 24-Well Platten als Messkammer (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) und 24-Well Membraneinsätze (Transwell®-Membraneinsatz, Corning Inc., New York, USA oder cellQART®-Membraneinsatz, Sabeu GmbH & Co. KG, Northeim, Deutschland) angenommen (siehe **Abbildung 27**).

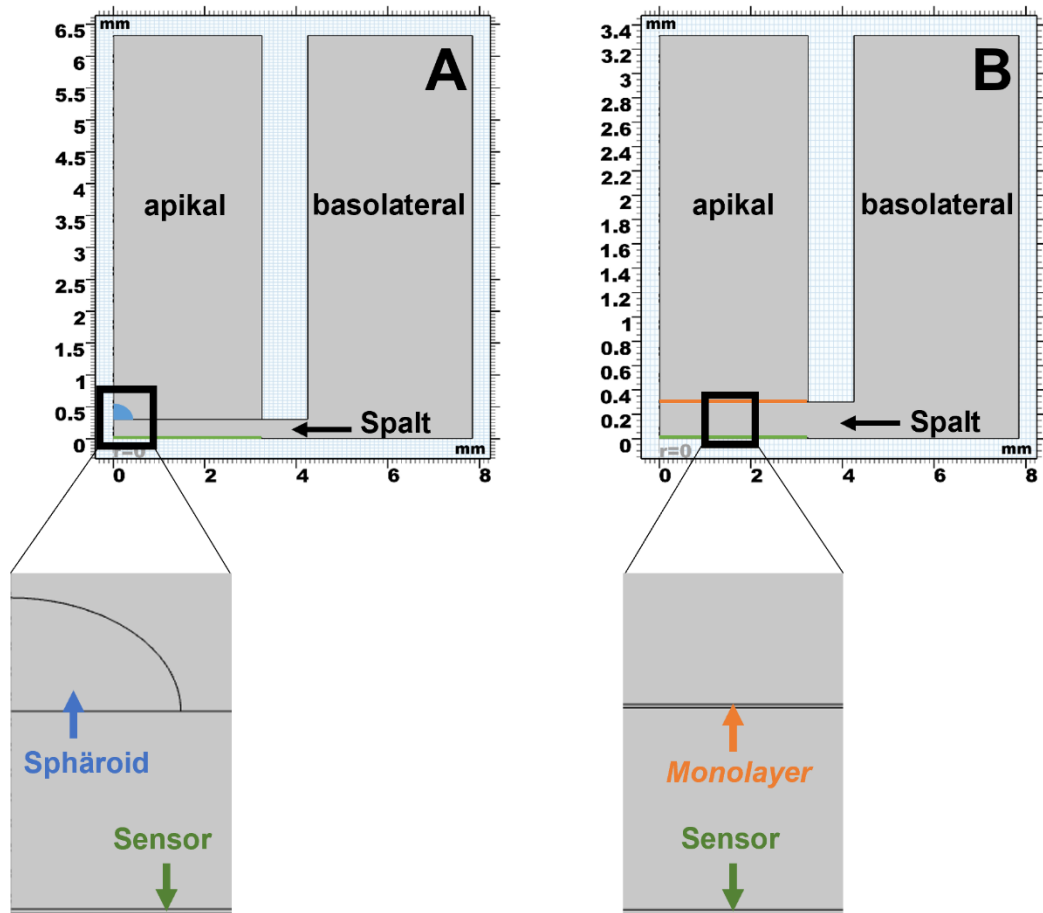


Abbildung 27: Geometrien von handelsüblichen 24-Well Platten mit permeablen Kultursubstraten. Auf der Membran ist (A) ein adhärenter Sphäroid und (B) ein *Monolayer* aus adhärenenten Zellen modelliert. Zwischen dem modellierten Gewebe und der Sauerstoff-sensitiven Sensorfolie befindet sich ein Spalt mit einer Höhe von 0 μm bis 1000 μm . Dieser resultiert aus der Position des Filters im Well.

Für ein Well einer 24-Well Platte wurde ein Durchmesser von 15,7 mm modelliert. Der Transwell®-Membraneinsatz von Corning besitzt einen Durchmesser von 6,5 mm, während der cellQART®-Membraneinsatz von Sabeu 6,4 mm misst. Unterschiede im strukturellen Design der Membraneinsätze beider Hersteller führen dazu, dass im Falle

der hängenden Variante des permeablen Kultursubstrates im Well, die Membran und somit die darauf kultivierten Zellen sowie Sphäroide bis zu einem Millimeter vom Boden und der darauf befindlichen Sensorfolie (Höhe: 7 μm) entfernt sind. Bei Corning ist der Abstand 300 μm , während Sabeu eine Membran-Boden Distanz von 1000 μm verzeichnet.

Die Flüssigkeitssäule im apikalen Kompartiment beträgt im Falle des adhärenen Sphäroids (**Abbildung 27 A**) 200 μL und bei den adhärenen Zellen im *Monolayer* (**Abbildung 27 B**) 100 μL . Diese Werte resultieren aus den experimentellen Untersuchungen von Tobias Naber. Um einen Fluss zwischen den Kompartimenten zu vermeiden, welcher experimentell das Gewebe beeinflussen würde, wurde in der Simulation die Höhe der Flüssigkeit im basolateralen Kompartiment aus der Summe der Höhe der Flüssigkeitssäule im apikalen Kompartiment und der Höhe des Spaltes zwischen Membran und Sensorfolie bestimmt.

Die Höhe der Zellen im *Monolayer* (**Abbildung 27 B**) wurde, wie im Falle des 96-Well Formats, mit 5 μm angenommen. Höhen und Radien der untersuchten Sphäroide (**Abbildung 27 A**) können Kapitel **Kapitel 6.1.2** entnommen werden.

Adhärenente Sphäroide auf permeablen Kultursubstraten (24-Well) wurden zusätzlich für ein Well einer 12-Well Platte simuliert (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland). Alle oben aufgeführten geometrischen Grundlagen und Annahmen stimmen, bis auf zwei Unterschiede, mit denjenigen eines Wells einer 24-Well Platte überein. Der Durchmesser eines Wells ist im Falle einer 12-Well Platte 22,2 mm. Durch die Tatsache, dass ein 24-Well Membraneinsatz verwendet wurde, wird dieser nicht in das Well gehängt, sondern steht im Well direkt auf der Sauerstoff-sensitiven Sensorfolie. Infolgedessen wurde für dieses geometrische Layout lediglich der Fall simuliert, dass keine Distanz zwischen Membran und Sensorfolie vorliegt.

4.3.2 Mathematische Modellierung

Unabhängig vom geometrischen System wurden für die Sauerstoffdiffusion und den Sauerstoffverbrauch im Gewebe Fick'sche Diffusionsprozesse und eine Reaktionskinetik nach Michaelis-Menten angenommen (siehe **Kapitel 3.3.2**).

Der Sauerstoffverbrauch wurde mittels eines Reaktionsknoten in das Modell implementiert. Es wurde angenommen, dass die maximale Sauerstoffverbrauchsrate R_{\max} im jeweiligen Gewebe konstant ist. Für 3D Zellaggregate (Sphäroide) wurde angenommen, dass diese komplett aus verbrauchenden Zellen (keine nekrotischen Bereiche) bestehen und die Zelldichte überall gleich ist. Somit tragen alle Zellen im gleichen Maße zur lokalen Sauerstoffverbrauchsrate R_{O_2} bei, welche entsprechend **Gleichung (18)** und **(19)** im Gegensatz zu R_{\max} von der lokalen Sauerstoffkonzentration c_{O_2} abhängt. Die genauen Werte für R_{\max} und R_{O_2} unterscheiden sich je nach Zelltyp und Zelldichte und wurden in dieser Arbeit durch eine systematische Parametervariation exemplarisch für die Zelllinien MCF-7 und U373 quantifiziert. Außerdem wurde für die Sauerstoffverteilung im 2D und 3D Gewebe **Gleichung (19)** im Rahmen der mathematischen Modellierung um eine zusätzliche Komponente erweitert, die kritische Sauerstoffkonzentration c_{krit} :

$$\frac{\partial c_{O_2}}{\partial t} = D_{\text{Gewebe}} \nabla^2 c_{O_2} - \frac{R_{\max} \cdot c_{O_2}}{c_{O_2} + K_{MM, O_2}} \cdot \text{step} \left(\frac{c_{O_2}}{c_{\text{krit}}} \right) \quad (20)$$

Diese wurde zum einen hinzugefügt, um negative Konzentrationen in der Simulation zu vermeiden. Zum anderen wurde durch diesen Faktor das Phänomen der Nekrose berücksichtigt. Die kritische Konzentration wurde mittels einer Stufenfunktion, welche die Standardoption für eine Heaviside-Funktion in COMSOL ist, in das Modell implementiert und unterbindet den Sauerstoffverbrauch in jenen Regionen des Gewebes, in welchen die Sauerstoffkonzentration unter den kritischen Wert von $c_{\text{krit}} = 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ fällt. Dieser Wert entspricht einem Sauerstoffpartialdruck von 0,07 mmHg und ist somit ähnlich zu dem Wert von 0,1 mmHg, welcher in der Literatur verwendet wird (Anundi & de Groot, 1989; Avgoustiniatos & Colton, 2006; Papas et al., 2005). Die Michaelis-Menten Konstante wurde mit einem Wert von $K_{MM, O_2} = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ angenommen und stimmt gut mit den in der Literatur angegebenen Werten überein (Avgoustiniatos & Colton, 2006; Casciari et al., 1992b; Papas et al., 2005; Shourabi et al., 2021).

Die Diffusion von Sauerstoff im Gewebe, in Medium und in der Sensorfolie wurde durch die jeweiligen Knoten „Transporteigenschaften“ modelliert. Für den Diffusionskoeffizienten im Gewebe wurde $D_{\text{Gewebe}} = 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ angenommen. Diese Konstante variiert je nach Gewebeart zwischen $0,6 - 2,5 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (Astolfi et al., 2016; Avgoustiniatos & Colton, 2006; Curcio et al., 2007; Grote et al., 1977; Leedale et al., 2019). Die Diffusion in Medium obliegt, wie in **Kapitel 3.3.2** beschrieben, lediglich Fick'schen Diffusionsprozessen. Als Diffusionskonstante wurde $D = 3,3 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ angenommen, wobei dieser Wert der Diffusion von Sauerstoff in Wasser entspricht (Chow et al., 2001; Schmittlein, 2017). Für die Diffusion von Sauerstoff in der $7 \mu\text{m}$ hohen Sensorfolie wurde ein Diffusionskoeffizient von Sauerstoff in Polystyrol mit einem Wert von $3,3 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ angenommen (Nowakowska et al., 1976; B. Wang & Ogilby, 1995). Allerdings handelt es sich hierbei lediglich um einen Näherungswert, da die genaue Zusammensetzung der Sensorfolie einem Betriebsgeheimnis unterliegt und nicht bekannt ist.

Aufgrund der Tatsache, dass die experimentellen Messungen in einem offenen System durchgeführt wurden, wurde angenommen, dass Sauerstoff dem System über die obere Grenzfläche zwischen Medium und Umgebungsluft zugeführt wird. Es wurde folgende Randbedingung an der Medium/Luft Grenzfläche angenommen:

$$c = c_{\text{O}_2} = 0,21 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \quad (21)$$

Der Parameter c_{O_2} symbolisiert die atmosphärische Sauerstoffkonzentration in einem normoxischen Inkubator ($\approx 21 \% \text{ O}_2$) bei einer Temperatur von 37°C und $0 \% \text{ CO}_2$ Gehalt. Der Wert wurde nach dem Gesetz von Henry berechnet, welches das Löslichkeitsverhalten von Gasen in einer Flüssigkeit beschreibt (Chow et al., 2001; Mattei et al., 2017; Sander, 2014):

$$c_{\text{O}_2} = K_{\text{H},\text{O}_2} \cdot p_{\text{O}_2} \quad (22)$$

mit der Konzentration von Sauerstoff in Wasser c_{O_2} , der Henry-Löslichkeitskonstante K_{H,O_2} von Sauerstoff in Wasser bei 37°C ($1,42 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-3} \cdot \text{mmHg}^{-1}$) und dem

Sauerstoffpartialdruck pO_2 in der Gasphase unter Gleichgewichtsbedingungen bei 100 % Luftfeuchtigkeit im Inkubator (149 torr).

Durch die Tatsache, dass die Wasseroberfläche nach dem Gesetz von Henry mit dem Sauerstoff der Umgebungsluft im Gleichgewicht steht, entspricht die Randbedingung einer Art unendlichen und schnellen Reservoirs, welches die Konzentration an der Grenzfläche stets konstant hält.

An allen anderen Rändern des Wells wurde kein Fluss angenommen mit der zugrundeliegenden Gleichung:

$$\nabla c \cdot \mathbf{n} = 0 \quad (23)$$

mit dem nach außen-gerichteten Normalenvektor \mathbf{n} der Länge 1.

Für die Modelle unter Verwendung der permeablen Kultursubstrate wurde die Membran als „dünne Diffusionsbarriere“ mit einer gewissen Schichtdicke s und einem effektiven Diffusionskoeffizienten D_{Membran} von Sauerstoff durch die Poren der Membran modelliert. Da die Membranen näherungsweise parallele zylindrische Poren besitzen, wurde der tangentielle Fluss vernachlässigt und der effektive Diffusionskoeffizient durch den Flächenanteil der Poren gemäß **Gleichung (24)** und **(25)** berechnet:

$$D_{\text{Membran}}(O_2) = \varepsilon \cdot D_{\text{Medium}}(O_2) \quad (24)$$

$$\varepsilon = \text{Porendichte} \cdot \text{Porendurchmesser}^2 \cdot \frac{\pi}{4} \quad (25)$$

Die Porendichte und der Porendurchmesser (Porengröße), welche zur Porosität (ε) beitragen, sowie die Schichtdicken und effektiven Diffusionskoeffizienten der Membranen sind je nach Hersteller **Tabelle 5** oder **Tabelle 6** zu entnehmen.

Tabelle 5: Zusammenfassende Darstellung der Eigenschaften von Membraneinsätzen des Herstellers Corning Inc. (New York, USA). Polycarbonat wird mit PC abgekürzt und Polyethylenterephthalat mit PET.

Transwell®-Membraneinsatz (Corning)

Membran -dicke s / μm	Material	Porengröße / μm	Porendichte / Poren·cm ⁻²	Porosität ε	Effektiver Diffusionskoeffizient (O ₂) $D_{\text{Membran}} / \text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$
10	PC	0,4	$1\cdot 10^8$	0,126	$4,2\cdot 10^{-10}$
10	PET	0,4	$4\cdot 10^6$	0,005	$1,7\cdot 10^{-11}$
10	PET	1,0	$1,6\cdot 10^6$	0,013	$4,2\cdot 10^{-11}$
10	PC / PET	3,0	$2\cdot 10^6$	0,141	$4,7\cdot 10^{-10}$
10	PC	5,0	$4\cdot 10^5$	0,078	$2,6\cdot 10^{-10}$
10	PC / PET	8,0	$1\cdot 10^5$	0,05	$1,7\cdot 10^{-10}$

Tabelle 6: Zusammenfassende Darstellung der Eigenschaften von Membraneinsätzen des Herstellers Sabeu GmbH & Co. KG (Northeim, Deutschland). Polycarbonat wird mit PC abgekürzt und Polyethylenterephthalat mit PET.

cellQART®-Membraneinsatz (Sabeu)

Membran- dicke s / μm	Material	Porengröße / μm	Porendichte / Poren·cm ⁻²	Porosität ε	Effektiver Diffusionskoeffizient (O ₂) $D_{\text{Membran}} / \text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$
11,5	PET	0,4	$1\cdot 10^8$	0,126	$4,2\cdot 10^{-10}$
11,5	PET	0,4	$2\cdot 10^6$	0,003	$8,3\cdot 10^{-12}$
11	PET	1,0	$2\cdot 10^6$	0,016	$5,2\cdot 10^{-11}$
12	PET	3,0	$0,6\cdot 10^6$	0,042	$1,4\cdot 10^{-10}$
9	PET	3,0	$2\cdot 10^6$	0,141	$4,7\cdot 10^{-10}$
10,5	PET	5,0	$0,6\cdot 10^6$	0,118	$3,9\cdot 10^{-10}$
12,5	PET	8,0	$0,2\cdot 10^6$	0,101	$3,3\cdot 10^{-10}$
12,5	PET	8,0	$0,1\cdot 10^6$	0,05	$1,7\cdot 10^{-10}$

4.3.3 Deformierte Geometrie

Die Einflüsse der sechstägigen Kulturzeit auf die Sauerstoffverteilung in den Sphäroiden wurde in COMSOL mit dem *Knoten* „Deformierte Geometrie“ modelliert. Dies wurde zusätzlich zu den in **Kapitel 4.3.1** und **4.3.2** aufgeführten Modellierungsgrundlagen für Sphäroide in Suspension simuliert. Die einzelnen Schritte sind in **Abbildung 28** gezeigt.

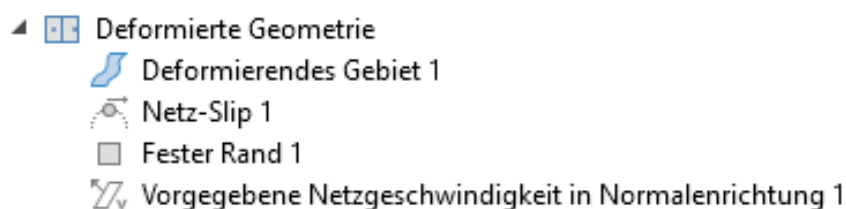


Abbildung 28: Schritte zum Modellieren einer deformierten Geometrie in COMSOL. Dieses Feature wurde verwendet, um das Wachstum von Sphäroiden unterschiedlicher Zellzahl über den Zeitraum von sechs Tagen zu simulieren.

Als deformierendes Gebiet wurde aus numerischen Gründen sowohl der Sphäroid als auch das Well ausgewählt. Trotz der Tatsache, dass sich nur die Form des 3D Gewebes verändert, müssen alle an den deformierten Rand (Sphäroidrand) angrenzende Gebiete mit in die Deformation aufgenommen werden. Dies verhindert eine eventuelle Überlagerung von Gebieten in einem Modell (Sphäroid und Well) und gewährleistet, dass diese stets nebeneinander vorliegen und über einen Rand miteinander verbunden sind. Demnach folgt auf ein Wachsen des Sphäroids ein entsprechendes Schrumpfen des Wells. Der *Knoten* „Netz-Slip 1“ definiert die Bedingung auf der Symmetrieachse und gibt vor, dass sich das Netz nur in der aktuellen tangentialen Richtung bewegen kann. Durch den *Knoten* „Fester Rand 1“ auf den Rändern des Wells wird gewährleistet, dass sich diese nicht bewegen und ihre Form beibehalten. Der *Knoten*, welcher die tatsächliche Deformation des Sphäroids definiert, ist „Vorgegebene Netzgeschwindigkeit in Normalenrichtung 1“, wobei die Netzgeschwindigkeit in Normalenrichtung die Wachstumsrate des Sphäroids wiedergibt. Diese wiederum resultiert aus den Fitfunktionen, welche das experimentelle Wachstumsverhalten der jeweiligen Sphäroide beschreiben (siehe **Kapitel 6.1.1** und **Kapitel 6.2.5**) Die relevanten Parameter der Fitfunktion wurden anschließend mittels einer analytischen Funktion oder eines konkreten Wertes eingepflegt.

4.3.4 Zusammenfassung der modelltechnischen Annahmen

Alle Annahmen, welche im Rahmen der geometrischen und mathematischen Modellierung gemacht wurden, sind im Folgenden nochmal zusammengefasst:

- (A) Der konische Charakter der Wells wurde vernachlässigt, da diese nie bis zum Rand mit dem maximalen Volumen befüllt wurden. Somit entspricht die Höhe der Wells der Höhe der darin befindlichen Flüssigkeitssäule.
- (B) Die Höhe der adhärennten Zellen im konfluenten *Monolayer* wurde gleichmäßig mit 5 μm angenommen. Höhenunterschiede einzelner Zellen sowie Zellzwischenräume wurden vernachlässigt.
- (C) Da sowohl die Diffusionszeit als auch die Sauerstoffverbrauchsrate schneller sind als Proliferationsprozesse, wurde, mit Ausnahme des Modells der

deformierten Geometrie, angenommen, dass Radius und Höhe des Gewebes konstant sind.

- (D) Das zugrundeliegende offene experimentelle System wurde mittels einer Konzentrationsrandbedingung modelliert. Demnach wurde eine konstante Sauerstoffzufuhr von $0,21 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ an der Luft/Medium Grenzfläche angenommen.
- (E) Die Sauerstoffverteilung im Gewebe wurde lediglich unter Annahme von Diffusions- und Veratmungsprozessen modelliert.
- (F) In weiteren Gebieten des Modells wurde die Diffusion als einzig vorherrschender Transportprozess angenommen.
- (G) Die Werte der Diffusionskoeffizienten sind konstant.
- (H) Der lokale Sauerstoffverbrauch R_{O_2} ist in nichtlinearer Weise von der lokalen Sauerstoffkonzentration abhängig.
- (I) Da die lokale Sauerstoffverbrauchsrate R_{O_2} bei höheren Sauerstoffkonzentrationen gesättigt ist, wurde der Wert der maximalen Sauerstoffverbrauchsrate R_{\max} als konstant angenommen.
- (J) Das komplette Gewebe besteht aus Zellen, welche gleichmäßig verteilt sind. Somit wurde angenommen, dass alle Zellen in gleicher Weise zur Bestimmung der lokalen Sauerstoffverbrauchsrate beitragen.
- (K) Das Phänomen der Nekrose wurde durch eine Stufenfunktion modelliert. Durch diese wurde angenommen, dass in allen Bereichen des Gewebes, in welchen die Sauerstoffkonzentration unterhalb eines kritischen Wertes liegt, der Sauerstoffverbrauch gestoppt wird.

4.3.5 Modelldiskretisierung und numerische Berechnung

Die Vernetzung des Modells bildet den abschließenden Schritt der Modellaufbereitung und ermöglicht dessen Diskretisierung in einzelne Elemente und deren anschließende numerische Berechnung. Netzelemente oder finite Elemente sind kleine Einheiten mit einfachen Formen. Bei 2D Modellen werden sie als Dreiecke und Rechtecke dargestellt, während sie in 3D die Form von Tetraedern und Quadern annehmen. Da es sich bei den vorliegenden Modellen um *2D-achsensymmetrische* Geometrien handelt, wurden diese durch Dreiecke als Netzelemente vernetzt. Die vordefinierten

Netzelementgrößen gehen dabei von „extrem fein“ zu „extrem grob“. Je feiner die Vernetzung ist, desto besser ist die Auflösung. Allerdings bringt dies auch eine Zunahme der Rechenzeit und des Speicherbedarfs mit sich. Somit wurde in den vorliegenden Modellen darauf geachtet, dass lediglich das Gewebe und die Sensorfolie als Hauptinteressensgebiete so fein wie möglich vernetzt wurden. Die übrigen geometrischen Gebiete wurden durch grobe Netzelementgrößen diskretisiert. Ein Beispiel ist in **Abbildung 29** gezeigt. Im Falle der Gewebemodelle in einem Well einer 96-Well Platte (**A**) sowie für die Geometrie mit permeablen Kultursubstraten (**B**) wurden die Sensorfolie und das jeweilige Gewebe (Sphäroid oder *Monolayer*) mit einer extrem feinen Netzelementgröße modelliert. Die übrigen Objekte der zugrundeliegenden Geometrie wurden mit groben Netzelementen vernetzt.

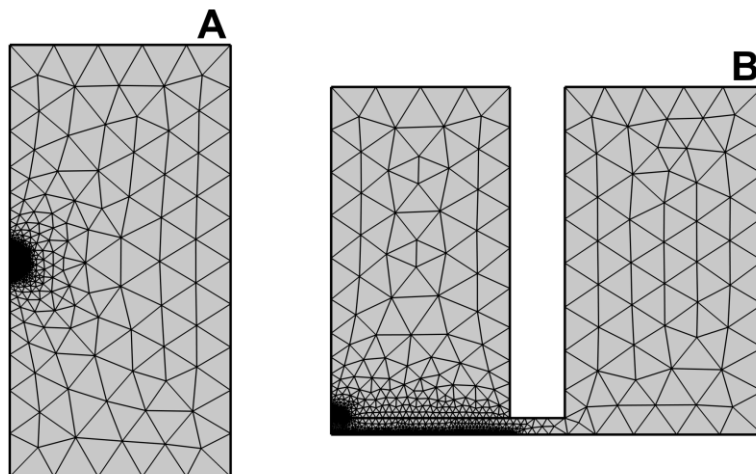


Abbildung 29: Beispielhafte Vernetzung der Modelle in COMSOL. **(A)** zeigt die Diskretisierung der Geometrie des Sphäroids in Suspension, während in **(B)** die finiten Elemente der Systeme mit permeablen Kultursubstraten gezeigt sind. Die Gebiete, worauf das Hauptaugenmerk der Untersuchung liegt, sind mit sehr feinen Netzelementgrößen modelliert, während die übrigen Geometrien mit der vordefinierten Netzelementgröße grob vernetzt sind.

Nach der Vernetzung des Modells wurde dieses, basierend auf dessen Diskretisierung, numerisch berechnet. Dabei wird das nichtlineare Gleichungssystem in ein lineares System überführt (siehe **Kapitel 3.3.1**). In allen Fällen erfolgte dies im Rahmen einer zeitabhängigen Studie mit variierenden Ausgabezeiten. Diese reicht, mit Ausnahme der Wachstumsstudien, von null bis maximal 24 Stunden. Im Falle der

Modelle mit deformierter Geometrie wurden die Zeiten über einen Zeitraum von bis zu sechs Tagen ausgegeben, da dies dem experimentell untersuchten Zeitrahmen entspricht. Außerdem wurden innerhalb dieses Modellierungsschrittes parametrische *Sweeps* genutzt, um die Lösung für variierende Parameter zu finden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde größtenteils ein *Sweep* über die maximale Sauerstoffverbrauchsrate durchgeführt, welche über die Michaelis-Menten Reaktionskinetik Rückschlüsse auf die lokale Verbrauchsrate zulässt.

4.3.6 Aufbereitung der Simulationsergebnisse

Die Aufbereitung der Ergebnisse (*Postprocessing*) bildet den letzten Schritt der numerischen Simulation. Hier wurden die berechneten Ergebnisse graphisch oder durch Animationen dargestellt. Die Daten der raum- oder zeitabhängigen Sauerstoffkonzentrationen sowie Sauerstoffverbrauchsraten wurden exportiert und mit Origin2022 visualisiert, um eine einheitliche Darstellung (gleiche Einheiten) und somit eine bessere Vergleichbarkeit von Simulations- und experimentellen Messergebnissen zu gewährleisten. Für die Erstellung der Plots in COMSOL wird ein zugrundeliegender Datensatz aus *Schnittlinien* oder *Schnittpunkten* benötigt. *Schnittpunkte* wurden bei Systemen mit adhären Zellen im *Monolayer* verwendet, um zeitabhängige Plots, welche an eben diesen Datenpunkten ausgelesen wurden, zu erstellen. Bei den Modellen mit 3D Zellaggregaten wurden *Schnittlinien* zur Erstellung von raumabhängigen Diagrammen entlang einer Querschnittslinie durch die 2D Geometrie verwendet. Bei den Modellen im 96-Well Format wurde für die Visualisierung der raum- und zeitabhängigen Sauerstoffkonzentration ein entsprechender Datensatz generiert. Dieser wurde 5 μm unter der Gewebeoberfläche in der Sensorfolie lokalisiert (siehe **Abbildung 30 A** und **B**). Dies ermöglicht den direkten Vergleich der simulierten Sensorantwort mit der experimentellen. Bei dem Sphäroid in Suspension wurde eine radiale *2D Schnittlinie* auf Höhe des halben Durchmessers gelegt (**C**). Dies ermöglicht eine Gegenüberstellung der Konzentrationsprofile adhärenter und suspendierter Sphäroide.

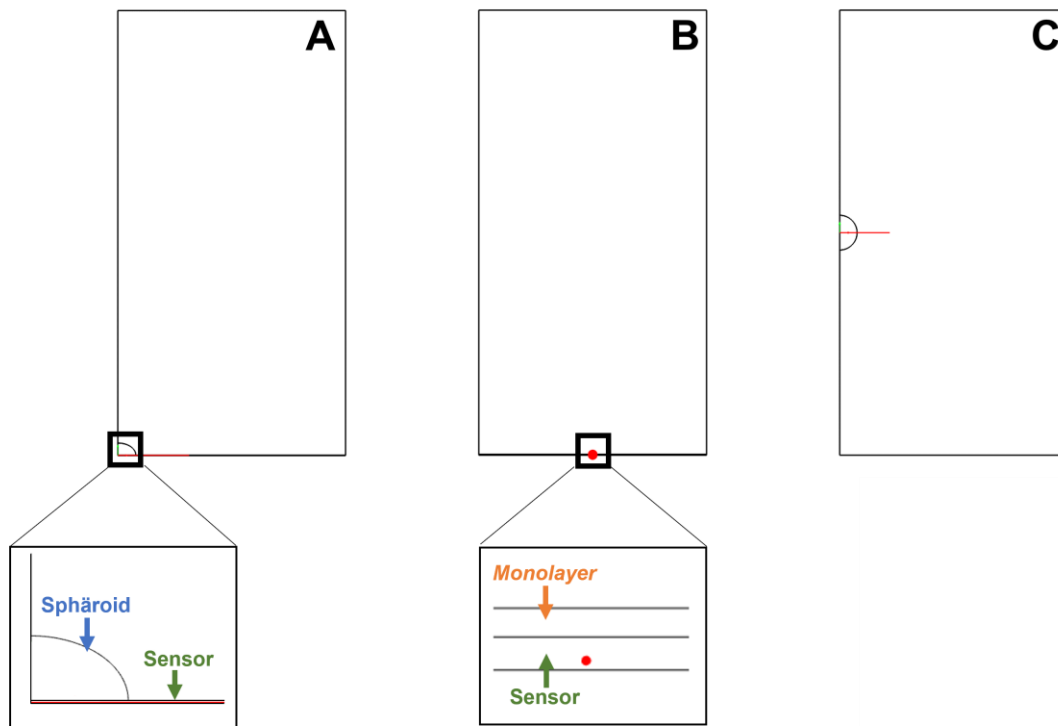


Abbildung 30: *Postprocessing* von Gewebemodellen im 96-Well Format. (A) Die raumabhängige Sauerstoffkonzentration in einem adhärenen Sphäroid wurde durch eine *1D-Plotgruppe* mit einer *2D Schnittlinie* (—) als Datensatz visualisiert. (B) Die zeitabhängige Sauerstoffkonzentration in adhärenen Zellen im *Monolayer* wurde durch einen *Schnittpunkt* (•) als Datensatz generiert. In beiden Fällen befindet sich der Datensatz 5 µm unter der Gewebeoberfläche in der Sensorfolie, um die Ergebnisse mit der experimentell bestimmten Sensorantwort vergleichen zu können. (C) Bei den Sphäroiden in Suspension wurde die *1D-Plotgruppe* anhand einer radialen *2D Schnittlinie* (—) auf Höhe des halben Durchmessers generiert

Ein analoges Verfahren wurde für die Auswertung der orts- und zeitaufgelösten Sauerstoffverteilung im Gewebe, welche mittels permeabler Kultursubstrate untersucht wurde, durchgeführt. Der einzige Unterschied besteht darin, dass ein entsprechender Datensatz (*Schnittlinie* oder *Schnittpunkt*) sowohl im Gewebe selbst als auch in der Sensorfolie generiert wurde. Durch dieses Vorgehen wurde der Einfluss der Membran als Diffusionsbarriere sowie die Auswirkungen des Spaltes zwischen Membran und Sensor analysiert.

Für die Analyse der orts- und zeitabhängigen Veränderung der lokalen Sauerstoffverbrauchsrate wurde der Datensatz der *1D-Plotgruppe* in allen Fällen im Gewebe generiert, da nur dort die Verbrauchskinetik mathematisch modelliert wurde.

Animationen und 3D Plots wurden durch einen *Rotations-Datensatz* generiert. Dieser Datensatz wiederum ist das Resultat der *2D-achsensymmetrischen* Raumdimension des Modells und der 3D Plot ist in **Abbildung 31** exemplarisch für die Sauerstoffverteilung im Fall eines Sphäroids in Suspension dargestellt.

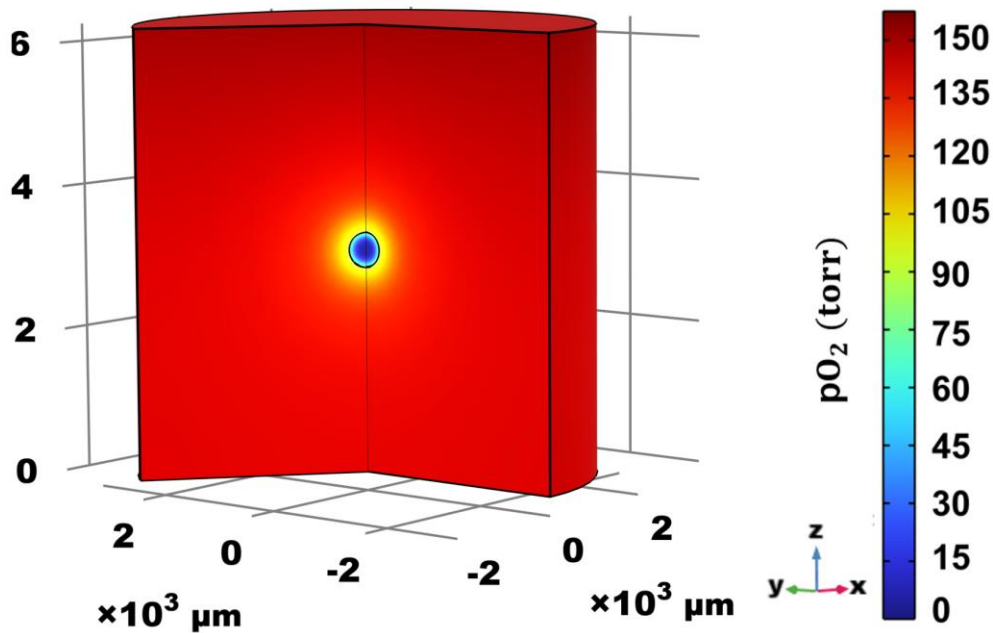


Abbildung 31: 3D Simulationsplot der Sauerstoffverteilung in einem Sphäroid, lokalisiert in der Mitte eines Wells, resultierend aus einem *2D-achsensymmetrischen* Modell.

Mathematische Funktionen, wie Integrale, wurden verwendet, um die Ergebnisse zu analysieren und mit Literaturdaten zu vergleichen. Mittels einer Oberflächenintegration über den Ausdruck der Michaelis-Menten Verbrauchskinetik in **Gleichung (20)** im jeweiligen Gebiet (*Monolayer* oder Sphäroid) wurde die globale Verbrauchsrate R_{global} in $\text{pmol}\cdot\text{s}^{-1}$ bestimmt. Die Division des ermittelten Wertes durch die jeweilige Zellzahl lassen Rückschlüsse auf die Verbrauchsrate pro Zelle zu.

5 Untersuchung adhärenter Zellen im *Monolayer*

Molekularer Sauerstoff ist essenziell und notwendig für alle aeroben Lebensformen (Wolfbeis, 2015). Im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung erhalten die Zellen, durch Reoxidation der Coenzyme NADH/H⁺ und FADH₂ mit Sauerstoff, Energie in Form von ATP (Löffler, 2003). Eine verminderte Sauerstoffversorgung von verschiedenen Regionen im Gewebe führt zu einer Vielzahl von pathologischen Zuständen (Roussakis et al., 2015). Daher ist es von enormer Bedeutung, die Sauerstoffkonzentration in zellulären Systemen zu untersuchen. Planare Sauerstoffsensitive Sensorfolien stellen eine experimentelle Möglichkeit dar, um den Sauerstoffpartialdruck als Folge der Atmungsaktivität direkt unter der Zellschicht nicht-invasiv nachzuweisen (Pütz, 2021; Schmittlein, 2017). Die Komplexität des biologischen Systems erschwert allerdings eine ganzheitliche Analyse des Systems *in vitro*, was zudem kostspielig und zeitaufwendig wäre. *In silico* Ansätze stellen eine sinnvolle Ergänzung dar, da es, durch eine systematische Variation der Parameter, nicht nur möglich ist, Kosten und Zeit zu sparen, sondern auch *in vitro* Studien zu optimieren oder neue Hypothesen zu generieren (Loessner et al., 2013; Malandrino et al., 2018).

Das Ziel des Projekts war es, ein Simulationsmodell zu entwickeln, mit welchem der Sauerstoffverbrauch von adhären U373 Zellen im *Monolayer* quantifiziert werden kann. Die Verlässlichkeit des Modells wurde mit Experimenten, welche von Tobias Naber durchgeführt wurden, evaluiert und verifiziert. Bei eben diesen wurde, durch das 2D Messsystems VisiSens TD in Kombination mit planaren Sauerstoff-sensitiven Sensorfolien (SF-RPSu4, beides von PreSens Precision Sensing GmbH), die Sauerstoffkonzentration direkt unter einer adhären Zellschicht gemessen (siehe **Abbildung 32 A**). Davon ausgehend wurde der Sauerstoffverbrauch *in silico*, unabhängig von einem bestimmten Zelltyp, für verschiedene Parameter untersucht, wie die Auswirkungen von offenen und geschlossenen Systemen, des Multiwellformats und der Höhe der Flüssigkeitssäulen.

Darüber hinaus wurden Vorhersagen für Systeme mit permeablen Membraneinsätzen getroffen (siehe **Abbildung 32 B**). Diese besitzen viele Vorteile physiologischer und

experimenteller Natur und stellen eine beliebte Messmethode dar, um Transportprozesse zu untersuchen (Henry-Vitrac et al., 2006; Hilgers et al., 1990; Xu et al., 2014).

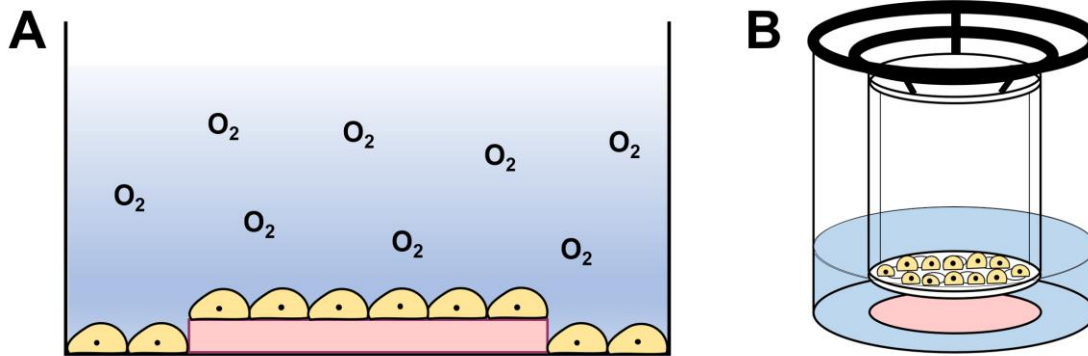


Abbildung 32: Schematische Darstellung von zwei *in vitro* Assays zur Untersuchung der Sauerstoffverteilung unter adhärenenten Zellen im *Monolayer*. Die Zellen adhären in (A) direkt auf der Sauerstoff-sensitiven Sensorfolie und in (B) auf der Membran eines permeablen Kultursubstrates. Die Sensorfolie ist dabei direkt unterhalb des Einsatzes am Boden des Wells fixiert.

Dazu wurde ein *Monolayer* aus adhärenenten U373 Zellen direkt auf einer porösen Filtermembran modelliert. Das Ziel war, die Verlässlichkeit des experimentellen Ansatzes für die Sauerstoffmessung zu prüfen, bei welchem die mit Zellen bedeckte Membran direkt über einer Sensorfolie hängt. In diesem Rahmen wurden weitere Faktoren, wie die Porosität und Eigenschaften verschiedener permeabler Kultursubstraten, deren Einfluss als Diffusionsbarriere, die Distanz zwischen Zellen und Sensor sowie die Höhe der Flüssigkeitssäule im apikalen Kompartiment untersucht.

Zuletzt wurde das Proliferationsverhalten von MCF-7 Zellen mit zwei verschiedenen experimentellen Methoden, impedimetrisch sowie fluoreszenzbasiert, analysiert, um im Laufe der Arbeit einen Zusammenhang zwischen der Verdopplungszeit in 2D und 3D (siehe **Kapitel 6.1.1**) herstellen zu können.

In den folgenden Kapiteln wurden alle *in vitro* Ergebnisse auf signifikante Stellen gerundet. Bei den *in silico* Daten hingegen wurde eine andere Rundungsmethode verwendet, da sonst marginale Unterschiede nicht sichtbar gemacht hätten werden

können. So wurden diese einheitlich auf maximal zwei Nachkommastellen gerundet, wobei die Rundungsstelle je nach Wert der nachfolgenden Stelle auf- (Wert der Folgestelle: ≥ 5) beziehungsweise abgerundet (Wert der Folgestelle: < 5) wurde. Bei der Darstellung der Eingangsvariablen in COMSOL wurde stets die komplette Zahl mit allen Nachkommastellen genannt, da dies essenziell für reproduzierbare Simulationsergebnisse ist.

5.1 Sauerstoffverteilung in Zellen auf Sauerstoff-sensitiven Sensorfolien

Sowohl die Experimente als auch der Großteil der darauf basierenden Simulationen dieses Abschnittes wurden in einer 96-Well Platte durchgeführt. Die für die *in silico* Modellierung nötigen Abmessungen eines Wells einer 96-Well Platte mit einem Volumen von 200 μL an Medium sind **Kapitel 4.3.1** zu entnehmen. Die Sauerstoff-sensitive Sensorfolie befindet sich *in vitro* und *in silico* auf dem Boden des Wells und wurde mit einer Höhe von 7 μm modelliert. Wie in **Kapitel 3.2.2** beschrieben, handelt es sich dabei lediglich um die durchschnittliche Höhe der Sauerstoff-sensitiven Sensorschicht, da die Isolationsschicht für eine verbesserte Adhäsion der Zellen vor der Durchführung des Experiments entfernt wurde und die Trägerschicht nicht-permeabel für Sauerstoff ist. Die Grundlagen der mathematischen Modellierung sowie zugrundeliegende Parameter, wie Diffusionskoeffizienten, sind in **Kapitel 4.3.2** ausführlich erläutert. Bei der Diffusion handelt es sich um den einzig vorherrschenden Transportprozess, welcher im Modell betrachtet wurde, und die Werte der jeweiligen Koeffizienten wurden als konstant angenommen. Ebenso wurde der Radius des konfluenten *Monolayers* als konstant angesehen, da der Massentransport im Untersuchungszeitraum schneller verläuft als die Zellproliferation. Somit bleiben auf Basis der getroffenen Annahmen, neben der Höhe h des konfluenten *Monolayers*, die maximale Sauerstoffverbrauchsrate R_{max} sowie die globale Sauerstoffverbrauchsrate R_{global} die einzigen veränderbaren Variablen. Die Einheiten der Sauerstoffverbrauchsrate wurden für R_{max} in den COMSOL Standardeinheiten $\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$ und für R_{global} in $\text{pmol}\cdot\text{s}^{-1}$ angegeben. Eine detailliertere Aufführung der modelltechnischen Annahmen ist in **Kapitel 4.3.4** zu finden.

5.1.1 Experiment und Simulation adhärenter U373 Zellen im *Monolayer*

Zur Untersuchung der Atmungsaktivität adhärenter U373 Zellen im konfluenten *Monolayer* wurden je 200 μL einer Zellsuspension mit einer Zelldichte von $110\text{k Zellen}\cdot\text{cm}^{-2}$ auf Sauerstoff-sensitiven Sensorfolien ausgesät. Die Sauerstoffverteilung wurde über einen Zeitraum von 24 Stunden am VisiSens TD in 200 μL L-15 Medium in einem offenen System überwacht (37 °C und 0 % CO_2). Das

in silico Modell wurde durch eine kombinierte Variation der Parameter der maximalen Sauerstoffverbrauchsrate R_{\max} und der Höhe h des *Monolayers* an die experimentellen Ergebnisse angepasst. Die Anpassung erfolgte dabei nach Augenscheinvalidität, da im Rahmen der durchgeführten *in silico* Modellierung keine Optimierungsalgorithmen verfügbar sind. Die resultierenden Wertepaare für eine Übereinstimmung aus Experiment und Simulation sind in **Tabelle 7** aufgeführt. Der Graph in **Abbildung 33** zeigt die konform einhergehende Abnahme des Sauerstoffpartialdruckes pO_2 als Funktion der Zeit für konfluente U373 Zellen im *Monolayer* des *in vitro* und *in silico* Modells in Abhängigkeit von R_{\max} und h .

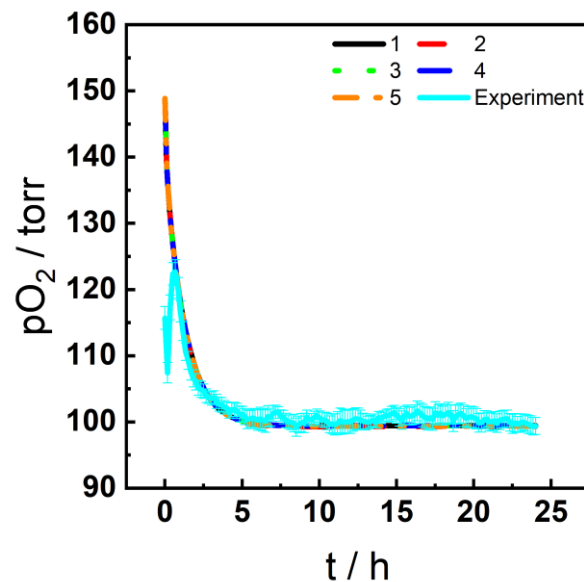


Abbildung 33: Darstellung des Sauerstoffpartialdruckes unter einem konfluenten U373 *Monolayer* in Abhängigkeit von der Zeit t . Die Sauerstoffmessungen wurden *in vitro* (—, MW \pm SEM; $n = 12$) und *in silico* in einem offenen System durchgeführt. Durch einen kombinierten Parametersweep über die Höhe sowie die maximale Sauerstoffverbrauchsrate R_{\max} des *Monolayers* wurde die Übereinstimmung zwischen Experiment und Simulation gezeigt (—: $h = 2 \mu\text{m}$, $R_{\max} = 1,9 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$; —: $h = 3 \mu\text{m}$, $R_{\max} = 1,27 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$; —: $h = 4 \mu\text{m}$, $R_{\max} = 0,95 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$; —: $h = 5 \mu\text{m}$, $R_{\max} = 0,76 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$; —: $h = 6 \mu\text{m}$, $R_{\max} = 0,63 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$). $T = 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Der Sauerstoffpartialdruck unter der Zellschicht nimmt im ratiometrischen Setup der Messung zunächst zwischen 0 und 30 min von $(115,7 \pm 1,8)$ torr auf $(122,3 \pm 1,8)$ torr zu. Anschließend fällt dieser, bis nach ungefähr 5 h ein Gleichgewichtszustand mit einem konstanten Wert von ungefähr $(99,8 \pm 1,4)$ torr erreicht wird. In der Simulation stimmt der Kurvenverlauf für jedes der kombinierten Parameterpaare R_{\max} und h aus

Tabelle 7 überein. Der pO_2 sinkt hier kontinuierlich von einem Ausgangswert von 149 torr auf einen stabilen Endwert von 99,4 torr nach circa 7,7 h.

Tabelle 7: Ergebnisse der kombinierten Variation der Parameter h und R_{\max} der adhärenen U373 Zellen im *Monolayer* bei einer Übereinstimmung der Daten aus der *in vitro* und *in silico* Analyse. Die Wertepaare sind jeweils in der gleichen Farbe dargestellt wie die zugehörigen Kurven des pO_2 in **Abbildung 33**.

Höhe h / μm	Maximale Sauerstoffverbrauchsrate R_{\max} / $mol \cdot m^{-3} \cdot s^{-1}$
2	$1,9 \cdot 10^{-2}$
3	$1,27 \cdot 10^{-2}$
4	$0,95 \cdot 10^{-2}$
5	$0,76 \cdot 10^{-2}$
6	$0,63 \cdot 10^{-2}$

Die Ergebnisse der *in silico* Modellierung aus **Abbildung 33** und **Tabelle 7** zeigen zum einen, dass die zeitabhängige Änderung des Sauerstoffpartialdruckes unterhalb der Zellschicht für jedes Parameterpaar (h und R_{\max}) beinahe identisch zu demjenigen des Experiments ist. Zum anderen wird ersichtlich, dass mit zunehmender Höhe der Zellschicht die maximale volumenbezogene Sauerstoffverbrauchsrate abnimmt. Aus einer Integration über die jeweilige Oberfläche des modellierten *Monolayers* resultiert eine einheitliche globale Verbrauchsrate von $1,19 \text{ pmol} \cdot s^{-1}$ für die kombinierten Wertepaare aus R_{\max} und h . Wird dieser Wert durch die Zellzahl geteilt, welche als konstant angenommen wurde, ergibt sich eine zelluläre Sauerstoffverbrauchsrate pro Zelle von $32 \text{ amol} \cdot s^{-1} \cdot \text{Zelle}^{-1}$. Infolgedessen wird ersichtlich, dass sich die Höhen und somit die volumenbezogenen Sauerstoffverbrauchsraten im Falle der übereinstimmenden *in vitro* und *in silico* Verläufe des pO_2 in Abhängigkeit von der Zeit durchaus unterscheiden können. Allerdings sind die globalen Verbrauchsrate für die gesamte Zellschicht mit einer Aussaatdichte von $110k \text{ Zellen} \cdot cm^{-2}$ und damit diejenigen pro Zelle identisch.

Wie bereits erwähnt, wurden die *in silico* Daten durch eine kombinierte Variation der Parameter der maximalen Sauerstoffverbrauchsrate R_{\max} und der Höhe h des *Monolayers* gemäß einer Augenscheinvalidität an die experimentellen Ergebnisse angepasst. Zur Einschätzung der Güte dieser Anpassung wurde ergänzend das numerische Bestimmtheitsmaß R^2 herangezogen. R^2 quantifiziert die quadratischen Abweichungen der vorhergesagten Werte im Verhältnis zu deren Varianz. Dieses wurde nach folgender Gleichung (entnommen aus Fahrmeir et al., 2016) mit Unterstützung von Benjamin Münch (Universität Regensburg) in der Programmiersprache R (R Core Team, 2023) berechnet:

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (26)$$

mit y_i als beobachtete experimentelle Werte, \hat{y}_i als vorhergesagte Werte des Simulationsmodells und \bar{y} als arithmetisches Mittel der y_i ($i = 1, \dots, n$).

Für die Betrachtung des gesamten Untersuchungszeitraumes ergibt sich $R^2 = 0,66$ für das Simulationsmodell bei der Vorhersage der experimentellen Daten. Aufgrund der extremen Abweichung zwischen den experimentellen und den *in silico* Daten zwischen $t = 0 - 30$ min wurde ergänzend die Modellgüte ab $t = 30$ min bestimmt. Das Weglassen der Messwerte im Zeitraum $t = 0 - 30$ min führt mit einem $R^2 = 0,88$ zu einer deutlichen Verbesserung der Vorhersagequalität des simulierten Modells.

Da die herangezogenen Mess- und Simulationsdaten nicht normalverteilt sind, ist das R^2 nur eingeschränkt interpretierbar. Um einen Referenzwert zu gewinnen, wurden die experimentellen Daten ergänzend mit einem sogenannten Quasi-Poisson Regressionsmodell vorhergesagt (Tutz, 2012). Die Ergebnisse für R^2 unter Verwendung des Quasi-Poisson Modells sind im Vergleich zum *in silico* Modell in **Tabelle 8** aufgeführt.

Tabelle 8: Darstellung der Bestimmtheitsmaße R^2 bei einem Vergleich des experimentellen Modells einerseits mit dem *in silico* Modell und andererseits mit einem Quasi-Poisson Regressionsmodell. Zusätzlich wurde R^2 in beiden Gegenüberstellungen für zwei unterschiedliche Zeiträume bestimmt.

Modell	R^2 (t = 0 – 24 h)	R^2 (t = 0,5 – 24 h)
<i>in silico</i>	0,66	0,88
Quasi-Poisson Modell	0,27	0,29

Mit den Ergebnissen in **Tabelle 8** wird ersichtlich, dass das *in silico* Modell die experimentellen Daten deutlich besser als das Quasi-Poisson Modell erklärt, sowohl für den Gesamtzeitraum als auch ab $t = 30$ min. Dies stützt die Vorgehensweise mit Hilfe der Augenscheinvalidität.

5.1.2 Einfluss kritischer Parameter auf die *in silico* Sauerstoffverteilung

Die Kombination aus den zugrundeliegenden Annahmen und der Übereinstimmung aus Experiment und Simulation in **Kapitel 5.1.1** hat zur Folge, dass die Werte der Sauerstoffverbrauchsrate (R_{\max} und R_{global}) sowie die Höhe h des *Monolayers*, als einzig veränderliche Variablen, einen wesentlichen Einfluss auf den Verlauf des Sauerstoffpartialdruckes in Abhängigkeit von der Zeit haben. Um die exakten Auswirkungen im Allgemeinen und unabhängig vom Zelltyp genauer zu untersuchen, wurden verschiedene Parametervariationen durchgeführt. Dazu wurde jeweils einer der eben genannten Parameter konstant gehalten, während die Übrigen in einem physiologisch sinnvollen Wertebereich verändert wurden. Zunächst wurde angenommen, dass die Höhe des *Monolayers* mit $5\ \mu\text{m}$ konstant ist, während die maximale Sauerstoffverbrauchsrate von $0,1 \cdot 10^{-2}\ \text{mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$ bis $0,1\ \text{mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$ geändert wurde. Infolge der Änderung von R_{\max} ändert sich auch die globale Verbrauchsrate, als Ergebnis der Oberflächenintegration, in einem Bereich von $0,16\ \text{pmol} \cdot \text{s}^{-1}$ bis $3,72\ \text{pmol} \cdot \text{s}^{-1}$.

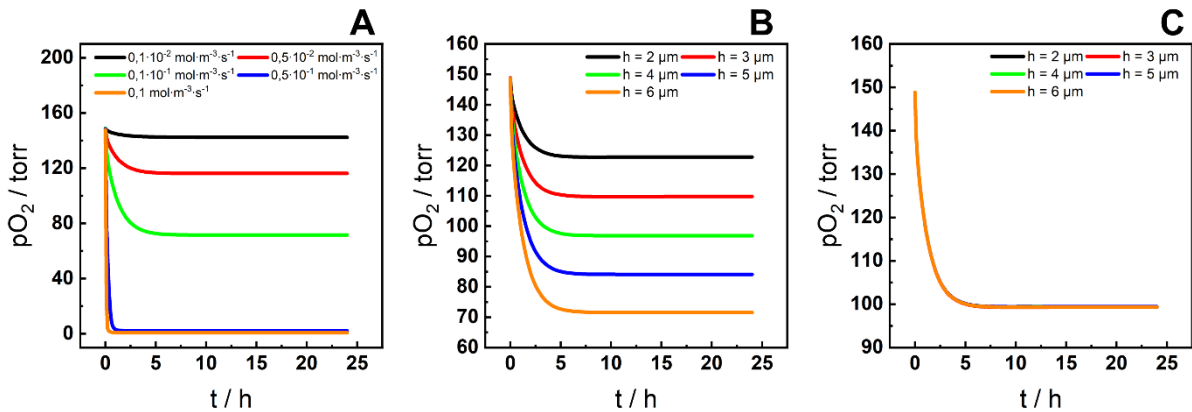


Abbildung 34: Untersuchung des Sauerstoffpartialdrucks direkt unterhalb der adhärenter Zellen im *Monolayer* durch systematische Variation der Parameter R_{\max} , R_{global} und h . **(A)** Zeitabhängiger Verlauf des pO_2 durch Variation von R_{\max} und infolgedessen von R_{global} , während die Höhe des *Monolayers* mit $5 \mu\text{m}$ konstant gehalten wird. Durch Variation der Höhe h ($2 \mu\text{m} - 6 \mu\text{m}$) wird die Veratmung einerseits bei einer konstanten maximalen Sauerstoffverbrauchsrate R_{\max} **(B)** analysiert und andererseits unter Annahme einer konstanten globalen Verbrauchsrate R_{global} **(C)**. $T = 37^\circ\text{C}$.

Aus **Abbildung 34 A** geht hervor, dass ausgehend von 149 torr bei $t = 0 \text{ h}$ die zeitabhängigen Verläufe des pO_2 für alle Variationen von R_{\max} zu verschiedenen Zeitpunkten einen Gleichgewichtszustand erreichen. Die Abnahme des pO_2 ist bei einer maximalen Sauerstoffverbrauchsrate der adhärenter Zellen von $0,1 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$ (—) mit 99,5 % einerseits am stärksten. Andererseits ist der Sauerstoffpartialdruck bereits nach 1,8 h bei einem konstanten Endwert angelangt. Mit einem Wert von $0,1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$ für R_{\max} (—) verändert sich der Sauerstoffpartialdruck unterhalb der Zellen lediglich um 4,5 % innerhalb von 24 Stunden. Außerdem verzögert sich das Erreichen des Gleichgewichtszustandes mit variierenden Werten für R_{\max} auf bis zu 12,7 Stunden. Bei der Parametervariation in **Abbildung 34 B** wurde angenommen, dass die maximale Verbrauchsrate mit einem Wert von $0,1 \cdot 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$ konstant ist, während sich die Höhe des *Monolayers* zwischen $2 \mu\text{m}$ und $6 \mu\text{m}$ ändert. Im Gegensatz zu den beobachteten Ergebnissen in **Abbildung 34 A** nimmt der Verlauf des zeitabhängigen pO_2 für alle untersuchten Höhen nach ungefähr 7,7 Stunden einen konstanten Wert an. Dieser Endwert ist bei höheren Monolagen von $6 \mu\text{m}$ (—) mit einem Wert von 72,7 torr niedriger als bei $2 \mu\text{m}$ (—) mit 123,1 torr. Infolgedessen steigt der prozentuale Abfall des Partialdruckes unterhalb der Zellen mit zunehmender Höhe von 17,6 % (—) über 35 % (—) bis hin zu 52 % (—). Trotz einer konstanten maximalen volumenbezogenen Verbrauchsrate ändert sich R_{global} von $0,63 \text{ pmol} \cdot \text{s}^{-1}$ für $2 \mu\text{m}$ auf

einen Wert von $1,85 \text{ pmol}\cdot\text{s}^{-1}$ bei einer Höhe von $6 \text{ }\mu\text{m}$. Zuletzt wurde der Fall untersucht, bei dem bei erneuter Variation der Höhe h die globale Verbrauchsrate mit einem Wert von $1,19 \text{ pmol}\cdot\text{s}^{-1}$ als konstant angenommen wurde. Die Ergebnisse in **Abbildung 34 C** zeigen, dass trotz kontinuierlicher Veränderung von h und damit einer Änderung von R_{max} , kein Unterschied zwischen den Kurvenverläufen erkennbar ist. In allen Fällen sinkt der pO_2 von 149 torr ($t = 0 \text{ h}$) auf einen Gleichgewichtswert von 99,4 torr. Der Kurvenverlauf sowie die kombinierten Wertepaare für R_{max} und h sind identisch zu denjenigen in **Abbildung 33** und **Tabelle 7** und validieren die dort beobachtete Übereinstimmung aus Experiment und Simulation.

5.1.3 Simulation offener und geschlossener Systeme

Die bisherigen *in silico* Modellierungen wurden auf Basis der zugrundeliegenden Experimente unter der Annahme eines offenen Systems durchgeführt. Insofern wird dem System kontinuierlich Sauerstoff über die obere Grenzfläche zwischen Medium und Umgebungsluft zugeführt. Die Konzentration an dieser Grenzfläche entspricht dabei der atmosphärischen Sauerstoffkonzentration in einem normoxischen Inkubator bei einer Temperatur von $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und $0 \text{ }\%$ CO_2 und wird durch eine Konzentrationsrandbedingung modelliert (siehe **Kapitel 4.3.2**). Im Falle des geschlossenen Systems wird dieser Übergang von gasförmigem Sauerstoff über die Grenzfläche in die flüssige Phase unterbunden. Mit Ausnahme dieser Unterschiede in der Medium/Luft Grenzfläche sind die übrigen theoretischen Voraussetzungen identisch. Für beide Systeme wurde angenommen, dass die Zellen mit einer Zelldichte von $110\text{k Zellen}\cdot\text{cm}^{-2}$ in $200 \text{ }\mu\text{L}$ Volumen ausgesät wurden. Infolge der identischen geometrischen Modellierung des konfluenten *Monolayers* mit einer durchschnittlichen Höhe von $5 \text{ }\mu\text{m}$ wurde zudem eine volumenbezogene Sauerstoffverbrauchsrate von $0,76\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$ vorausgesetzt. Der zeitabhängige Verlauf des Sauerstoffpartialdruckes pO_2 unterhalb der adhärenter Zellen im *Monolayer* ist sowohl für das offene als auch das geschlossene System in **Abbildung 35** dargestellt.

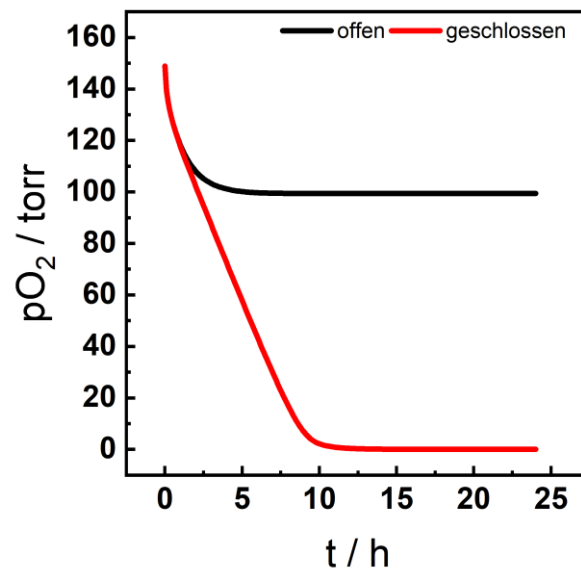


Abbildung 35: Darstellung des Sauerstoffpartialdruckes pO_2 unterhalb adhärenter Zellen im *Monolayer* über einen Zeitraum von 24 Stunden in einem offenen (—) und geschlossenen (—) System. $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Der Kurvenverlauf ist bis $t = 54\text{ min}$ für beide Systeme mit einer Abnahme des pO_2 auf Werte von ungefähr 119 torr nahezu identisch. Anschließend sinkt der pO_2 in einem geschlossenen System linear auf 2,2 torr ($t = 10\text{ h}$) und schließlich auf 0,07 torr nach 14,2 Stunden. Mit einer offenen Randbedingung an der Luft/Medium Grenzfläche hingegen fällt dieser lediglich auf 99,4 torr ($t = 7,7\text{ h}$) und bleibt ab diesem Zeitpunkt konstant. Somit liegt die effektive Abnahme des pO_2 im geschlossenen System mit 99,9 % bedeutend höher als im offenen mit 33,3 %.

Die Sauerstoffverteilung in beiden Systemen wird zusätzlich in **Abbildung 36** deutlich. Durch die 3D Plots wird die Sauerstoffdepletion infolge der Veratmung durch die Zellen im geschlossenen System dem Gleichgewichtszustand in einem offenen System zu verschiedenen Zeitpunkten ($t = 0\text{ h}$, 5 h , 24 h) gegenübergestellt.

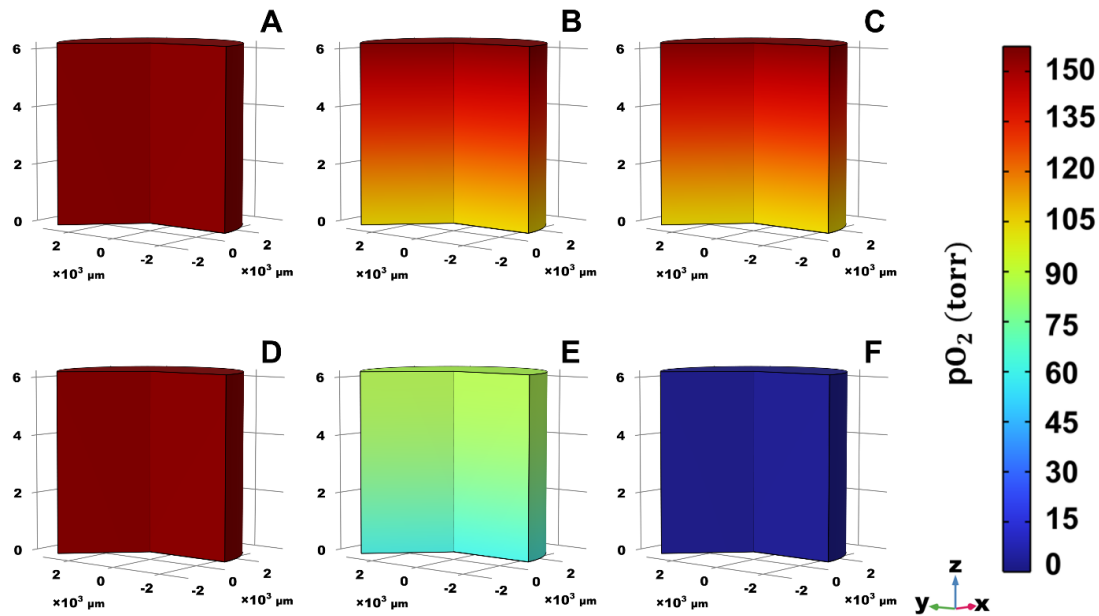


Abbildung 36: Simulierte 3D Sauerstoffverteilung innerhalb der *in vitro* Zellkulturumgebung eines Wells einer 96-Well Platte mit 200 µL Volumen. Die adhärenenten Zellen im *Monolayer* wurden auf einer Sauerstoff-sensitiven Sensorfolie am Boden des Wells modelliert. Die obere Reihe zeigt die Modellausgabe bei $t = 0$ h (A), $t = 5$ h (B) und $t = 24$ h (C) in einem offenen System, während die untere Reihe die Lösung im Falle eines geschlossenen Systems zu den gleichen Zeitpunkten visualisiert ($t = 0$ h: D, $t = 5$ h: E und $t = 24$ h: F). Infolge der 2D-achsensymmetrischen Natur des Modells können die Ergebnisse durch einen Rotations-Datensatz als Zylinder in 3D dargestellt werden.

Trotz einer identischen maximalen OCR von $0,76 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$ weichen die globalen Verbrauchsraten pro Gewebe voneinander ab. Während in einem offenem System Sauerstoff mit $1,19 \text{ pmol} \cdot \text{s}^{-1}$ veratmet wird, liegt die Verbrauchsrate im geschlossenen System bei lediglich $0,49 \text{ pmol} \cdot \text{s}^{-1}$ und somit um 58,8 % niedriger. Bezogen auf die Sauerstoffverbrauchsrate pro Zelle führt dies zu einem Wert von $13 \text{ amol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Zelle}^{-1}$ gegenüber dem bereits berichteten Wert von $32 \text{ amol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Zelle}^{-1}$ in einem System mit einer offenen Randbedingung an der Luft/Medium Grenzfläche (siehe Kapitel 5.1.1).

5.1.4 Einflüsse des Multiwellformats und der Höhe der Flüssigkeitssäule

Im Gegensatz zu den bisher dargestellten Ergebnissen, bei welchen das jeweilige Multiwellformat und die Höhe der Flüssigkeitssäule identisch waren, wurde zusätzlich untersucht, welchen Einfluss eine Variation dieser Parameter auf den zeitabhängigen Verlauf des pO_2 direkt unter einer adhärenten Zellschicht hat. Die Sauerstoffverteilung in 2D und 3D Zellkulturen wird in der Literatur unter Verwendung verschiedener Protokolle, welche sich hinsichtlich der Geometrien der Kulturgefäße und den darin befindlichen Volumina an Medium unterscheiden, analysiert. Dies wirft die Frage auf, ob ein Vergleich der Ergebnisse bei Abweichungen eben dieser Faktoren überhaupt sinnvoll ist. Denn selbst wenn die Aussaatdichte in allen Fällen gleich ist, resultiert im Zuge der differierenden Wachstumsflächen der Substrate zum einen eine abweichende effektive Zellzahl im System. Zum anderen erfordern die unterschiedlichen Geometrien der Multiwellformate, unter der Voraussetzung einer konstanten Höhe der Flüssigkeitssäule, eine Veränderung des Volumens. Dies kann dadurch begründet werden, dass eine adaptive Anpassung des Volumens sowohl die Effekte der Verdunstung verhindern als auch eine angemessene Nährstoffversorgung der Zellen gewährleisten soll (Tse et al., 2021). Somit wurden im Folgenden drei unterschiedliche Multiwellformate modelliert, welche sich zwar hinsichtlich der darin befindlichen Volumina unterscheiden, jedoch gleichhohe Flüssigkeitssäulen besitzen. Bei den Formaten handelt es sich erneut um ein Well einer 96-Well Platte, um ein Well einer 24-Well Platte und um ein Well einer 12-Well Platte. Weiterhin wurde das Multiwellformat einer 96-Well Platte mit unterschiedlichen Volumina von 100 μL , 200 μL und 300 μL untersucht. Für alle zylindersymmetrischen Wells kann der Zusammenhang zwischen dem Volumen V , dem Durchmesser d und der Höhe der Flüssigkeitssäule h durch folgende Formel berechnet werden:

$$V = \pi \cdot \left(\frac{d}{2}\right)^2 \cdot h \quad (27)$$

Eine Zusammenfassung der resultierenden Werte im Zuge der unterschiedlichen Abmessungen der verwendeten Zellkultursysteme sind **Tabelle 9** zu entnehmen.

Tabelle 9: Variationen des Durchmessers (siehe **Kapitel 4.3.1**), der Medienvolumina und der Diffusionsabstände für Sauerstoff (Höhe der Flüssigkeitssäule des Mediums) für unterschiedliche Zellkultursysteme.

Kultursystem	Durchmesser / mm	Volumen an Medium / μL	Höhe der Flüssigkeitssäule / mm
96-Well Platte	6,39	100; 200; 300	3,12; 6,24; 9,36
24-Well Platte	15,7	604	3,12
12-Well Platte	22,2	1208	3,12

Für eine bessere Vergleichbarkeit wurde in allen Fällen ein offenes System mit konfluenten Zellen im *Monolayer* der Höhe $5\text{ }\mu\text{m}$ modelliert. Ebenso wurde eine zelluläre Verbrauchsrate von $32\text{ amol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Zelle}^{-1}$ angenommen. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 37** dargestellt, wobei **(A)** den zeitabhängigen Verlauf des pO_2 in verschiedenen Systemen zeigt und **(B)** die Sauerstoffverteilung in einem Multiwellformat mit unterschiedlichen Volumina. In **Abbildung 37 A** ist für jedes simulierte Multiwellformat eine nahezu konforme Abnahme des Sauerstoffpartialdruckes auf einen Wert von ungefähr 126 torr innerhalb von $t = 1\text{ h}$ zu beobachten. Jedes der dargestellten Systeme erreicht nach spätestens 1,8 h einen Gleichgewichtszustand. Für das Well einer 96-Well Platte (—) nimmt der pO_2 unterhalb der Zellschicht einen Gleichgewichtswert von 125,42 torr an. Bei einer Erhöhung der Dimensionen des Multiwellformats sinkt der pO_2 auf 125,36 torr für das Well einer 24-Well Platte (—) und auf 125,29 torr für das simulierte Well einer 12-Well Platte (—). Somit differieren die pO_2 Werte im Gleichgewichtszustand um maximal 0,1 %. Ein ähnlich konformer Abfall des pO_2 ist bei unterschiedlichen Volumina innerhalb des gleichen Systems zu beobachten (siehe **Abbildung 37 B**). Von anfänglichen 149 torr sinkt der pO_2 zunächst innerhalb von 30 Minuten auf einen Wert von 127 torr. Im weiteren Zeitverlauf unterscheiden sich die Kurvenverläufe sowohl hinsichtlich deren weiterer pO_2 Abnahme als auch des Zeitpunktes der Gleichgewichtseinstellung. Analog zu dem Verlauf in **Abbildung 37 A** sinkt der pO_2 für eine 96-Well Platte mit $100\text{ }\mu\text{L}$ Medium (—) auf 125,42 torr nach 1,8 h. Bei einer Verdopplung des Volumens auf $200\text{ }\mu\text{L}$ und einer resultierenden Flüssigkeitssäule von 6,24 mm (—) wird hingegen

erst nach circa 7,7 h ein Gleichgewichtswert von 99,4 torr erreicht. Wird das Volumen um weitere 100 μL erhöht (—), ist eine Abnahme des pO_2 um weitere 24 % zu beobachten mit einem Endwert von 75,3 torr nach 18,6 h.

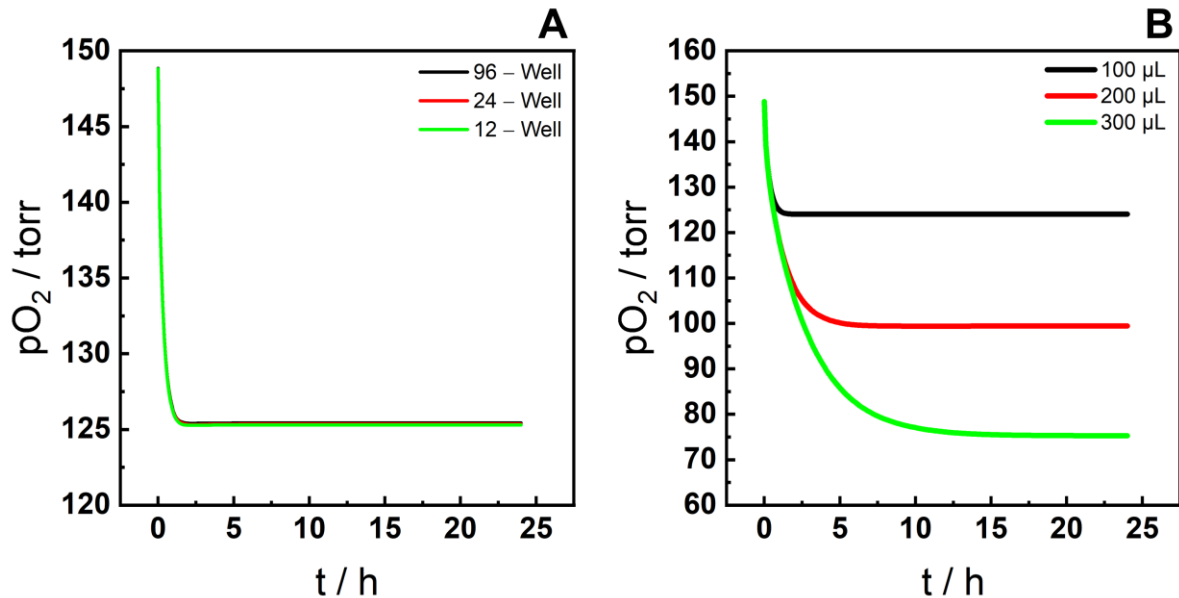


Abbildung 37: Darstellung des Sauerstoffpartialdruckes pO_2 unterhalb eines 2D *Monolayers* mit einer Höhe von 5 μm und einer zellulären Verbrauchsrate von $32 \text{ amol} \cdot \text{s}^{-1}$ als Funktion der Zeit t unter Berücksichtigung (A) verschiedener Multiwellformate (96-Well, 24-Well und 12-Well) mit gleich hohen Flüssigkeitssäulen und (B) verschiedener Volumina (100 μL , 200 μL und 300 μL) im gleichen System (96-Well Platte). $T = 37^\circ\text{C}$.

Durch die Veränderung der Wachstumsfläche in den verschiedenen Formaten in **Abbildung 37 A** resultieren, trotz der Annahme einer gleichen zellulären Verbrauchsrate, unterschiedliche globale Verbrauchsraten für die gesamte Zellpopulation im *Monolayer*. Aufgrund eines nahezu konstanten Volumen-zu-Oberflächen-Verhältnisses für jedes Multiwellformat sind die maximalen volumenbezogenen Sauerstoffverbrauchsrate R_{max} jedoch nahezu identisch (maximale Abweichung von 0,8 %) und demnach sind die zeitabhängigen pO_2 Verläufe sehr ähnlich. Beim gleichen Zellkulturformat mit variierenden Höhen der Flüssigkeitssäule des Mediums (**Abbildung 37 B**) ändern sich, unter der Annahme identische zellulärer Verbrauchsrate, weder R_{max} noch R_{global} . Die Veränderungen in den Höhen der Flüssigkeitssäule stellen dabei einen entscheidenden Einflussfaktor für die Untersuchung der Sauerstoffverteilung in 2D Zellkultursystemen dar und müssen bei der Analyse berücksichtigt werden.

5.1.5 Diskussion

Die Verfügbarkeit von Sauerstoff bestimmt die Effizienz des zellulären Stoffwechsels. Während bei der anaeroben Glykolyse nur 2 mol ATP pro mol Glukose produziert werden, sind dies 30 mol beim aeroben Stoffwechsel (J. M. Berg et al., 2018; P. Christen et al., 2016). Des Weiteren umfasst der Beitrag der mitochondrialen Veratmung 90 % vom gesamten zellulären Sauerstoffverbrauch (Wu et al., 2007). Somit können Unterschiede in der Sauerstoffzufuhr sowohl *in vitro* als auch *in vivo* signifikante Auswirkungen auf das Verhalten von Zellen haben. Die Sauerstoffverteilung in zellulären Systemen wird dabei im Wesentlichen durch folgende Faktoren beeinflusst: zelluläre OCR, Zelldichte, Zelltyp, Höhe der Flüssigkeitssäule und das Kulturgefäß (Al-Ani et al., 2018). Auf Basis dieser Aspekte werden im Folgenden die Ergebnisse aus den **Kapiteln 5.1.1 – 5.1.4** diskutiert.

Bei der Analyse eines *Monolayers* aus adhärenenten U373 Zellen in einem offenen System (siehe **Abbildung 33** und **Abbildung 34 C**) ist durch den zellulären Sauerstoffverbrauch sowohl *in silico* als auch *in vitro* ein zeitabhängiger Sauerstoffgradient unterhalb des Gewebes zu beobachten. Dabei sinkt der pO_2 zunächst lokal unterhalb der Zellschicht bis ein Gleichgewicht erreicht ist. Während der anfängliche pO_2 Wert in der Simulation bei 149 torr liegt, beträgt er im Experiment lediglich $(115,7 \pm 1,8)$ torr und steigt auf $(122,3 \pm 1,8)$ torr innerhalb von 30 min. Die unterschiedlichen Initialwerte und der anfängliche Peak *in vitro* könnten durch verschiedene Faktoren erklärt werden. Einerseits veratmen die Zellen ab Zellaussaat Sauerstoff. Dadurch bilden sich bereits während der Kulturzeit Sauerstoffgradienten aus, welche trotz eines Mediumwechsel unmittelbar vor dem Experiment nicht vollständig ausgeglichen werden könnten. In der Simulation hingegen wird angenommen, dass die Zellen erst ab $t = 0$ h Sauerstoff veratmen. Andererseits wurde in der Simulation ein initialer pO_2 von 149 torr angenommen (siehe **Kapitel 4.3.2**), da die Zellkultivierung in einem Zellkulturinkubator mit 100%iger Luftfeuchtigkeit stattfindet. Die Sauerstoffkonzentration in der Gasphase beträgt 20,9 %. Bei einem atmosphärischen Gesamtdruck von 760 torr auf Meereshöhe liegt der Anteil des pO_2 somit bei 159 torr. Durch die zusätzliche Berücksichtigung der 100%igen Luftfeuchtigkeit in Zellkulturinkubatoren, welche 6,2 % des atmosphärischen Drucks

ausmacht, sinkt die O_2 Konzentration auf 19,7 %, was zu einem pO_2 von 149 torr führt. Der Wasserdampf, der durch das im Inkubator befindliche Wasserbad entsteht, ist dabei essenziell, da es sonst zu einer Verdunstung des Mediums kommen würde. Die damit einhergehende Veränderung der Osmolarität hätte wiederum einen Einfluss auf den Stoffwechsel der Zellen oder des Gewebes (Place et al., 2017; Wenger et al., 2015). Die Sauerstoffmessungen *in vitro* wurden hingegen in einem trockenen Inkubator durchgeführt. Somit könnte der Anstieg des pO_2 zwischen $t = 0 - 30$ min durch den höheren pO_2 in der Gasphase von 159 torr erklärt werden könnte. Zudem könnten Temperatureffekte eine Rolle bei dem anfänglichen Peak, welcher im Experiment beobachtet wurde, spielen. Allerdings können die tatsächlichen Einflussfaktoren sehr vielseitig sein und müssten in mehreren Einzelexperimenten weiter untersucht werden. Der anschließende lineare Abfall des pO_2 bis zur Äquilibration *in silico* und *in vitro* resultiert aus dem Zusammenspiel der Diffusion von Sauerstoff durch das Medium und dessen Verbrauch durch die Zellen. Trotz einer Variation der Höhen und damit der maximalen volumenbezogenen Verbrauchsraten R_{max} stimmen die Simulationsergebnisse mit den experimentellen Resultaten überein. Dies kann dadurch begründet werden, dass die Höhe der Monolage zwar steigt, aber gleichzeitig sinkt R_{max} . Es entsteht somit ein indirekt proportionaler Zusammenhang zwischen den beiden Parametern, was schließlich, durch eine rechnerische Integration über die Oberfläche des *Monolayers*, zu identischen globalen Verbrauchsraten von $1,19 \text{ pmol} \cdot \text{s}^{-1}$ führt. Dieser Wert liegt in einer ähnlichen Größenordnung, wie der von Schmittlein (2017) berichtete Wert von $(4,9 \pm 0,1) \text{ pmol} \cdot \text{s}^{-1}$ für U373 Zellen. Durch die Kenntnis der Aussaatdichte von $110 \text{ k Zellen} \cdot \text{cm}^{-2}$ und der Annahme, dass sich die effektive Zellzahl während des Experiments nicht ändert, ergibt sich eine zelluläre Verbrauchsrate von $32 \text{ amol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Zelle}^{-1}$. Die Annahme einer konstanten Zellzahl wurde getroffen, da die tatsächliche Zellzahl zum Zeitpunkt der *in vitro* Untersuchung nicht bekannt war. Allerdings wurde in der Literatur darüber berichtet, dass die Verdopplungszeit von Krebszellen, je nach Aussaatdichte, zwischen 18 h (Chaouki et al., 2009) und 36 h (Barnes & Sato, 1979) liegen kann. Aufgrund der Tatsache, dass die Zellen im Rahmen dieser Studie schon sehr dicht ausgesät wurden, ist zudem mit einer geringen Proliferationsrate und somit einer längeren Verdopplungszeit zu rechnen, womit die Annahme einer konstanten Zellzahl über den

beobachteten Zeitraum gerechtfertigt ist (Bredel-Geissler et al., 1992; Jorjani & Ozturk, 1999; Pettersen et al., 2005). Der resultierende Wert von $32 \text{ amol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Zelle}^{-1}$ liegt in einem sinnvollen Bereich, welcher für Krebszellen im Allgemeinen mit Werten zwischen $10 \text{ amol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Zelle}^{-1}$ und $60 \text{ amol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Zelle}^{-1}$ berichtet wird (Place et al., 2017). Die Größenordnung ist zudem ähnlich zu weiteren in der Literatur berichteten Sauerstoffverbrauchsrate von $5,16 \text{ amol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Zelle}^{-1}$ (Guarino et al., 2004) und $(11,00 \pm 0,83) \text{ amol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Zelle}^{-1}$ (B. A. Wagner et al., 2001) für eine andere Glioblastom Zelllinie U937, welche wegen fehlender Daten über den zellulären Sauerstoffverbrauch von U373 Zellen herangezogen wurde. Der ähnliche zeitabhängige Verlauf des pO_2 *in silico* und *in vitro* sowie die Tatsache, dass sich die resultierende Verbrauchsrate für U373 Zellen in einem sinnvollen Wertebereich befindet, validiert das Simulationsmodell und legitimiert dessen Anwendung für die Untersuchung weiterer Faktoren, welche die Sauerstoffverteilung in Zellkultursystemen bestimmen.

Unter Annahme eines offenen Systems in einer 96-Well Platte mit $200 \mu\text{L}$ Volumen wurden weitere Faktoren analysiert, welche das Zusammenspiel aus Diffusion und Verbrauch beeinflussen. Dabei wurde zum einen die Höhe des *Monolayers* mit $5 \mu\text{m}$ vorausgesetzt, während die volumenbezogene Verbrauchsrate R_{max} variiert wurde (siehe **Abbildung 34 A**). Zum anderen wurde der umgekehrte Fall mit einem konstanten Wert für R_{max} und verschiedenen Höhen der Zellmonolage (siehe **Abbildung 34 B**) betrachtet. Bei der ersten Analyse ist zu beobachten, dass mit zunehmender Rate für R_{max} der Abfall des pO_2 steiler ist und das Gleichgewicht früher erreicht wird. Zudem steigt die globale Verbrauchsrate von $0,16 \text{ pmol}\cdot\text{s}^{-1}$ auf $3,72 \text{ pmol}\cdot\text{s}^{-1}$. Diese Verhältnisse könnten beispielsweise durch einen Anstieg der Zelldichte beim gleichen Zelltyp hervorgerufen werden. Unter Annahme der gleichen zellulären Verbrauchsrate von $32 \text{ amol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Zelle}^{-1}$ würde die Zelldichte von $14450 \text{ Zellen}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($0,1\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$) auf $342178 \text{ Zellen}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($0,1\cdot 10^{-1} \text{ mol}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$) ansteigen. Zirath et al. (2018) berichteten ebenfalls davon, dass der pO_2 bei der Analyse von A549 Zellen am stärksten abnimmt, wenn die zugrundeliegende Zelldichte am größten ist. Eine lineare Beziehung zwischen R_{global} und der Aussaatdichte bei HL60 Zellen beobachteten Guarino et al. (2004). Fleischaker und Sinskey (1981) nutzten Elektroden für die Quantifizierung der volumenbezogenen

Sauerstoffverbrauchsrate in menschlichen Fibroblasten und erhielten eine Zunahme der OCR mit zunehmender Zellzahl. Allerdings kann entgegen der Annahme die zelluläre Verbrauchsrate bei der gleichen Zelllinie auch unterschiedlich sein (Al-Ani et al., 2018). Dies zeigte Schmittlein (2017) bei der Analyse der OCR von MDCKII und NRK Zellen für steigende Aussaatdichten. Die Zellen beider Zelllinien wurden in fünf verschiedenen Zelldichten zwischen $15\text{k Zellen}\cdot\text{cm}^{-2}$ und $200\text{k Zellen}\cdot\text{cm}^{-2}$ auf planaren Sauerstoff-sensitiven Sensorfolien ausgesät und anschließend wurden die Sauerstoffverbrauchsrate quantifiziert. Wie in der Simulation zu **Abbildung 34 A** und den bereits berichteten Literaturdaten stieg die globale Verbrauchsrate in beiden Fällen mit zunehmender Zelldichte an. Allerdings war bei adhärenter NRK-Zellen die größte zelluläre Verbrauchsrate mit $(11,2 \pm 0,5) \text{amol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Zelle}^{-1}$ für die kleinste Zelldichte zu verzeichnen und die kleinste mit einem Wert von $(4,58 \pm 0,06) \text{amol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Zelle}^{-1}$ bei einer Zelldichte von $200\text{k Zellen}\cdot\text{cm}^{-2}$. Somit ist der Trend bei den Verbrauchsrate pro Zelle entgegengesetzt zu demjenigen bei der Zelldichte und R_{global} . Bei MDCKII Zellen hingegen ist weder eine Konformität bei den zellulären Verbrauchsrate noch eine bestimmte Tendenz zu beobachten. Ein ähnliches Verhalten der zellulären OCR, wie bei den NRK Zellen unterschiedlicher Zelldichte, berichteten auch Sand et al. (1977) sowie Wohlpert et al. (1990). Bei Ersteren nahm die zelluläre Verbrauchsrate von Lymphozyten um das 100fache zu bei 1000facher Verdünnung der Zellsuspension, während Zweitere lediglich eine 4fache Zunahme der OCR für Hybridomzellen bei einer gleichzeitigen Abnahme der Zelldichte von 10^7 auf $10^5 \text{Zellen}\cdot\text{mL}^{-1}$ beobachteten. Für genauere Rückschlüsse auf die Verbrauchsrate pro Zelle in der vorliegenden Simulation müsste das *in silico* Modell mit experimentellen Daten zu unterschiedlichen Aussaatdichten validiert werden. Nichtsdestotrotz liegt es auch ohne eine genaue Kenntnis der zellulären Verbrauchsrate nahe, dass die Zunahme der globalen Verbrauchsrate einer möglichen Steigerung der Zelldichte entspricht, wie in gleicher Weise in der Literatur berichtet wurde. Der Effekt der Zelldichte als mögliche Erklärung für die Ergebnisse in **Abbildung 34 A** ist zudem eng verknüpft mit der Wachstumsrate der Zellen. Um die Kurvenverläufe möglicherweise unter diesem Gesichtspunkt erklären zu können, ist es sinnvoll, nur die Ergebnisse bei $0,1\cdot 10^{-2} \text{mol}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$ – $0,01 \text{mol}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$ heranzuziehen, da bei höheren volumenbezogenen Verbrauchsrate das Ungleichgewicht zwischen

Diffusion und Verbrauch deutlicher zu Tage tritt. Die globale Verbrauchsrate nimmt in diesen Fällen nicht mit gleichen prozentualen Werten zu. Während der Anstieg von $0,16 \text{ pmol}\cdot\text{s}^{-1}$ auf $0,78 \text{ pmol}\cdot\text{s}^{-1}$ 387,5 % umfasst, liegt er lediglich bei 98,7 % von $0,78 \text{ pmol}\cdot\text{s}^{-1}$ auf $1,55 \text{ pmol}\cdot\text{s}^{-1}$. Jorjani und Ozturk (1999) sowie Pettersen et al. (2005) kamen ebenfalls zu der Schlussfolgerung, dass die Änderung in der OCR umso geringer ist, je größer die Zelldichte ist und desto kleiner die Wachstumsrate der Zellen. Bredel-Geissler et al. (1992) haben Zellen in der Phase des exponentiellen Wachstums und der Sättigung untersucht und beobachtet, dass das Zellvolumen während der Kulturzeit linear abnimmt. Diese Reduktion ist zum großen Teil mit einer Abnahme des Zytoplasmas und somit der Anzahl der Mitochondrien verknüpft. Infolgedessen sinkt die Verbrauchsrate pro Zelle direkt proportional mit dem Zellvolumen. Bei einer längeren Kulturzeit bleibt diese hingegen konstant. Blanquer-Rosselló et al. (2015) behandelten MCF-7 Zellen mit dem Adipokin Leptin, welches die Zellproliferation um 18 % während 24 Stunden erhöhte. In diesem Rahmen konnte zudem eine Zunahme der mitochondrialen Veratmung mit einer Clark Elektrode verzeichnet werden. Für eine genauere Analyse dieses Aspektes müssten allerdings mehr experimentelle Grundlagen bezüglich Aussaatdichte und Verbrauchsrate pro Zelle geschaffen werden, um die Simulationsergebnisse hinreichender diskutieren zu können. Allerdings genügen die vorliegenden Ergebnisse als Anhaltspunkt und Orientierung für zukünftige *in vitro* Experimente. Beim zweiten Fall der allgemeinen Studie (siehe **Abbildung 34 B**) wurde eine konstante volumenbezogene Verbrauchsrate von $0,01 \text{ mol}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$ angenommen, während die Höhe des *Monolayers* zwischen $2 \text{ }\mu\text{m}$ und $6 \text{ }\mu\text{m}$ variiert wurde. Infolgedessen war ein stärkerer Abfall des pO_2 innerhalb der ersten 5 Stunden infolge der Zunahme der globalen Verbrauchsrate zu beobachten. Diese Verhältnisse könnten beispielsweise durch den zugrundeliegenden Zelltyp und die damit einhergehende differierende Zellgröße hervorgerufen werden. B. A. Wagner et al. (2001) untersuchten den Einfluss der Zellgröße auf die zelluläre Verbrauchsrate und stellten fest, dass große Zellen mehr Sauerstoff verbrauchen als kleine. Während HL60 Zellen mit einem Volumen von $0,49 \text{ pL}$ nur $8,3 \text{ amol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Zelle}^{-1}$ konsumieren, liegt die OCR bei MCF-7 Zellen mit $1,70 \text{ pL}$ bereits bei $32,5 \text{ amol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Zelle}^{-1}$ und steigert sich auf $45,3 \text{ amol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Zelle}^{-1}$ für PC3 Zellen mit einem Zellvolumen von $2,9 \text{ pL}$. Einen ähnlichen Trend beobachteten

auch Zirath et al. (2018) für die Zelllinien A549, HUVEC, ASC und NHDF, welche mit einer identischen Zelldichte von $25\text{k Zellen}\cdot\text{cm}^{-2}$ in Mikrokanälen ausgesät wurden. Mit einer zunehmenden Zellgröße von A549 bis NHDF Zellen, steigerte sich auch die OCR von $(2,1 \pm 0,7)\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$ (A549) über $(4,1 \pm 1,2)\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$ (HUVEC) und $(8,3 \pm 0,9)\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$ (ASC) auf $(20,8 \pm 1,4)\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$ (NHDF). Zusammenfassend wurde mit den Studien zu **Abbildung 34** zusätzlich zu den bereits untersuchten Faktoren in **Abbildung 33**, welche auch hier mitberücksichtigt werden müssen, der Einfluss von Zelldichte, Zelltyp und Zellgröße auf die Sauerstoffverteilung in zellulären Systemen mit einer offenen Randbedingung und gleichen Volumina analysiert.

Ein weiterer wesentlicher Aspekt, welcher aufgrund der Vielfalt der berichteten Daten in der Literatur berücksichtigt werden muss, ist das verwendete Zellkulturformat sowie die darin befindlichen Volumina an Medium. In den Simulationen zu **Abbildung 37 A** wurden drei verschiedene Systeme (96-Well, 24-Well und 12-Well) mit identischen Höhen der Flüssigkeitssäule unter der Annahme einer adhärenen Zellschicht mit einer Höhe von $5\text{ }\mu\text{m}$ (Zelldichte: $110\text{k Zellen}\cdot\text{cm}^{-2}$) und identischen zellulären Verbrauchsraten von $32 \text{ amol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Zelle}^{-1}$ untersucht. Dass letztere Annahme gerechtfertigt ist, zeigen die Ergebnisse von Guarino et al. (2004), welche identische OCR Werte pro C2C12 Zelle mit identischer Aussaatdichte und Mediumhöhe in unterschiedlichen Wellgrößen (48-Well und 96-Well) beobachteten. Trotz der Tatsache, dass die Anzahl der verbrauchenden Zellen in den Multiwellformaten unterschiedlich ist, ist das Volumen-zu-Oberfläche Verhältnis identisch und somit auch die zeitabhängigen pO_2 Verläufe. Die Varianzen in den pO_2 Werten im Gleichgewichtszustand könnten mit den minimal abweichenden Werten von R_{max} (maximal 0,8 %), welche mit zunehmender Wellgröße steigen, erklärt werden. Die Ursache hierfür könnte in Randeffekten liegen. Einen Zusammenhang zwischen der Mediumhöhe, der volumenbezogenen OCR und dem pO_2 zeigten Tse et al. (2021) im Rahmen von FEM-Simulationen. Diese untersuchten den Verlauf des pO_2 einerseits in Abhängigkeit der Medienhöhe und andererseits als Funktion unterschiedlicher OCR-Werte, welche für endokrine Zellen relevant sind. Hierbei beobachteten sie, dass der pO_2 in Systemen mit gleicher Mediumhöhe für kleine volumenbezogene

Verbrauchsrate höhere Werte annimmt und mit zunehmender OCR stärker abfällt. Die Resultate zu den Ergebnissen aus **Abbildung 37 B** können im Wesentlichen mit dem zweiten Fick'schen Gesetz erklärt werden, welches die zeitlichen und örtlichen Konzentrationsunterschiede in einem System beschreibt (Mamchaoui & Saumon, 2000). Hierbei ist die zeitliche Konzentrationsänderung der diffundierenden Sauerstoffteilchen direkt proportional zur zweiten Ableitung der Konzentration nach dem Ort mit dem Diffusionskoeffizienten als Proportionalitätsfaktor. Die örtliche Komponente wiederum wird direkt durch die Höhe der Flüssigkeitssäule im System und durch die resultierende Diffusionsstrecke beeinflusst. Während die Mediumhöhe bei 100 μL lediglich 3,12 mm ist, steigt diese auf 6,24 mm für 200 μL und schließlich auf 9,36 mm bei 300 μL . Infolgedessen ist bei einer gleichen zellulären Veratmung von $32 \text{ amol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Zelle}^{-1}$ und einem Volumen von 100 μL die Diffusionsstrecke am kürzesten, der Abfall des pO_2 am geringsten und das Gleichgewicht aus Diffusion und Veratmung am schnellsten erreicht. Zusammenfassend steigt die Diffusionsbarriere für Sauerstoff mit zunehmender Mediumhöhe (Place et al., 2017; Tse et al., 2021).

Bisher wurden alle Resultate hinsichtlich unterschiedlicher Einflussfaktoren analysiert und diskutiert. Durch die offene Randbedingung wurde gewährleistet, dass dem System kontinuierlich Sauerstoff über die Luft/Medium Grenzfläche zugeführt wird. Demzufolge könnte eine Depletion des Systems und eine mögliche Hypoxie lediglich aufgrund zu hoher Aussaatdichten, zu langer Diffusionsdistanzen oder zu hoher Verbrauchsrate verursacht werden. Auf Ebene des Gewebes wird die konstante Verfügbarkeit von Sauerstoff durch Hämoglobin im Blutstrom gewährleistet, welches dafür sorgt, dass der pO_2 infolge der zellulären Veratmung auf maximal 40 torr sinkt (Place et al., 2017). Viele *in vitro* Experimente zur Quantifizierung zellulärer Verbrauchsrate werden allerdings in geschlossenen Systemen durchgeführt, in welchen dieser konstante Zufluss von Sauerstoff fehlt. Dies liegt darin begründet, dass in diesem Fall die OCR über die Steigung der pO_2 Abnahme berechnet werden kann. Die häufige Verwendung sauerstoffpermeabler Zellkulturgefäße gleicht dabei die offene Randbedingung nicht aus, da die Permeabilität von Sauerstoff in Polystyrol um das 20fache geringer ist als in Wasser (Guarino et al., 2004; Mamchaoui & Saumon, 2000). Infolgedessen wurde in **Kapitel 5.1.3** der Einfluss der offenen Randbedingung

auf die Sauerstoffverteilung unterhalb adhärenter U373 Zellen untersucht. Dabei wurden identische Annahmen bezüglich des Systems (96-Well), der Höhe des *Monolayers* (5 μm), des Volumens an Medium (200 μL), der Aussaatdichte (110k Zellen $\cdot\text{cm}^{-2}$) und der volumenbezogenen Sauerstoffverbrauchsrate R_{max} ($0,76 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$) getroffen. Während der pO_2 für das offene System in **Abbildung 35** auf einen Gleichgewichtswert von 99,4 torr nach 7,7 h sinkt, ist für das geschlossene System eine Abnahme auf bis zu 2,2 torr innerhalb von 10 h zu beobachten. Unter Berücksichtigung der globalen Verbrauchsrate ist diese beim geschlossenen System mit $0,49 \text{ pmol} \cdot \text{s}^{-1}$ um ungefähr 58,8 % geringer als für das offene mit $1,19 \text{ pmol} \cdot \text{s}^{-1}$. Ähnliches gilt für die zelluläre Verbrauchsrate, welche für Ersteres bei $13 \text{ amol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Zelle}^{-1}$ gegenüber einem Wert von $32 \text{ amol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Zelle}^{-1}$ mit offener Randbedingung liegt. Die zeitabhängige Depletion von Sauerstoff in einem geschlossenen System, wie zusätzlich in **Abbildung 36** gezeigt ist, und die damit einhergehende Abnahme der Atmungsrate berichteten ebenfalls Wilson et al. (1977) für kultivierte Nierenzellen (BHK-21). Für MDCKII Zellen beobachtete Schmittlein (2017) einen ähnlichen Trend hinsichtlich der Abnahme der OCR von $(53,3 \pm 3,7) \text{ pmol} \cdot \text{s}^{-1}$ im offenen System auf $(17,3 \pm 0,7) \text{ pmol} \cdot \text{s}^{-1}$ in einem geschlossenen System mit gleichen Volumina von 4,8 mL. Wenngleich die Absolutwerte größer sind als diejenigen der Simulation, spielen hierbei mehrere Betrachtungspunkte, wie das zugrundeliegende System, der Zelltyp und die Aussaatdichte eine Rolle. Auf Ebene der zellulären Verbrauchsrate berichteten Mamchaoui und Saumon (2000) von $(42 \pm 3,2) \text{ amol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Zelle}^{-1}$ für alveolare Typ II-Zellen der Ratte für die Sauerstoffmessung in einem geschlossenen System gegenüber einem Wert von $(46 \pm 4,3) \text{ amol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Zelle}^{-1}$ in einem offenen. Die Abnahme von R_{global} und demzufolge der zellulären OCR sowohl in der Simulation als auch in der Literatur kann mit Hilfe der zugrundeliegenden Reaktionskinetik nach Michaelis-Menten erklärt werden. Bei den meisten Zellen erreicht der Sauerstoffverbrauch bei Sauerstoffkonzentrationen von 7,1 – 14,2 torr einen Sättigungswert. Infolgedessen entspricht die OCR dem Wert von R_{max} (Brischwein & Wiest, 2018; B. A. Wagner et al., 2001). Dies ist auch in **Abbildung 35** zu beobachten, in welcher die mitochondriale Veratmung ungestört gemäß einer Kinetik nullter Ordnung verläuft, wobei die OCR dem Wert von R_{max} entspricht. Im Falle des abgeschlossenen Systems wird der

Verbrauch bei pO_2 -Werten, die kleiner als 2,8 torr sind (entspricht dem definierten Wert der Michaelis-Menten Konstanten), um die Hälfte reduziert, bis ein Endwert von 0,07 torr erreicht ist. Eben diese Abnahme der OCR könnte mit einer Anpassung an die hypoxischen Bedingungen und mit der Affinität von Sauerstoff für die Cytochrom C-Oxidase erklärt werden (Place et al., 2017). Allerdings sei angemerkt, dass die Effekte der Cytochrom C-Oxidase und eine Änderung des Stoffwechsels nicht als getrennt voneinander ablaufende Prozesse betrachtet werden können. Vielmehr beeinflussen sie sich gegenseitig. Chandel et al. (1996) untersuchten die Cytochrom C-Oxidasen von Rinderherzen während einer vierstündigen Inkubation mit Sauerstoffkonzentrationen, welche kleiner als 50 μM waren. Dabei verzeichneten sie eine reversible Abnahme der OCR und somit eine Hemmung der Cytochrom C-Oxidasen im Vergleich zu Kontrollenzymen bei höheren Konzentrationen. Außerdem wird durch niedrige pO_2 Werte die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung gesenkt indem zum einen Stickstoffmonoxid gebildet wird, welches die OCR verringert. Zum anderen erfolgt die Anpassung der Zellen durch die Induktion von Hypoxie-induzierten Faktoren. Diese Faktoren üben einen Einfluss auf die Energiehomöostase aus, indem sie den aeroben Stoffwechsel hemmen und den anaeroben glykolytischen erhöhen (Solaini et al., 2010). Die Berücksichtigung der genannten Faktoren erfolgte bereits im Rahmen der mathematischen Modellierung des Massentransfers und metabolischer Reaktionen (siehe **Kapitel 4.3.2**) und deren Tragweite wurde nun bei den *in silico* Ergebnissen in **Kapitel 5.1.3** ersichtlich.

5.2 Sauerstoffverteilung in Zellen auf permeablen Kultursubstraten

In **Kapitel 5.1** wurde die Sauerstoffverteilung *in silico* und *in vitro* analysiert, wobei die betrachteten Zellen im *Monolayer* direkt auf einer Sauerstoff-sensitiven Sensorfolie kultiviert wurden. Permeable Kultursubstrate stellen ein alternatives *in vitro* Kultursubstrat dar, um die Atmungsaktivität zu untersuchen. Hierbei werden die Zellen auf der porösen Membran des Substrates ausgesät und der Membraneinsatz wird daraufhin in eine Messkammer gehängt. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Sauerstoffdiffusion von beiden Seiten des *Monolayers* ermöglicht wird und nicht durch die Impermeabilität des Zellkulturgefäßes nach unten hin beschränkt ist. Wegen der Vielfalt kommerziell erhältlicher Kultursubstrate, welche sich hinsichtlich ihres strukturellen Designs und der Eigenschaften der Membranen unterscheiden, wurden diese im Folgenden *in silico* untersucht, mit dem Ziel, das passende Layout für experimentelle Messungen ausfindig zu machen. Die modellierte Geometrie eines 24-Well Kultursubstrates inklusive der Abmessungen des jeweiligen permeablen Membraneinsatzes sind **Kapitel 4.3.1** zu entnehmen. Das angenommene Standardvolumen für die Analyse war 100 μL im apikalen Kompartiment. Dabei sei anzumerken, dass die Flüssigkeitssäulen des basolateralen und apikalen Kompartiments stets gleichhoch sind, um einen Fluss zwischen den Kompartimenten zu vermeiden. Folglich wurde die Diffusion als einzig vorherrschender Transportprozess vorausgesetzt. Die Höhe des konfluenten *Monolayers* wurde mit 5 μm modelliert mit einer als konstant angenommenen Zelldichte von 110k Zellen $\cdot\text{cm}^{-2}$. Die Sauerstoff-sensitive Sensorfolie befindet sich, wie in **Kapitel 5.1**, am Boden des Wells direkt unterhalb der Membran mit den kultivierten Zellen. Die zugrundeliegende mathematische Modellierung erfolgte ebenfalls analog zu derjenigen in **Kapitel 5.1** und ist ausführlich in **Kapitel 4.3.2** beschrieben. Zudem wurde in den nachfolgenden Simulationen angenommen, dass die zelluläre Verbrauchsrate von 32 $\text{amol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Zelle}^{-1}$ unabhängig vom geometrischen Modell ist und infolgedessen analog zu derjenigen von adhärenten Zellen in einer 96-Well Platte. Diese Präsomtion erfolgte aufgrund der Tatsache, dass alleinig das System und die damit einhergehenden Faktoren, wie beispielsweise die Porosität der verwendeten Membran, untersucht werden sollte.

5.2.1 Einfluss unterschiedlicher Membranen

Die Kulturmembranen der Hersteller Corning und Sabeu unterscheiden sich zum einen hinsichtlich der Membrandicke, der Porengröße und der Porendichte. Zum anderen variiert bei der traditionellen Anwendung der Membraneinsätze der Abstand zwischen dem Sensor und den auf der Membran kultivierten Zellen (Corning: 300 μm ; Sabeu: 1000 μm). Anhand der Porengröße und -dichte kann mit den **Gleichungen (24) und (25)** die Porosität und der effektive Diffusionskoeffizient (O_2) durch die Poren der Membran berechnet werden. Die Ergebnisse sind mit dem Verweis auf **Tabelle 5** und **Tabelle 6** nochmals in einer komprimierten Form in **Tabelle 10** dargestellt.

Tabelle 10: Darstellung der Eigenschaften von Membraneinsätzen der Hersteller Corning und Sabeu, welche im Zuge der *in silico* Modellierung verwendet wurden. Eine detaillierte Gesamtübersicht findet sich in **Tabelle 5** und **Tabelle 6**.

System	Hersteller	Membrandicke s / μm	Porosität ε	Effektiver Diffusionskoeffizient (O_2) / $\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$
1A	Corning	10	0,126	$4,2\cdot 10^{-10}$
1B	Corning	10	0,005	$1,7\cdot 10^{-11}$
1C	Corning	10	0,013	$4,2\cdot 10^{-11}$
1D	Corning	10	0,141	$4,7\cdot 10^{-10}$
1E	Corning	10	0,078	$2,6\cdot 10^{-10}$
1F	Corning	10	0,05	$1,7\cdot 10^{-10}$
2A	Sabeu	11,5	0,126	$4,2\cdot 10^{-10}$
2B	Sabeu	11,5	0,003	$8,3\cdot 10^{-12}$
2C	Sabeu	11	0,016	$5,2\cdot 10^{-11}$
2D	Sabeu	12	0,042	$1,4\cdot 10^{-10}$
2E	Sabeu	9	0,141	$4,7\cdot 10^{-10}$
2F	Sabeu	10,5	0,118	$3,9\cdot 10^{-10}$
2G	Sabeu	12,5	0,101	$3,3\cdot 10^{-10}$
2H	Sabeu	12,5	0,05	$1,7\cdot 10^{-10}$

Im *Postprocessing* wurde je ein zentraler Auslesepunkt in der Zellmonolage und im Sensor generiert mit dem Ziel, die Einflüsse des strukturellen Designs der Membraneinsätze und der Membraneigenschaften quantifizieren zu können. Zwischen beiden Auslesepunkten befindet sich dabei ein Spalt von je 300 µm (Corning) beziehungsweise 1000 µm (Sabeu). Der zeitabhängige Verlauf des pO₂ im Gewebe und im Sensor für die Transwell®-Membraneinsätze von Corning sowie das resultierende Verhältnis der jeweiligen Werte zu jedem Zeitpunkt der Simulation sind in **Abbildung 38** gezeigt.

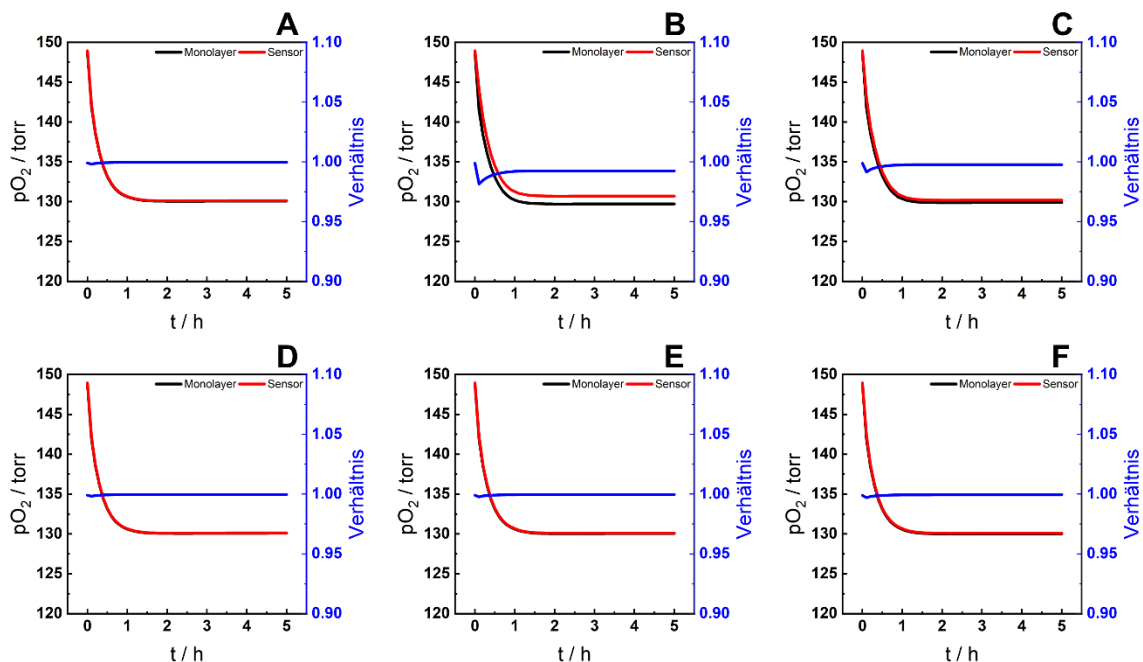


Abbildung 38: Darstellung des zeitabhängigen Verlaufs des pO₂ in den adhärenenten Zellen im *Monolayer* (—) sowie in der Sauerstoff-sensitiven Sensorfolie (—) für die jeweiligen Transwell®-Membraneinsätze **A – F** von Corning aus **Tabelle 10**. Die Generierung der Daten erfolge über eine *1D-Plotgruppe* mit zwei *2D Schnittpunkten*. Einer der Auslesepunkte wurde hierbei in der Zellmonolage lokalisiert, während sich der andere am gleichen radialen Koordinatenpunkt, aber mit einer axialen Entfernung von 300 µm im Sensor befindet. T = 37 °C.

Für die permeablen Kultursubstrate **A**, **D**, **E** und **F** nimmt der pO₂ an beiden Auslesepunkten von 149 torr (t = 0 h) auf einen Gleichgewichtswert von ungefähr 130,1 torr nach t = 5 h ab. Aus dem zeitabhängigen Verhältnis der pO₂ Werte in der Zellmonolage und im Sensor geht hervor, dass der größte Unterschied nach 6 min ist. Nach fünf Stunden hingegen sind diese nahezu identisch und es wird lediglich eine Diskrepanz beim berechneten Verhältniswert ab der vierten Nachkommastelle von

0,99967 (System 1A) über 0,99969 (System 1D), 0,99956 (System 1E) bis hin zu 0,99938 (System 1F) ersichtlich. Allerdings sind diese feinen Nuancen bei der bloßen Betrachtung der Ergebnisse kaum sichtbar und würden vermutlich auch bei der *in vitro* Analyse keine Bedeutung haben. Die größte Abweichung der zeitabhängigen pO_2 Verläufe ist im System 1B zu beobachten. Hier liegt der pO_2 Wert im Gewebe nach einer Stunde bei 130,2 torr, während dieser im Sensor einen Wert vom 131,3 torr annimmt. Die Differenz von nahezu 0,8 % bleibt mit einem pO_2 Unterschied von 129,7 torr (—) gegenüber 130,7 torr (—) auch bei $t = 5$ h erhalten.

Die Ergebnisse der zeitabhängigen Sauerstoffgradienten sowohl in der Zellmonolage als auch im Sensor für die Systeme mit permeablen Kultursubstraten des Herstellers Sabeu sind in **Abbildung 39** dargestellt.

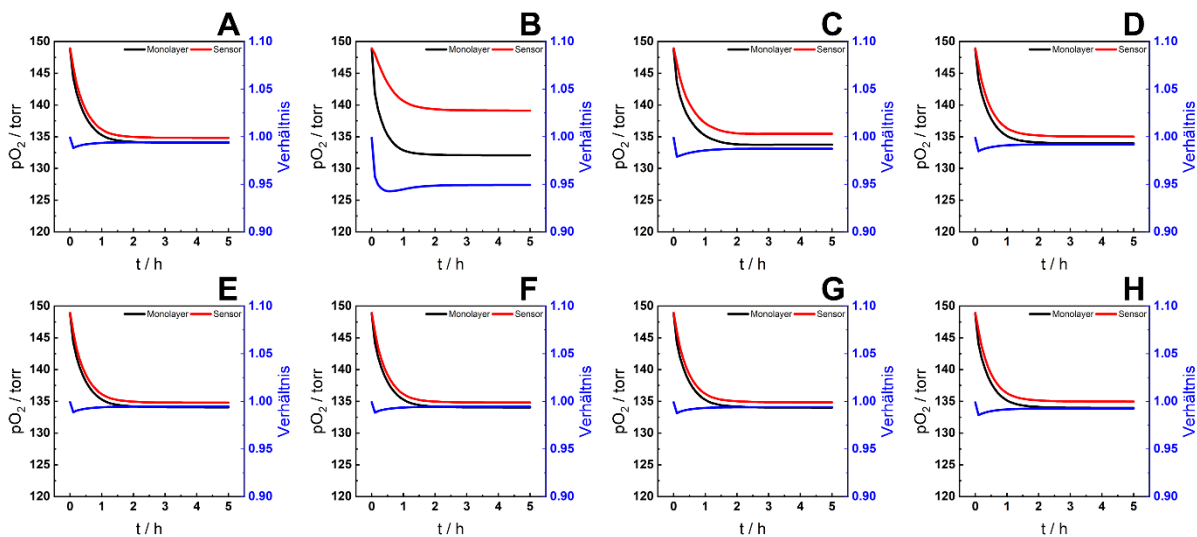


Abbildung 39: Darstellung des zeitabhängigen Verlaufs des pO_2 in den adhärenenten Zellen im *Monolayer* (—) sowie in der Sauerstoff-sensitiven Sensorfolie (—) für die jeweiligen cellQART®-Membraneinsätze **A – H** von Sabeu aus **Tabelle 10**. Die Generierung der Daten erfolge über eine 1D-Plotgruppe mit zwei 2D Schnittpunkten. Einer der Auslesepunkte wurde hierbei in der Zellmonolage lokalisiert, während sich der andere am gleichen radialen Koordinatenpunkt, aber mit einer axialen Entfernung von 1000 μm im Sensor befindet. $T = 37^\circ C$.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen in **Abbildung 38** ist für alle Systeme (**A – H**) von Sabeu eine deutliche Abweichung des zeitabhängigen pO_2 Verlaufs zwischen dem Messpunkt im Sensor und demjenigen im Gewebe zu beobachten. Am ausgeprägtesten sind die Unterschiede für das System 2B mit einer Abweichung von ungefähr 6,1 % nach 30 min und 5,3 % bei $t = 5$ h. Analog zu den permeablen

Kultursubstraten von Corning ist bei den übrigen cellQART®-Membraneinsätzen nach 6 min die stärkste Diskrepanz zwischen den jeweiligen pO₂ Werten zu beobachten. Nach 5 h ist in allen Fällen ein Gleichgewicht erreicht, wobei die prozentualen Abweichungen, gemäß der Reihenfolge in **Tabelle 11**, zunehmen.

Tabelle 11: Prozentuale Abweichung der pO₂ Werte im Gewebe und im Sensor (t = 5 h) für die jeweiligen cellQART®-Membraneinsätze von Sabeu in aufsteigender Reihenfolge.

System	Porosität ϵ	Effektiver Diffusionskoeffizient (O ₂) / m ² s ⁻¹	Abweichung / %
2E	0,141	4,7·10 ⁻¹⁰	0,55
2A	0,126	4,2·10 ⁻¹⁰	0,58
2F	0,118	3,9·10 ⁻¹⁰	0,58
2G	0,101	3,3·10 ⁻¹⁰	0,62
2H	0,05	1,7·10 ⁻¹⁰	0,75
2D	0,042	1,4·10 ⁻¹⁰	0,81
2C	0,016	5,2·10 ⁻¹¹	1,28
2B	0,003	8,3·10 ⁻¹²	5,34

5.2.2 Einfluss der Distanz zwischen Zellschicht und Sensorfolie

Trotz der Tatsache, dass die permeablen Kultursubstrate 1A und 2A, 1D und 2E sowie 1F und 2H, mit Ausnahme der Membrandicke, identische Eigenschaften hinsichtlich der Porosität und des daraus resultierenden effektiven Diffusionskoeffizienten besitzen (siehe **Tabelle 10**), weichen die zeitabhängigen pO₂ Verläufe im Gewebe und im Sensor voneinander ab. Aus **Abbildung 38** und **Abbildung 39** wird ersichtlich, dass die Diskrepanzen bei den cellQART®-Membraneinsätzen von Sabeu stärker ausgeprägt sind als bei den Transwell®-Membraneinsätzen von Corning. Dies könnte möglicherweise damit zusammenhängen, dass der Abstand zwischen den Zellen und dem Sensor bei Ersterem 1000 µm ist und bei Zweiterem lediglich 300 µm. Demnach wurde im Folgenden untersucht, inwiefern die unterschiedlichen Distanzen zwischen

Sensor und Membran diesen Sachverhalt tatsächlich beeinflussen. Dazu wurde zum einen der Fall modelliert, dass der Membraneinsatz direkt auf der Sensoroberfläche platziert wurde und folglich keine Distanz zwischen beiden besteht. Experimentell kann dies insofern realisiert werden, indem das Gerüst der Membraneinsätze entfernt wird. Zum anderen wurden die Abstände systematisch variiert (300 μm , 500 μm und 1000 μm). *In vitro* können für diesen Zweck Ringe unterschiedlicher Dicke aus PDMS (Polydimethylsiloxan) verwendet werden, mit deren Hilfe die Membraneinsätze in der Höhe verstellbar sind. Zu diesem Zweck wurde im Zuge der *in silico* Untersuchung die Membran mit der höchsten Porosität modelliert (Porengröße: 3,0 μm ; Porendichte: $2 \cdot 10^6$ Poren $\cdot\text{cm}^{-2}$; Porosität: 0,141; effektiver Diffusionskoeffizient: $4,7 \cdot 10^{-10}$ $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$). Zusätzlich zu den verschiedenen Distanzen wurde geprüft, inwiefern die Lokalisierung der Auslesepunkte für die Visualisierung des zeitabhängigen pO_2 Verlaufs eine Rolle spielt. Dazu wurden insgesamt vier Auslesepunkte mit folgenden räumlichen Zuweisungen definiert (siehe **Abbildung 40**): *Monolayer* Zentrum (a), Sensor Zentrum (b), *Monolayer* Rand (c) und Sensor Rand (d).

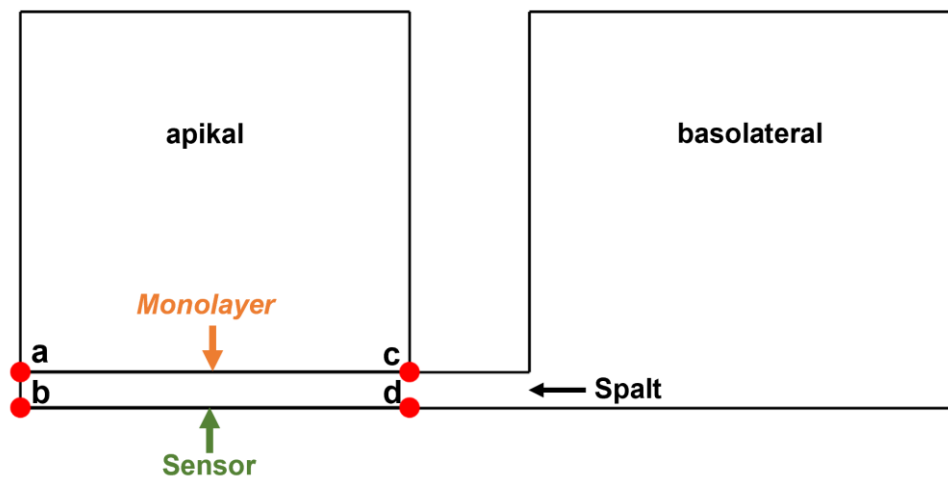


Abbildung 40: Darstellung der 2D-achsensymmetrischen Geometrie eines Wells einer 24-Well Platte mit einem permeablen Kultursubstrat. Die Zellen sind auf der permeablen Membran des Kultursubstrates kultiviert, während sich die Sensorfolie am Boden der 24-Well Platte befindet. Der zeitabhängige pO_2 Verlauf im *Monolayer* und im Sensor wurde durch eine 1D-Punktauswertung von vier Auslesepunkten mit folgender Lokalisierung visualisiert: *Monolayer* Zentrum (a), Sensor Zentrum (b), *Monolayer* Rand (c) und Sensor Rand (d).

Die resultierenden zeitabhängigen Sauerstoffgradienten für die verschiedenen Setups hinsichtlich der Zell-zu-Sensor Distanzen sind für den jeweiligen Auslesepunkt in **Abbildung 41** dargestellt.

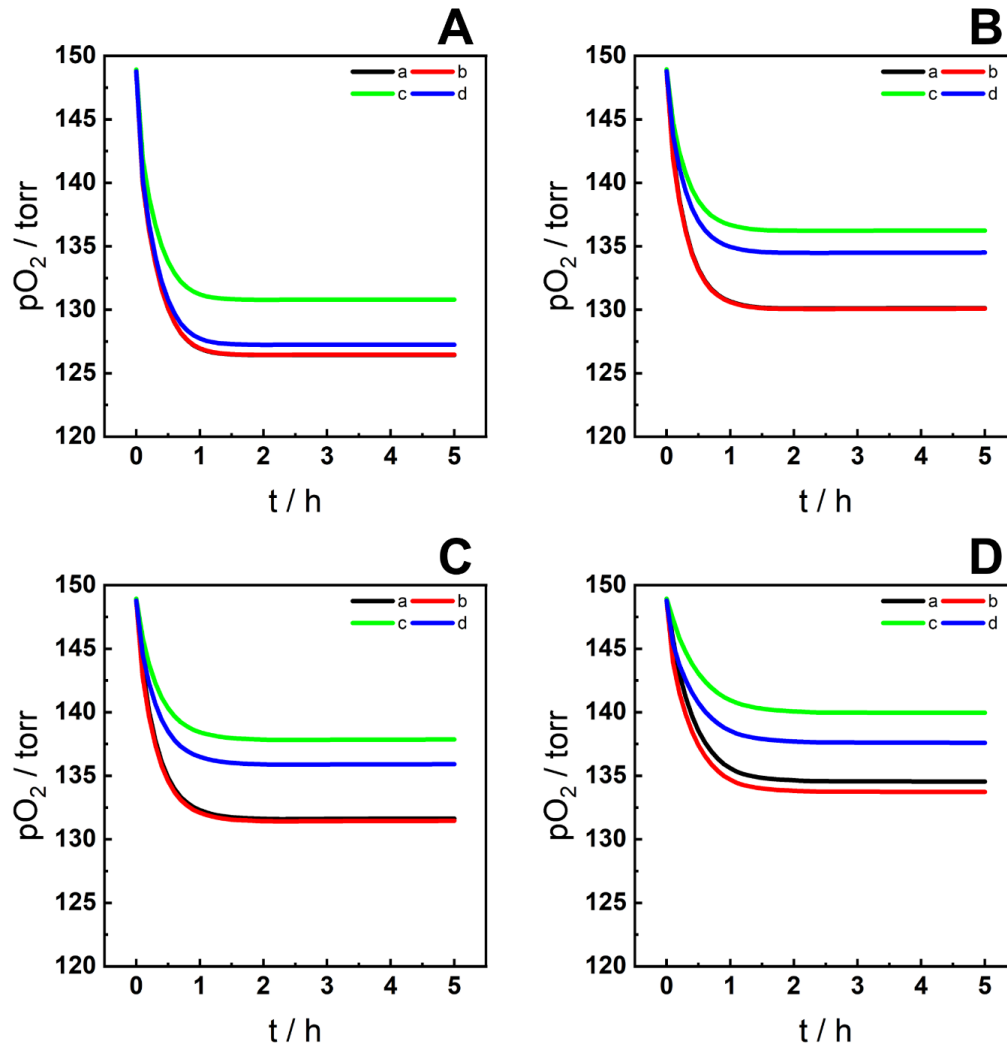


Abbildung 41: Zeitverlauf des Sauerstoffpartialdruckes sowohl im Zentrum (—) und am Rand (—) der Zellmonolage als auch im Zentrum (—) und am Rand (—) der Sauerstoff-sensitiven Sensorfolie für verschiedene Abstände zwischen Zellen und Sensor. In (A) wurde der Membraneinsatz direkt auf der Sensoroberfläche modelliert. Die Distanzen wurden zudem systematisch von 300 µm (B) über 500 µm (C) bis hin zu 1000 µm (D) variiert. $T = 37^\circ\text{C}$.

In allen Fällen (A – D) nimmt der Sauerstoffpartialdruck zunächst sowohl für die generierten Auslesepunkte im Zentrum (a, b) als auch am Rand (c, d) bis zum Erreichen eines individuellen Gleichgewichtswertes ab. Zudem wird ersichtlich, dass bei allen untersuchten Distanzen eine Varianz zwischen den pO_2 Verläufen am Rand des *Monolayers* (c) und denjenigen im Sensor (d) vorliegt. Der Unterschied in den

Gleichgewichtswerten nach 5 h ist dabei für den Fall, dass der Membraneinsatz direkt auf der Sensorfolie platziert ist, mit $\Delta pO_2 = 3,6$ torr am größten, sinkt für 300 μm (**B**) auf 1,7 torr und steigt anschließend wieder auf 2,4 torr für 1000 μm (**D**). Die Zeitverläufe im Zentrum des *Monolayers* (a) und des Sensors (b) sind hingegen identisch für den Fall, dass kein Abstand (**A**) zwischen den Zellen und dem Sensor ist. Hier sinkt der pO_2 Wert von anfänglichen 149 torr auf einen Gleichgewichtswert von 126,4 torr nach $t = 1,7$ h. Bei einem Abstand von 300 μm (**B**) zwischen den Zellen und dem Sensor wird ebenfalls nach 1,7 h ein endgültiger pO_2 Wert von 130,1 torr an den zentralen Punkten des *Monolayers* und des Sensors erreicht. Durch eine weitere Vergrößerung des Zell-zu-Sensor Abstandes wird einerseits die prozentuale Abweichung der pO_2 Verläufe im Zentrum immer größer und andererseits erfolgt die Abnahme des pO_2 langsamer. Bei 500 μm (**C**) weichen die Endwerte nach 1,9 h um 0,1 % (a:131,6 torr; b:131,5 torr) voneinander ab und bei 1000 μm (**D**) liegt die Diskrepanz bei 0,5 % (a:134,5 torr; b:133,7 torr, $t = 3,5$ h). Somit wird die geäußerte Vermutung bestätigt, dass eine zunehmende Distanz zwischen dem *Monolayer* und dem Sensor dazu führt, dass die pO_2 Verläufe stärker voneinander abweichen und somit zu falschen Interpretationen bei *in vitro* Experimenten führen können. Der Zeitverlauf des pO_2 , welcher zentral in den Zellen ausgelesen wurde, wird für die verschiedenen Setups in **Abbildung 42** dargestellt, um diese besser vergleichen zu können. Wie bereits erwähnt, nimmt der pO_2 im Gleichgewicht mit steigendem Spalt zwischen Zellen und Sensor zu. Bei einem Abstand von 1000 μm liegt der endgültige pO_2 Wert um 8,1 torr höher als für den Fall, dass dieser 0 μm beträgt. Zudem wird der Effekt der beidseitigen Sauerstoffdiffusion ersichtlich, wenn man den pO_2 Verlauf für den 24-Well Membraneinsatz (—) als impermeables Substrat mit den Systemen mit permeablen Membraneinsätzen vergleicht. Im Gegensatz zu Letzteren liegt dabei die Sauerstoffkonzentration im Gleichgewichtszustand mit 125,5 torr am niedrigsten, wenngleich der Abfall des pO_2 analog ist zu dem Filtersystem ohne Spalt.

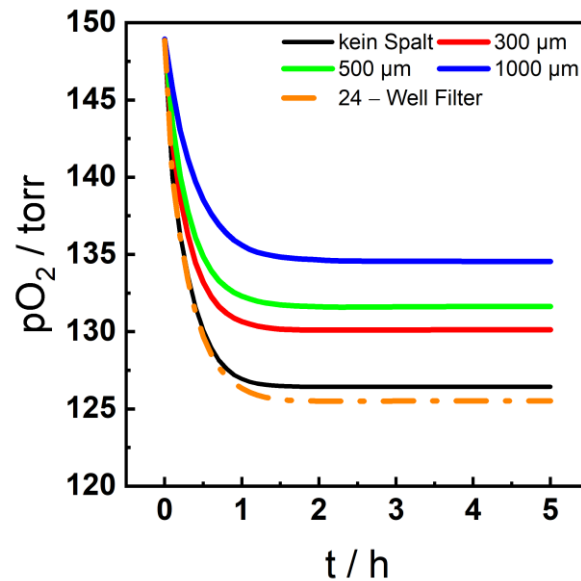


Abbildung 42: Vergleich der Zeitverläufe des pO_2 , welche in den Zellen ausgelesen wurden, für die verschiedenen Setups (kein Spalt, 300 µm, 500 µm und 1000 µm). Zusätzlich wird der zeitabhängige pO_2 Verlauf für den Membraneinsatz als imaginäres impermeables System (—) gezeigt, um die Auswirkungen der Sauerstoffdiffusion von beiden Seiten des *Monolayers* zu veranschaulichen. $T = 37\text{ °C}$.

5.2.3 Einfluss der Membran als Diffusionsbarriere

Um die Einflüsse der Membran der permeablen Kultursubstrate als Diffusionsbarriere für Sauerstoff zu untersuchen, wurden die adhärenenten Zellen im *Monolayer* auf den verschiedenen Seiten der Membran modelliert: auf der Oberseite der Membran im apikalen Kompartiment, auf der Unterseite der Membran und je eine Zellmonolage auf beiden Seiten. In jedem der Fälle wurde eine Zell-zu-Sensor Distanz von 300 µm mit einer Porosität der Filtermembran von 0,141 gewählt, da hier kaum Abweichungen zwischen den zentralen zeitabhängigen pO_2 Verläufen der Zellen und der Sauerstoffsensitiven Sensorfolie auftreten (siehe **Kapitel 5.2.1** und **5.2.2**). Unter der Annahme, dass die Zellen auf der Oberseite der Membran kultiviert sind und somit mit der basolateralen Seite zur Sensorfolie orientiert sind, nimmt der Sauerstoffpartialdruck, wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben, linear ab (— in **Abbildung 43**), bis ein Wert von 130,1 torr erreicht ist. Ein ähnlicher Verlauf ist auch dann zu beobachten, wenn die Zellen der Sauerstoff-sensitiven Sensorfolie mit der apikalen Seite zugewandt

sind (—). Der einzige Unterschied besteht darin, dass die pO_2 Werte ab $t = 30$ min um ungefähr 0,4 % niedriger liegen. Die Modellierung von adhärenenten Zellen im *Monolayer* auf beiden Seiten der Membran führt zur Bildung eines *Multilayers* mit der Filtermembran als Trennschicht (—) und somit zu einer stärkeren Abnahme der Sauerstoffkonzentration mit einem resultierenden Minimalwert von 110,9 torr.

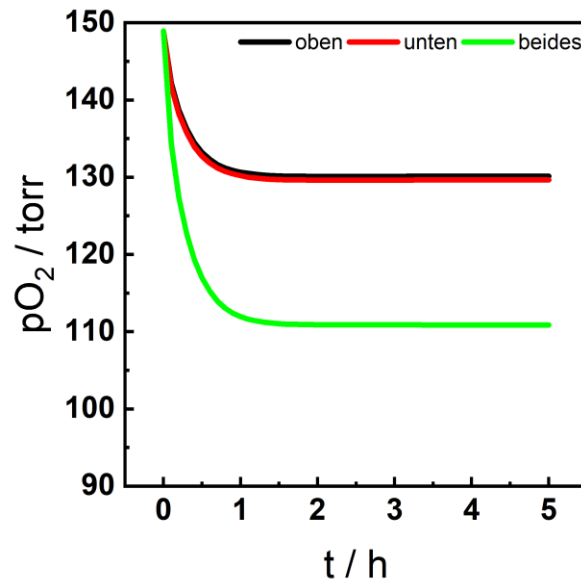


Abbildung 43: Zeitabhängiger Verlauf des pO_2 für adhärenente Zellen im *Monolayer*, welche auf den verschiedenen Seiten der Filtermembran modelliert sind. Für die Simulation der schwarzen Kurve wurden der *Monolayer* auf der Oberseite der Membran modelliert und für die rote Kurve auf der Unterseite. Die Abnahme des pO_2 im Sensor für einen *Monolayer* auf beiden Seiten der Membran wird durch die grüne Kurve repräsentiert. $T = 37$ °C.

Unter der grundlegenden Annahme, dass jede Zelle im *Monolayer* eine Verbrauchsrate von $32 \text{ amol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Zelle}^{-1}$ besitzt, ergeben die globalen Verbrauchsdaten für den Fall eines *Monolayers* auf je einer Seite der Membran ähnliche Werte von $1,16 \text{ pmol} \cdot \text{s}^{-1}$. Die Sauerstoffverbrauchsrate R_{global} für den *Multilayer* hingegen liegt doppelt so hoch mit einem Wert von $2,32 \text{ pmol} \cdot \text{s}^{-1}$.

5.2.4 Einfluss der Höhe der Flüssigkeitssäule im apikalen Kompartiment

Analog zu **Kapitel 5.1.4** wurde für die permeablen Kultursubstrate untersucht, inwiefern die Sauerstoffgradienten durch die Höhe der Flüssigkeitssäule im apikalen Kompartiment beeinflusst werden. Basierend auf den Ergebnissen der vorherigen Kapitel wurde dafür das permeable Kultursubstrat mit einem Abstand von 300 µm zwischen den Zellen und dem Sensor und einer Filtermembran mit der höchsten Porosität (Porosität: 0,141; effektiver Diffusionskoeffizient für Sauerstoff: $4,7 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) modelliert. Die Höhe der Flüssigkeitssäule im apikalen Kompartiment wurde gemäß **Gleichung (27)** für drei verschiedene Volumina berechnet (siehe **Tabelle 12**). Infolge der zugrundeliegenden Annahme, dass die Flüssigkeitssäulen im apikalen und basolateralen Kompartiment stets ausgeglichen sind, um einen zusätzlichen hydrostatischen Fluss zu vermeiden, wurde das Volumen des basolateralen Kompartiments dementsprechend angepasst.

Tabelle 12: Variation der Diffusionsabstände zwischen der Luft/Medium Grenzfläche und den Zellen durch eine Variation der Volumina im apikalen Kompartiment.

Volumen / µL	Höhe der Flüssigkeitssäule / mm
100	3,01
200	6,02
300	9,03

Durch die Simulationsergebnisse in **Abbildung 44** wird deutlich, dass je größer das Volumen im apikalen Kompartiment ist, desto stärker ist die Abnahme des pO_2 .

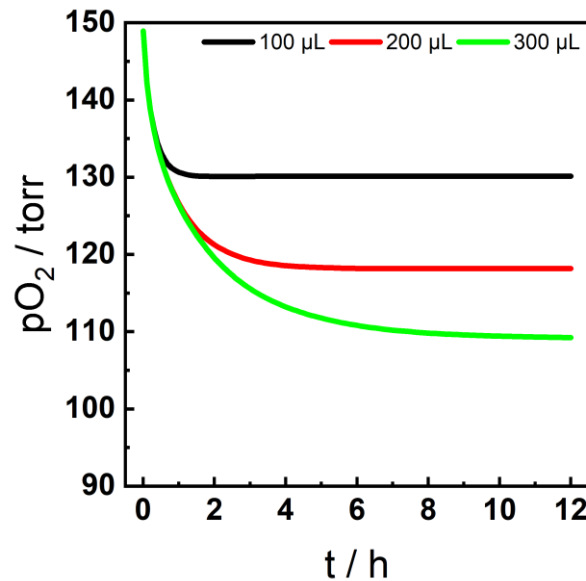


Abbildung 44: Darstellung des Sauerstoffpartialdruckes (pO_2) als Funktion der Zeit, welcher sich im Zuge der Diffusions- und Veratmungsprozesse der Zellen für die simulierten Modelle verändert. Betrachtet wurden permeable Kultursubstrate für eine 24-Well Platte mit drei unterschiedlichen Volumina (100 μ L, 200 μ L und 300 μ L) im apikalen Kompartiment. Es wurde eine Zell-zu-Sensor Distanz von 300 μ m und eine Porosität der Membran von 0,141 modelliert. $T = 37^\circ\text{C}$.

In den ersten 24 min sinkt der Sauerstoffpartialdruck für die verschiedenen Volumina zunächst synchron von anfänglichen 149 torr auf einen Wert von ungefähr 134 torr. Für 100 μ L Medium im apikalen Kompartiment (—) wird schließlich ein Endwert von 130,1 torr beobachtet, während dieser für 200 μ L (—) bei 118,2 torr liegt und für 300 μ L (—) bei 109,2 torr. Neben den Unterschieden in der Abnahme der pO_2 Werte wird zudem der Gleichgewichtszustand zu verschiedenen Zeitpunkten erreicht. Für ein Volumen von 100 μ L hat sich das Gleichgewicht aus Sauerstoffdiffusion und Sauerstoffverbrauch bereits nach 1,7 h eingestellt, bei 200 μ L erst nach 5,4 h und bei 300 μ L nach 11,9 h. Die 3D Plots in **Abbildung 45** zeigen die Sauerstoffgradienten nach 12 h und unterstützen die Ergebnisse aus **Abbildung 44**.

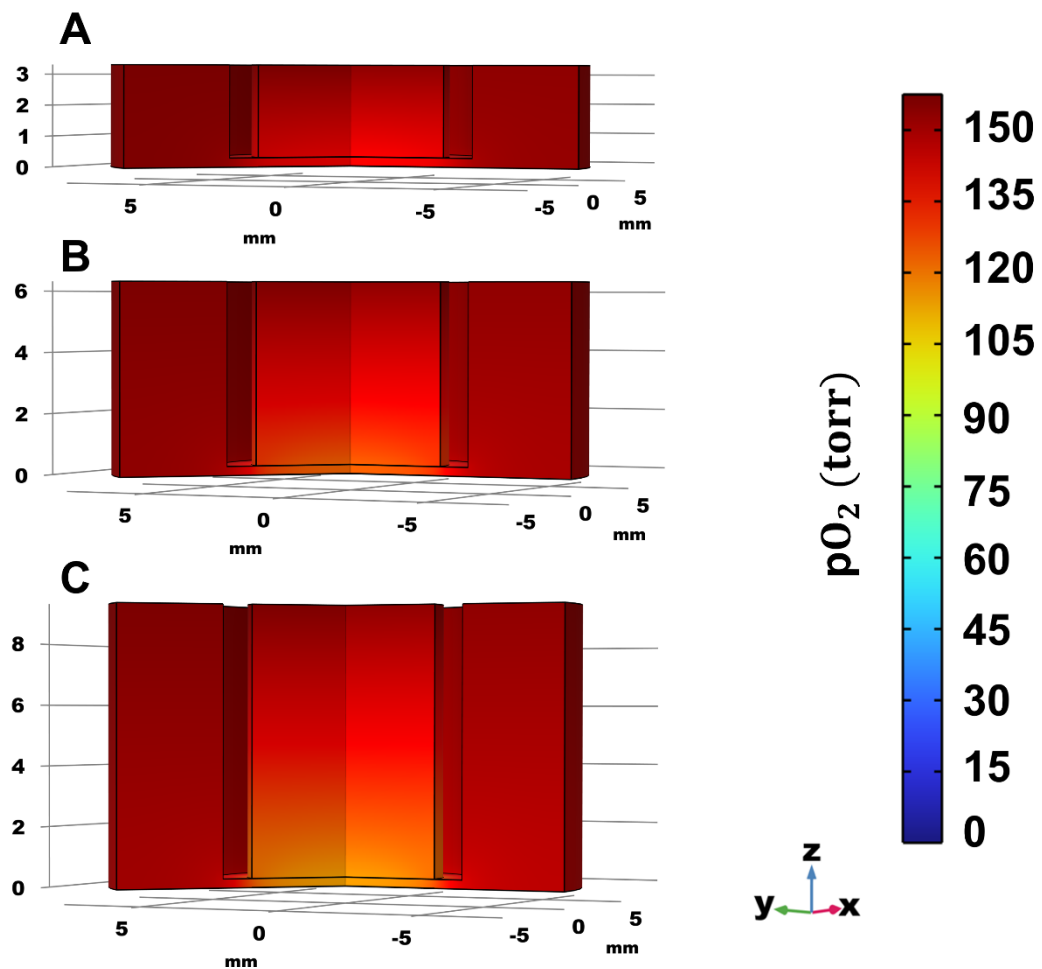


Abbildung 45: 3D-Plots für die Visualisierung der Sauerstoffgradienten in den modellierten Systemen mit unterschiedlichen Volumina im apikalen Kompartiment (**A**: 100 μL ; **B**: 200 μL ; **C**: 300 μL). Durch die Annahme gleichhoher Flüssigkeitssäulen im apikalen sowie im basolateralen Kompartiment erhöht sich mit zunehmendem Volumen im apikalen Kompartiment ebenso die Höhe der Flüssigkeitssäule im basolateralen Kompartiment. Infolge der *2D-achsensymmetrischen* Natur des Modells können die Ergebnisse durch einen *Rotations-Datensatz* in 3D dargestellt werden.

Während für ein Volumen von 100 μL (**A**) optisch kaum eine Veränderung des Sauerstoffpartialdruckes zu beobachten ist, werden die Gradienten für 200 μL Volumen im apikalen Kompartiment (**B**) und für 300 μL (**C**) ersichtlicher. Diese Tatsache geht mit den prozentualen Abnahmen des pO_2 in **Abbildung 44** einher. Diese betragen bei $t = 12 \text{ h}$ 12,7 % für das Modell in (**A**;—), 20,7 % bei (**B**;—) und 26,7 % für die Simulation in (**C**;—).

5.2.5 Diskussion

Die Simulationsergebnisse zur Sauerstoffverteilung in Systemen mit permeablen Kultursubstraten haben gezeigt, dass die Verlässlichkeit der darauf ausgerichteten *in vitro* Technik mit planaren Sauerstoff-sensitiven Sensorfolien im Wesentlichen von drei Faktoren abhängt: den Eigenschaften der permeablen Filtermembran, den Distanzen zwischen den auf der Membran kultivierten Zellen und der Sensorfolie sowie den Volumina im apikalen Kompartiment. Hierbei sei anzumerken, dass weitere Kriterien, wie beispielsweise der Zelltyp, die Zelldichte, die zelluläre Verbrauchsrate sowie die offene Randbedingung an der Luft/Medium Grenzfläche ebenfalls den Sauerstofftransport und damit den Gesamtverbrauch beeinflussen. Allerdings sind diese Aspekte essenziell in jedem verwendeten Zellkultursystem und aufgrund der Tatsache, dass deren Auswirkungen bereits im vorherigen Kapitel für eine 96-Well Platte diskutiert wurden, wird hier nicht näher darauf eingegangen und auf **Kapitel 5.1** verwiesen. Unter den Annahmen, dass es sich bei jedem der betrachteten Systeme mit permeablen Kultursubstraten um ein offenes System handelt mit einem, von den Herstellern empfohlenen, Volumen von 100 μL im apikalen Kompartiment und einer konstanten zellulären Verbrauchsrate der adhärenter Zellen im *Monolayer*, wurden zunächst die Membraneinsätze der beiden Hersteller Corning und Sabeu untersucht. Diese unterscheiden sich hinsichtlich des strukturellen Designs und den Eigenschaften der Membranen. Bei Betrachtung des Verhältnisses der pO_2 Werte im Gewebe und im Sensor zu jedem Zeitpunkt der Messung (siehe **Abbildung 38** und **Abbildung 39**) wird ersichtlich, dass die Diskrepanz nach 6 min am ausgeprägtesten ist. Dies könnte damit begründet werden, dass die Zellen durch die mathematische Modellierung *in silico* sofort Sauerstoff veratmen und somit der Abfall des Sauerstoffpartialdruckes vor allem am Anfang minimal stärker ist als im Sensor. Hier tritt der Effekt der veratmenden Zellen erst mit einer kurzen Verzögerung ein. Bei der Betrachtung der Ergebnisse für die verwendeten Membranen von Corning mit einer Distanz zwischen den Zellen und dem Sensor von 300 μm (siehe **Abbildung 38**) wird deutlich, dass mit einer zunehmenden Porosität der Membran, und damit einem steigenden effektiven Diffusionskoeffizienten für Sauerstoff, der Unterschied zwischen der Sauerstoffverteilung im Sensor und in der Zellmonolage selbst immer kleiner wird. Die

Ergebnisse in **Abbildung 43** zeigen zudem, dass die Membran mit der höchsten Porosität keine bedeutende Diffusionsbarriere darstellt. Bei einer konstanten zellulären Verbrauchsrate ist es unwesentlich, ob die Zellen mit der apikalen oder basolateralen Seite dem Sensor zugewandt sind. Die pO_2 Werte weichen lediglich um ungefähr 0,4 % zu jedem Zeitpunkt der Messung voneinander ab. Diese marginale Diskrepanz würde *in vitro* möglicherweise kaum ersichtlich werden, da bei der Messung auftretende Nebeneffekte eine solch genaue Differenzierung überlagern würden. Im Falle des *Multilayers* ist ein drastischerer Abfall des pO_2 zu beobachten. Zudem ergibt die Simulation für die Kultivierung eines *Monolayers* auf beiden Seiten der Membran einen Gesamtwert für R_{global} von $2,32 \text{ pmol} \cdot \text{s}^{-1}$ und somit das Doppelte von R_{global} für die einzelnen *Monolayer* ($R_{\text{global}} = 1,16 \text{ pmol} \cdot \text{s}^{-1}$) unabhängig von der Zellorientierung. Diese Tatsachen legen erneut nahe, dass die Membran mit eben dieser Porosität keine nennenswerte Diffusionsbarriere darstellt und weiterhin, dass eine Modellierung der Zellen mit doppelter Zellzahl im apikalen Kompartiment möglicherweise die gleiche Sensorantwort und den gleichen Wert für die globale Verbrauchsrate liefern würde, wie für den *Multilayer*. Das Simulationsergebnis für diese Vermutung ist in **Abbildung 46** gezeigt.

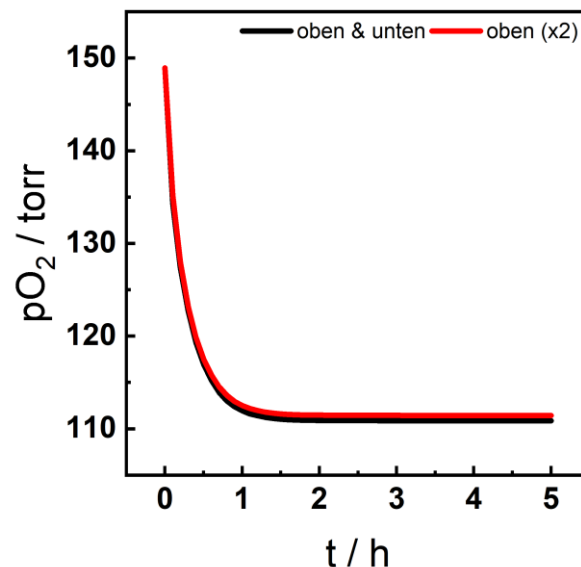


Abbildung 46: Sauerstoffpartialdruck (pO_2) als Funktion der Zeit für einen *Monolayer* mit doppelter Zellzahl im apikalen Kompartiment (—) gegenüber je einem *Monolayer* auf beiden Seiten der Membran (*Multilayer*) mit der Filtermembran als Trennschicht (—). $T = 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Der zeitabhängige pO_2 Verlauf ist nahezu identisch für den Fall eines modellierten *Zelllayers* unter der Annahme, dass dieser doppelt so viele Zellen enthält (—), wie der zuvor betrachtete *Multilayer* (—). Die Werte im Gleichgewichtszustand weichen nur geringfügig mit einer Differenz von circa 0,6 torr voneinander ab, was in einer *in vitro* Messung möglicherweise gar nicht ersichtlich werden würde. Die simulierten globalen Verbrauchsraten sind dabei für beide Fälle identisch. Somit zeigen die Ergebnisse in **Abbildung 38** und **Abbildung 43**, dass die Eigenschaften der Membran hinsichtlich Porengröße und Porendichte vielmehr die Verlässlichkeit der Sensortechnik beeinflussen als die Orientierung der Zellen auf der Membran. Es ist jedoch anzumerken, dass diese Faktoren nicht komplett unabhängig voneinander betrachtet werden können. Sollte *in vitro* eine Membran mit einer geringeren Porosität verwendet werden, kann diese sehr wohl als Diffusionsbarriere fungieren. Infolgedessen würde sich eine Kultivierung der Zellen auf der Unterseite der Membran empfehlen, da damit der Effekt der Membran als Barriere umgangen werden kann.

Für die cellQART®-Membraneinsätze von Sabeu ergeben sich, trotz ähnlicher intrinsischer Eigenschaften der Membran hinsichtlich der Porosität, wesentliche Unterschiede zwischen der Antwort im Sensor und in der Zellmonolage (siehe **Abbildung 39**). Dies könnte mit der Zell-zu-Sensor Distanz begründet werden, welche im Vergleich zu den Transwell®-Membraneinsätzen von Corning standardmäßig 1000 μm umfasst. Diese Vermutung wurde mit den Ergebnissen in **Kapitel 5.2.2** validiert, indem verschiedene Distanzen (kein Spalt, 300 μm , 500 μm und 1000 μm Spalt) unter der Annahme der höchsten Membranporosität modelliert wurden. Bei der Betrachtung der Sauerstoffpartialdrücke im Zentrum des Gewebes (siehe **Abbildung 42**) wird ersichtlich, dass sich die Gleichgewichtswerte mit zunehmender Distanz ändern. Je größer der Abstand zwischen den Zellen und der Sauerstoff-sensitiven Sensorfolie ist, desto größer ist das Volumen im Spalt und somit die Menge an gelöstem Sauerstoff. Demzufolge müssten, je nach Setup, die Zellen im *Monolayer* mehr Sauerstoff verbrauchen, damit die pO_2 Werte nach 5 h gleich wären. Allerdings wurde vorausgesetzt, dass die zelluläre Verbrauchsrate mit $32 \text{ amol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Zelle}^{-1}$ konstant ist. Dies hat zur Folge, dass die Differenz zwischen den pO_2 Werten bei $t = 0 \text{ h}$ und $t = 5 \text{ h}$ mit zunehmendem Abstand kleiner wird. Ein Vergleich zwischen

dem permeablen Kultursubstrat, in welchem die Distanz 0 μm beträgt, und dem 24-Well Membraneinsatz als impermeables System zeigt zudem, dass die pO_2 Werte grundsätzlich durch die beidseitige Diffusionsmöglichkeit von Sauerstoff beeinflusst werden. Während bei Ersterem eine zusätzliche Diffusion von Sauerstoff aus dem basolateralen Kompartiment gewährleistet ist, ist diese bei Zweiterem durch die Impermeabilität des Zellkulturgefäßes unterbunden. Dies führt zu höheren pO_2 Werten im System mit dem permeablen Kultursubstrat gegenüber der alleinigen Betrachtung des Membraneinsatzes als impermeables System. Werden die an den zentralen Auslesepunkten im *Monolayer* und im Sensor ausgewerteten Ergebnisse in **Abbildung 41 A – D** miteinander verglichen, wird deutlich, dass die Zunahme der Distanz zu einer größeren prozentualen Abweichung zwischen den pO_2 Werten im Gleichgewichtszustand führt. Dies kann ebenfalls durch die Zunahme des Volumens im Spalt und der konstanten zellulären Sauerstoffverbrauchsrate erklärt werden. Je größer die Zell-zu-Sensor Distanz ist, desto stärker sind die axialen Sauerstoffgradienten und demnach die prozentuale Abweichung in den pO_2 Werten im Sensor und in der Zellmonolage zum Zeitpunkt $t = 5 \text{ h}$. Eine weitere Beobachtung der Ergebnisse in **Abbildung 41 A – D** ist, dass sich die pO_2 Verläufe in der Peripherie der Zellmonolage und des Sensors in jedem der untersuchten Setups unterscheiden. Diese Beobachtungen können mit den lateralen Konzentrationsgradienten über die Länge des Spaltes in **Abbildung 47** erklärt werden. Diese sind zum Zeitpunkt $t = 5 \text{ h}$ (Gleichgewicht) für den Fall, dass der Membraneinsatz direkt auf der Sauerstoff-sensitiven Sensorfolie steht (—), am größten. Mit zunehmender Distanz zwischen Membran und Sensor nehmen diese ab. Sobald die Sauerstoffmoleküle in die Sauerstoff-sensitive Sensorfolie diffundieren (—), ist kein ausgeprägter lateraler Gradient mehr zu beobachten. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass der Diffusionskoeffizient von Sauerstoff in eben dieser um knapp das 100fache kleiner ist als im Medium selbst (siehe **Kapitel 4.3.2**). Infolgedessen können die Moleküle zwar durch die Folie diffundieren, dies geschieht aber bedeutend langsamer als für die Fälle, wenn der laterale Gradient in dem mit Medium gefüllten Spalt betrachtet wird.

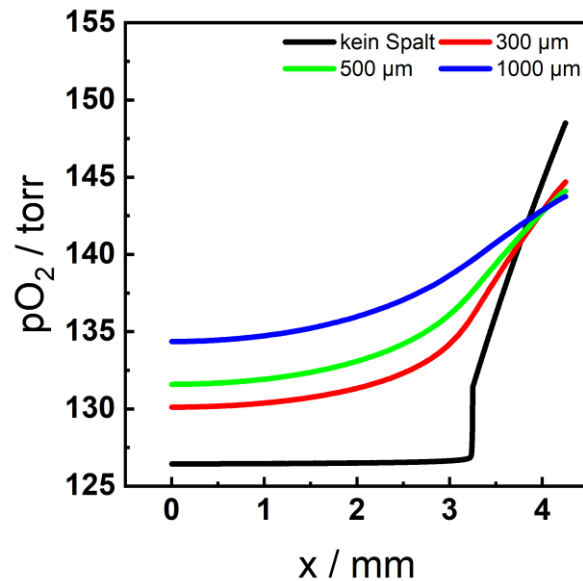


Abbildung 47: Darstellung der lateralen Sauerstoffgradienten über die Länge des Spaltes für die betrachteten Distanzen zwischen den Zellen und dem Sauerstoffsensor (kein Spalt, 300 µm, 500 µm und 1000 µm) zum Zeitpunkt $t = 5$ h. $T = 37$ °C.

Neben der lateralen Diffusion bei unterschiedlichen Distanzen zwischen der Zellmonolage und der Sauerstoff-sensitiven Sensorfolie wurde, analog zu **Kapitel 5.1.4**, die der axialen Diffusion durch eine Variation der Volumina im apikalen Kompartiment untersucht. Dazu wurde das System mit dem permeablen Kultursubstrat von Corning mit einer Distanz von 300 µm und einer Porosität der Filtermembran von 0,141 modelliert. Das Volumen und damit die Füllhöhe im apikalen Kompartiment variiert von den vom Hersteller empfohlenen 100 µL über 200 µL bis hin zur maximalen Füllmenge von 300 µL (siehe **Tabelle 12**). Mit zunehmendem Volumen steigen die Höhe der Flüssigkeitssäule und somit auch die Diffusionsstrecke für Sauerstoff von der offenen Luft/Medium Grenzfläche bis zu den Zellen. Um die für die Diffusion eines Sauerstoffmoleküls notwendige Zeit besser abschätzen zu können, wurde das *random walk model* angewendet. Dabei handelt es sich um ein isotropes Modell, welches auf der Brownschen Molekularbewegung basiert und die statistische Zeit liefert, in welcher ein Molekül eine bestimmte Wegstrecke zurücklegt (Codling et al., 2008). Die zugrundeliegende Formel lautet dabei für den eindimensionalen Fall wie folgt (H. C. Berg, 2018):

$$\langle x(t)^2 \rangle = \int_{-\infty}^{\infty} x^2 \cdot dx \cdot P(x) = 2Dt$$

(28)

mit der eindimensionalen zeitabhängigen Verschiebung des Moleküls $x(t)$, was der zurückgelegten Strecke entspricht, der wahrscheinlichen Verteilung des Moleküls $P(x)$, der Zeit t und dem Diffusionskoeffizienten D .

Gleichung (28) wurde an den dreidimensionalen Fall angepasst und anschließend wurde die statistische Diffusionszeit für die verschiedenen Höhen der Flüssigkeitssäulen berechnet (siehe **Tabelle 13**):

$$\langle x(t)^2 \rangle = 2dDt = 6Dt$$

(29)

mit $d = 3$ als Dimensionalität.

Tabelle 13: Berechnete Diffusionszeit für die verschiedenen Höhen der Flüssigkeitssäulen im apikalen Kompartiment nach dem dreidimensionalen *random walk model*.

Höhe der Flüssigkeitssäule / mm	Statistische Diffusionszeit / min
3,01	7,6
6,02	30,5
9,03	68,6

Mit Hilfe dieses statistischen Ansatzes könnten die Ergebnisse in **Abbildung 44** erklärt werden. Für jedes der betrachteten Volumina sinkt der pO_2 zunächst ab, was darauf hindeuten könnte, dass die Zellen zunächst den Sauerstoff in unmittelbarer Umgebung veratmen. Anschließend stellt sich der Gleichgewichtszustand zu unterschiedlichen Zeitpunkten ein. Im Falle von 100 μL Volumen ist das Gleichgewicht nach $t = 1,7$ h erreicht. Ähnliches berichteten Kouthouridis et al. (2021) für die FEM-Simulation einer Flüssigkeitssäule von 3 mm oberhalb adhärenter Zellen auf permeablen Kultursubstraten. Mit einer Zunahme des Volumens auf 200 μL ist das System erst nach 5,4 h und mit 300 μL nach 11,9 h im Gleichgewicht. Dies deckt sich mit der Schätzung des *random walk models*, da sich mit zunehmender Diffusionsstrecke die

Diffusionszeit für ein Molekül Sauerstoff von der Luft/Medium Grenzfläche zu den Zellen verlängert und infolgedessen auch der Zeitpunkt der Gleichgewichtseinstellung zwischen Diffusion und Verbrauch. Jedoch sei hierbei angemerkt, dass das *random walk model* lediglich einen Schätzwert für die Diffusionszeit liefert, da keine Konzentrationsgradienten berücksichtigt werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Transwell®- und cellQART®-Membraneinsätze den Stoffaustausch von der apikalen und basolateralen Seite der Membran ermöglichen. Sie stellen somit eine Kultivierungsmethode dar, welche es nicht nur erlaubt, zelluläre Transportprozesse sowie metabolische Aktivitäten zu untersuchen, sondern gleichzeitig die Analyse multipler Parameter, wie TEER-Werte (*transepithelial electrical resistance*) für die Quantifizierung der Barrierefunktion (Kouthouridis et al., 2021) oder die pH Messung. Aus den oben genannten Diskussionspunkten wird allerdings ersichtlich, dass für die Verwendung der ratiometrischen Sensortechnik zur Überwachung der Sauerstoffverteilung in Systemen mit permeablen Kultursubstraten einige Empfehlungen auf Basis der *in silico* Analyse ausgesprochen werden können. Auf jeden Fall empfiehlt es sich eine Membran mit der größten Porosität zu verwenden, da diese kaum eine Diffusionsbarriere für die Versorgung der Zellen mit Sauerstoff darstellt. Zudem sollte die Distanz zwischen den Zellen und dem Sensor so gering wie möglich gehalten werden, da mit einem zunehmenden Abstand die Antwort im Sensor nicht mehr derjenigen im Gewebe entspricht. Somit läuft man Gefahr, dass bei der bloßen Analyse der Ergebnisse im Sensor falsche Rückschlüsse auf die Atmungsaktivität der Zellen gezogen werden.

5.3 Proliferationsassays mit MCF-7 Zellen

Die Zellproliferation von MCF-7 Zellen wurde *in vitro* mit einem labelfreien und einem labelbasierten Assay untersucht. Dazu wurden die Zellen in geringen Zelldichten (15k, 20k und 25k Zellen·cm⁻²) ausgesät. Anschließend wurde deren Proliferationsverhalten einerseits kontinuierlich und andererseits zu bestimmten Zeitpunkten beobachtet und es wurden Rückschlüsse auf die zugrundeliegenden Verdopplungszeiten gezogen.

5.3.1 Impedimetrische Analyse mittels ECIS

Für die Analyse der Proliferation mittels ECIS wurden MCF-7 Zellen, wie in **Kapitel 4.1.8.1** beschrieben, in verschiedenen Zelldichten (15k, 20k, 25k, 50k und 100k Zellen·cm⁻²) in die Wells eines Elektrodenarrays vom Typ 8W10E+ ausgesät. Die Zellproliferation wurde daraufhin impedimetrisch in drei unabhängigen Messreihen über 130 h beobachtet, wobei die Aussaat der Zellen in den Dichten 50k und 100k Zellen·cm⁻² in je zwei Wells des Arrays nur in der ersten Messreihe erfolgte. Dies liegt darin begründet, dass durch die höhere Zelldichte der Minimalwert der Kapazität nach vollständiger Elektrodenbedeckung schneller bestimmt werden kann. Die Datenanalyse und -darstellung der zunehmenden Bedeckung der Elektroden durch adhätierende Zellen erfolgt anhand des Zeitverlaufs der Kapazität C bei 40 kHz, welcher in **Abbildung 48** dargestellt ist. Die Messung der Kapazität in höheren Frequenzbereichen (meistens > 10 kHz) eignet sich besonders für die sensitive Quantifizierung der Adhäsion und Proliferation (Lukic & Wegener, 2015), da hier eine lineare Korrelation zwischen der Abnahme der Kapazität und der Zunahme der Elektrodenbedeckung mit Zellen zu verzeichnen ist (Wegener et al., 2000).

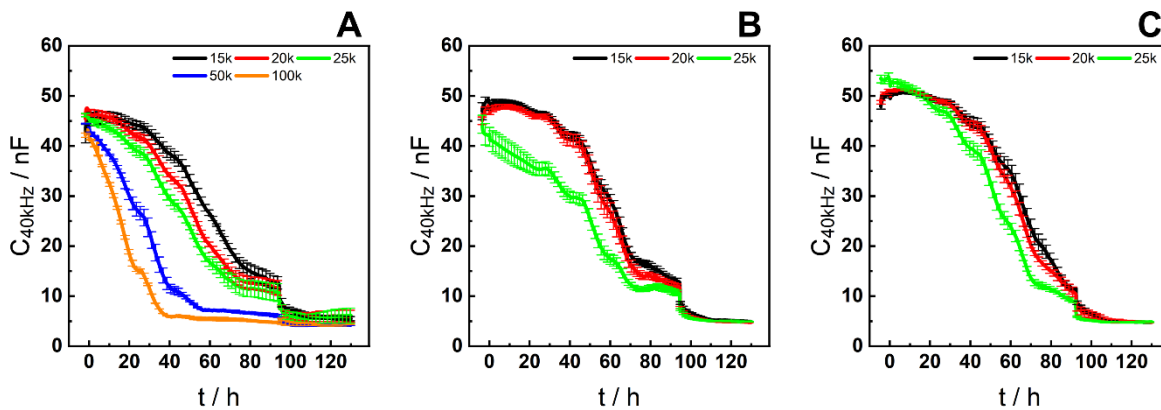


Abbildung 48: Zeitverlauf der Kapazität C bei 40 kHz für die Zellproliferation von MCF-7 Zellen. In allen drei Messreihen (**A**, **B**, **C**) wird der gemittelte Zeitverlauf von drei verschiedenen Aussaatdichten (15k, 20k und 25k Zellen·cm⁻²; MW \pm SEM; $n = 4(3)$) aus jeweils vier verschiedenen Wells eines 8W10E+ Elektrodenarrays innerhalb eines Experiments dargestellt. Die erste Messreihe (**A**) zeigt zudem den gemittelten zeitabhängigen Kapazitätsverlauf zweier zusätzlicher Aussaatdichten (50k und 100k Zellen·cm⁻²) aus je zwei Wells des Arrays (MW \pm SEM; $n = 2(1)$). Die Elektroden wurden vorher mit einer Poly-L-Lysin Lösung beschichtet und die Experimente wurden in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ durchgeführt, wobei $t = 0$ h den Zeitpunkt der Zellaussaat markiert.

Abbildung 48 zeigt den zeitabhängigen Kapazitätsverlauf unterschiedlicher Aussaatdichten bei 40 kHz für drei unabhängige Messreihen (**A** – **C**). Die anfänglichen Kapazitätswerte für zellfreie Elektroden liegen zwischen $(42,2 \pm 0,4)$ nF (— in **A**) und $(53,0 \pm 0,9)$ nF (— in **C**). Für die Aussaatdichten von 25k Zellen·cm⁻² (—) und 50k Zellen·cm⁻² (—) ist ein sofortiger linearer Abfall der Kapazität zu beobachten, während diese bei den anderen Zelldichten zunächst leicht ansteigt und anschließend fällt. Der Abfall ist dabei umso steiler je höher die Zelldichte ist. Bei $t = 26 - 29$ h nach Zellaussaat ist für alle Zelldichten eine erste Plateauphase zu verzeichnen. Insgesamt bilden sich vier Plateaus bei den Kapazitätsverläufen für die Zelldichten 15k, 20k, 25k Zellen·cm⁻² und zwei Plateaus für 50k und 100k Zellen·cm⁻² aus. Auf jede der Plateauphasen folgt ein weiterer linearer Abfall der Kapazität. Circa 60 h nach Zellaussaat erreicht die Kapazität für 100k Zellen·cm⁻² (— in **A**) einen konstanten Wert von ungefähr 5 nF. Bei den übrigen Zelldichten ist dieser Wert auch nach 93 h noch nicht erreicht. Je nach Zelldichte liegt der Kapazitätswert hier zwischen $(6,1 \pm 0,4)$ nF (— in **A**) und $(12,9 \pm 0,7)$ nF (— in **B**). Nach einem Wechsel des Mediums ist ein drastischer Abfall der Kapazität zu beobachten. Während die Kapazität der Elektroden für die Zelldichten 25k und 50k Zellen·cm⁻² unmittelbar nach dem Medienwechsel einen konstanten Verlauf annimmt, sinkt die der kleineren Zelldichten geringfügig weiter.

Nach 130 h erreicht die Kapazität für alle Aussaatdichten Endwerte zwischen $(4,2 \pm 0,2)$ nF (— in **A**) und (6 ± 2) nF (— in **A**). Aus den Wendepunkten der Kapazitätsverläufe in **Abbildung 48** wurde der Zeitpunkt, an dem sich die initiale Zellzahl das erste Mal verdoppelt, pro Messreihe entnommen. Die gemittelten Werte für die jeweiligen Aussaatdichten sind in **Tabelle 14** angegeben.

Tabelle 14: Verdopplungszeiten in Stunden nach ECIS für MCF-7 Zellen unterschiedlicher Aussaatdichten. Für die jeweiligen Aussaatdichten wurden die Zeiten aus den Wendepunkten der Kapazitätsverläufe der jeweiligen Messreihe entnommen und anschließend gemittelt (MW \pm SEM; $n \geq 4(3)$).

Aussaatdichte / Zellen·cm ⁻²	Verdopplungszeit / h
15k	27,10 \pm 0,22
20k	27,62 \pm 0,17
25k	27,48 \pm 0,19
50k	27,6 \pm 0,2
100k	26,2 \pm 0,1

Die unterschiedlichen Kapazitätswerte zu Beginn der Messung liegen darin begründet, dass für jede Messreihe ein neues Elektrodenarray verwendet wurde. Der anschließende kontinuierliche Abfall der Kapazität deutet auf eine sukzessive Zunahme der MCF-7 Population auf der Elektrodenoberfläche als Folge der Proliferation hin (Stolwijk et al., 2012) und ist ähnlich in den drei Messreihen. Bei den Aussaatdichten 25k und 50k Zellen·cm⁻² sinkt die Kapazität sofort, während sie bei den Übrigen nach Zellaussaat zunächst leicht ansteigt. Eine mögliche Ursache hierfür könnte die Überlagerung von Reinigungseffekten der Elektroden mit denjenigen der Zelladhäsion sein. Der Abfall wiederum ist umso steiler je höher die initiale Aussaatdichte ist. Je mehr Zellen ausgesät wurden, desto größer ist die anfängliche Zellbedeckung der Elektroden und infolgedessen sinkt die Kapazität schneller. Die unterschiedlichen Plateaus geben Aufschluss über die Adhäsion und die anschließend einsetzende Proliferation der Zellen. Zunächst adhärieren die Zellen auf der Elektrodenoberfläche, was zu konstanten Werten in der Kapazität führt, während diese durch den einsetzenden Proliferationsprozess weiter absinkt. Dies findet so lange statt,

bis die gesamte Elektrodenoberfläche mit Zellen bedeckt ist und, unabhängig von der initialen Aussaatdichte, ein konstanter Minimalwert von circa 5 nF erreicht ist. Der abrupte Abfall der Kapazität nach dem Wechsel des Mediums bei ungefähr 93 h deutet auf einen Nährstoffmangel hin. Würde die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen kontinuierlich aufrechterhalten bleiben, würden die Proliferationsprozesse nicht gehemmt und der minimale Kapazitätswert würde gegebenenfalls früher als nach 130 h erreicht werden. Wie aus **Tabelle 14** hervorgeht, sind die Verdopplungszeiten von allen Aussaatdichten sehr ähnlich. In der Literatur wird von Verdopplungszeiten von 18 – 39 h für MCF-7 Zellen berichtet (Aghamiri et al., 2019; Otto et al., 1996; Reddel et al., 1985; Sutherland et al., 1983). Somit stimmt die durchschnittliche Verdopplungszeit für die Zellen in allen Aussaatdichten mit einem Wert von $(27,35 \pm 0,11)$ h mit denjenigen aus der Literatur überein. Zudem sind die Werte für den Standardfehler des Mittelwerts bei allen Aussaatdichten sehr klein, was auf eine gute Reproduzierbarkeit schließen lässt.

5.3.2 Fluoreszenzbasierte Analyse mittels PrestoBlue™

Die Ergebnisse der Proliferationsstudie mit ECIS wurden mit denjenigen eines PrestoBlue™ Assays validiert und verglichen. Dazu wurde der Assay, wie in **Kapitel 4.1.8.2** beschrieben, 24, 48, 72 und 96 h nach Zellaussaat in drei verschiedenen Dichten ($15k$, $20k$ und $25k$ Zellen·cm⁻²) durchgeführt. Für die Datenauswertung und -darstellung der zwei unabhängigen Messreihen wurden zunächst die Fluoreszenzintensitäten aus den Einzelmessungen gemittelt, um die Werte der zellfreien Wells korrigiert und anschließend auf den korrigierten und gemittelten Wert der Fluoreszenzintensität nach 24 Stunden normiert. Die dazugehörigen Fehler wurden über die Gauß'sche Fehlerfortpflanzung berechnet, deren allgemeine Formel nach Ritgen (2020) wie folgt lautet:

$$u_f = \sqrt{\left(\frac{\partial f}{\partial x} \cdot \Delta x\right)^2 + \left(\frac{\partial f}{\partial y} \cdot \Delta y\right)^2 + \left(\frac{\partial f}{\partial z} \cdot \Delta z\right)^2 + \dots} \quad (30)$$

mit u_f als der Unsicherheit der Messgröße f .

Die Darstellung der normierten Resorufin Fluoreszenzintensitäten (FI) gegen die Zeit nach Zellaussaat (siehe **Abbildung 49**) zeigt zum einen, dass diese für die verschiedenen Aussaatdichten (15k, 20k und 25k Zellen·cm⁻²) mit zunehmender Zeit ansteigt und zum anderen, dass die Stärke des Anstiegs je nach Aussaatdichte variiert. Während die normierte Fluoreszenzintensität bei 15k Zellen·cm⁻² nach 96 h einen Wert von $(5,6 \pm 0,4)$ zeigt (—), liegt diese bei nur $(3,981 \pm 0,125)$ im Falle von 20k Zellen·cm⁻² (—) und bei $(3,16 \pm 0,09)$ für 25k Zellen·cm⁻² (—). Somit erfolgt der Anstieg der normierten Fluoreszenzintensität bei Ersterem linear, während bei höheren Aussaatdichten der Kurvenverlauf eher sigmoidaler Natur ist.

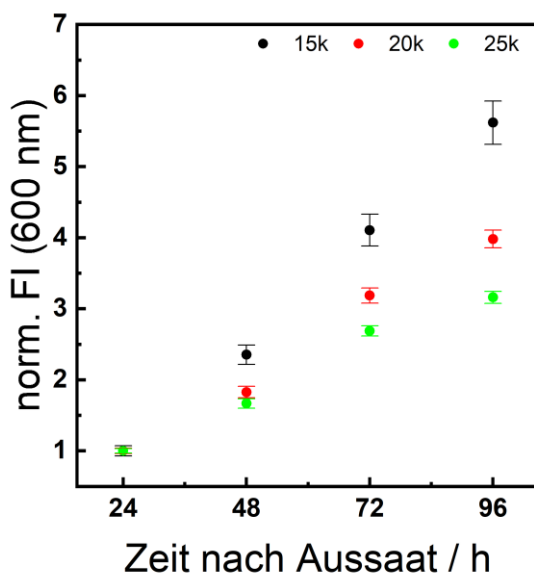


Abbildung 49: Darstellung der gemittelten und normierten Fluoreszenzintensitäten (FI) von Resorufin im PrestoBlue Assay™ für unterschiedliche Aussaatdichten (15k, 20k und 25k Zellen·cm⁻²) gegen die Zeit nach Zellaussaat in Stunden (MW ± SEM; n ≥ 15(2), korrigiert um den Wert der zellfreien Wells). Die Wells wurden mit einer Poly-L-Lysin Lösung beschichtet und 20 h nach Aussaat wurden die Zellen mit dem PrestoBlue™ Reagenz versetzt. Die Messung der Fluoreszenzintensität erfolgte 1 h nach Zugabe des Reagenz (37 °C, 0 % CO₂) unter folgenden Messparametern: $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 532 \text{ nm}/600 \text{ nm}$; gain = 62; bottom modus.

Die effektive Zelldichte zu den unterschiedlichen Zeitpunkten nach Zellaussaat wurde mittels einer Kalibriergeraden berechnet. Dazu wurde 20 h nach Zellaussaat ein PrestoBlue™ Assay für unterschiedliche Zelldichten (10k, 20k, 50k, 100k, 150k und 250k Zellen·cm⁻²) durchgeführt. Die resultierenden Messwerte der Fluoreszenzintensität wurden pro Aussaatdichte gemittelt und um die Werte der

zellfreien Wells korrigiert. Anschließend wurden die Werte gegen die jeweilige Aussaatdichte aufgetragen. Das Ergebnis ist in **Abbildung 50** gezeigt, wobei auch hier ein sigmoidaler Verlauf zu beobachten ist. Zwischen 10k und 100k Zellen·cm⁻² steigt die gemittelte Fluoreszenzintensität linear an, bevor die Werte für die Zelldichten von 150k und 250k Zellen·cm⁻² abflachen. Infolgedessen wurden Zweitere bei der Ermittlung der Kalibriergeraden durch eine lineare Regression nicht berücksichtigt.

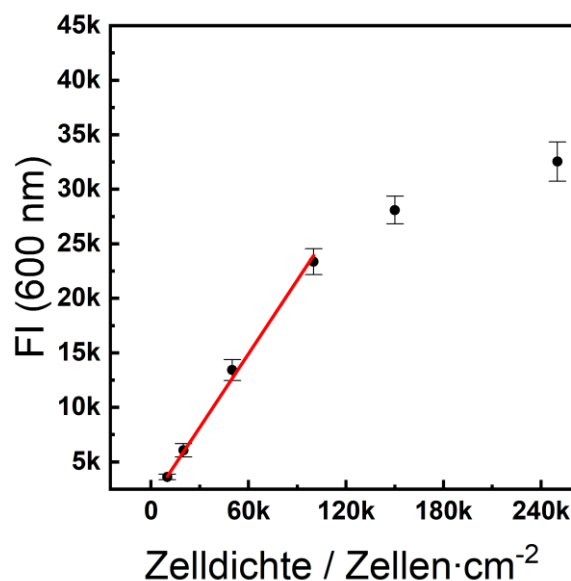


Abbildung 50: Darstellung der Kalibriergerade zur fluoreszenzbasierten Bestimmung der Zellproliferation mit dem PrestoBlue™ Assay. Die Fluoreszenzintensität wurde dabei 20 h nach Aussaat für verschiedene Zelldichten ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 532 \text{ nm}/600 \text{ nm}$) bestimmt und um den Leerwert korrigiert aufgetragen (MW \pm SEM; $n \geq 8(1)$).

Die resultierende Regressionsgerade aus **Abbildung 50** ergibt sich durch folgende Gleichung:

$$y = mx + b \quad (31)$$

mit der Steigung m ($0,225 \pm 0,009$) (Zellen·cm⁻²)⁻¹, der Zelldichte x , dem Ordinatenabschnitt b (1410 ± 210) und der Fluoreszenzintensität y bei 600 nm.

Mit Hilfe der quantifizierten Werte für m und b aus der Fit-Funktion wurden die Zelldichten, welche aus der Proliferation der Zellen über den Zeitraum von je 24 h resultieren, ermittelt.

Durch Anwendung von **Gleichung (30)** auf die zugrundeliegende Funktion der linearen Regression aus **Abbildung 50** ergibt sich für die Fehlerrechnung folgende Formel:

$$\Delta x = \sqrt{\left(\frac{\partial x}{\partial y} \cdot \Delta y\right)^2 + \left(\frac{\partial x}{\partial m} \cdot \Delta m\right)^2 + \left(\frac{\partial x}{\partial b} \cdot \Delta b\right)^2} \quad (32)$$

Anschließend wurden die aus den Berechnungen resultierenden Zelldichten mit den dazugehörigen Fehlern gegen die Zeitpunkte der Durchführung des Assays aufgetragen (siehe **Abbildung 51**).

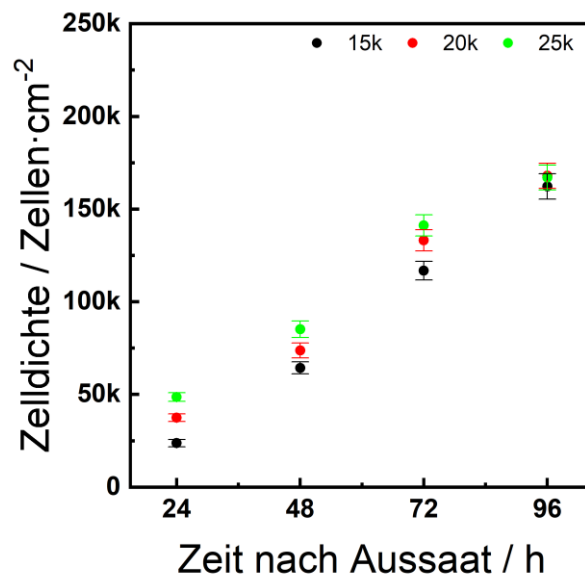


Abbildung 51: Bestimmung der Zellproliferation mittels eines PrestoBlue™ Assays. Auftragung der gemittelten und um den Leerwert korrigierten Zelldichte gegen die Zeit nach Aussaat (h) für die unterschiedlichen Aussaatdichten (15k, 20k und 25k Zellen·cm⁻²). MW ± SEM; n ≥ 15(2).

Aus **Abbildung 51** geht hervor, dass die berechnete Zelldichte für alle drei Aussaatdichten linear mit der Zeit nach Aussaat ansteigt. Nach 96 h nehmen die Zelldichten für jede untersuchte Aussaatdichte ähnliche Werte zwischen $(160 \pm 7)k$ Zellen·cm⁻² (—) und $(170 \pm 7)k$ Zellen·cm⁻² (—) an. Der Zellrasen ist zu diesem Zeitpunkt offensichtlich vollständig ausgebildet. Somit ist der Anstieg bei einer Aussaatdichte von 25k Zellen·cm⁻² (—) am geringsten ausgeprägt, während dieser bei

15k Zellen·cm⁻² am stärksten ist. Die erste Verdopplung der Zellen dauert für jede Aussaatdichte länger als 24 h. Bei 15k Zellen·cm⁻² sind nach 24 h (24 ± 2) k Zellen·cm⁻², $(40 \pm 2,04)$ k Zellen·cm⁻² bei 20k Zellen·cm⁻² und $(50 \pm 2,3)$ k Zellen·cm⁻² bei 25k Zellen·cm⁻² vorhanden. Die exakte Verdopplungszeit wurde mithilfe einer linearen Regression der Daten in **Abbildung 51** sowie der daraus resultierenden Parameter ermittelt und ist **Tabelle 15** zu entnehmen. Dazu wurden zunächst die Verdopplungszeiten der Einzelexperimente pro Aussaatdichte berechnet und gemittelt. Der Standardfehler des Mittelwertes wurde nach der Gauß'schen Fehlerfortpflanzung bestimmt.

Tabelle 15: Verdopplungszeiten in Stunden mittels PrestoBlue™ Assay für MCF-7 Zellen unterschiedlicher Aussaatdichten. Für die jeweiligen Aussaatdichten wurden die Zeiten aus den Rohdaten der jeweiligen Messreihe entnommen und anschließend gemittelt (MW \pm SEM; n \geq 15(2)).

Aussaatdichte / Zellen·cm ⁻²	Verdopplungszeit / h
15k	27,78 \pm 2,19
20k	26 \pm 4
25k	25 \pm 4

Sowohl in **Abbildung 49** als auch bei der Kalibrierung in **Abbildung 50** wird deutlich, dass nach einer gewissen Zeit nach Zellaussaat eine Art Sättigung erreicht wird. Ähnliches berichteten Sutherland et al. (1983) für das Wachstum von MCF-7 Zellen in einer *Monolayer* Kultur. Hier wurde ein exponentielles Wachstum der Zellzahl über sieben Tage beobachtet, gefolgt von einer Plateauphase. Im Falle des durchgeführten PrestoBlue™ Assays könnte das Wachstumsverhalten und die damit einhergehende Sättigungsphase einen Grund für die Abnahme der Fluoreszenzintensität darstellen, da ab einer gewissen Zellzahl die Oberfläche des Wells maximal mit vitalen Zellen besetzt ist und demnach nicht mehr PrestoBlue™ Reagenz umgesetzt werden kann als bei einer geringeren Zelldichte. Bestätigt wird diese Vermutung durch die berechneten Zelldichten in **Abbildung 51** und deren prozentualen Anstieg über eine Kulturzeit von t = 96 h. Das prozentuale Wachstum nimmt mit zunehmender Aussaatdichte ab. Zudem ist nach 96 h die gemittelte Zelldichte in allen drei Fällen sehr ähnlich. Dies verifiziert die Annahme, dass bei den Aussaatdichten von 20k und 25k Zellen·cm⁻² das

exponentielle Wachstum bereits in eine beginnende Plateauphase übergegangen ist. Die mittlere Verdopplungszeit der Zellpopulation ist zudem mit einem Wert von (26 ± 1) h sehr ähnlich zu derjenigen anderer Forscher, welche von durchschnittlichen Verdopplungszeiten von 18 – 39 h berichteten (Aghamiri et al., 2019; Otto et al., 1996; Reddel et al., 1985; Sutherland et al., 1983).

5.3.3 Diskussion

Der impedanzbasierte und der fluoreszenzbasierte Assay stellen zwei verschiedene Möglichkeiten dar, um die Proliferation adhärenter MCF-7 Zellen zu untersuchen. Während beim *Electric Cell-Substrate Impedance Sensing* die Zellen nicht-invasiv und label-frei beobachtet werden, handelte es sich bei Zweiterem um einen Endpunktassay durch Zugabe des PrestoBlue™ Reagenz. Somit stehen sich zwei Methoden gegenüber, bei welcher die Zellen entweder kontinuierlich und in Echtzeit überwacht werden oder nur zu definierten Zeitpunkten und dadurch in schlechter zeitlicher Auflösung (Lukic & Wegener, 2015; Präbst et al., 2017). Des Weiteren ist der Zeit- und Arbeitsaufwand durch den automatisierten Ablauf eines ECIS-Experiments, welcher mit einer stetigen Datenaufnahme verbunden ist, sehr gering für den Forscher. Beim PrestoBlue™ Assay hingegen muss zu definierten Zeitpunkten das Reagenz zugegeben werden und die mit der Reduktion von Resazurin zu Resorufin einhergehende Fluoreszenzintensität gemessen werden (Lall et al., 2013). Außerdem ist eine Kalibrierung nötig, um konkrete Zellzahlen ermitteln zu können. Infolgedessen ist mit diesem Verfahren sowohl ein größerer zeitlicher als auch arbeitstechnischer Aufwand verbunden. Die zugrundeliegende Reduktionsreaktion birgt eine weitere Gefahrenquelle für unerwünschte Artefakte, da diese stark vom pH-Wert, der Temperatur und der Konzentration des Eduktes abhängt. Die Temperatur beeinflusst maßgeblich die Reaktionsgeschwindigkeit. Allerdings kann diese, gemeinsam mit der Konzentration des Eduktes, experimentell leicht konstant gehalten werden. Eine Abnahme des pH-Wertes ist hingegen mit einer Verschiebung des Gleichgewichtes auf Seiten des Eduktes Resazurin verbunden. Außerdem ist die Gefahr einer weiteren Reduktion von Resorufin zu Dihydroresorufin durch die Zellen gegenwärtig, welches nicht fluoreszierend und toxisch ist (Präbst et al., 2017). Solch externe Einflüsse können hingegen bei der ECIS Technik durch die vollständige Automatisierung und

die ungestörte Durchführung in einem Inkubator reduziert werden (Lichtenegger, 2015; Lukic & Wegener, 2015). Die Daten haben bestätigt, dass die Proliferation von MCF-7 Zellen bei beiden Verfahren sensitiv und reproduzierbar gemessen werden kann (Ngoc Le et al., 2019; Präbst et al., 2017). Nichtsdestotrotz ist die Fehlerbehaftung im Allgemeinen und bei der durchschnittlichen Verdopplungszeit beim PrestoBlue™ Assay mit einem Wert von $(26,2 \pm 1,9)$ h um mehr als das Zehnfache größer als bei ECIS mit $(27,35 \pm 0,11)$ h, was wiederum die Reproduzierbarkeit beeinflusst. Wie bereits diskutiert befinden sich die durchschnittlichen Verdopplungszeiten beider Methoden in einem Bereich, welcher auch in der Literatur für MCF-7 Zellen berichtet wurde. Neben der am häufigsten genannten Zeit von 24 h (Lacroix & Lippman, 1980; Otto et al., 1996; Reddel et al., 1985; Sutherland et al., 1983), berichteten Chaouki et al. (2009) von lediglich 18 h sowie Aghamiri et al. (2019) von $(22,48 \pm 0,23)$ h. Barnes und Sato (1979) hingegen beobachteten das Wachstum von MCF-7 Zellen über acht Tage in Kulturmedium mit 10 % fetalem Kälberserum und einer Verdopplungszeit von circa 36 h. Es wird ersichtlich, dass die Werte von 18 – 39 h variieren (Aghamiri et al., 2019; Reddel et al., 1985). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Werte stark davon abhängen, an welchem Zeitpunkt der exponentiellen Wachstumsphase sich die Zellen gerade befinden. Zu Beginn des exponentiellen Wachstums proliferieren diese schneller als kurz vor Erreichen der Plateauphase (Reddel et al., 1985; Sutherland et al., 1983). Durch die niedrige Aussaatdichte der MCF-7 Zellen in dieser Studie befinden sich diese fast kontinuierlich im exponentiellen Wachstum, was die Plausibilität der Ergebnisse bestätigt.

5.4 Ausblick

Die Kombination aus der ratiometrischen Sensortechnik und der FEM-Methode ermöglicht eine ganzheitliche Analyse der Atmungsaktivität in zellulären Systemen. Während das VisiSens TD System in Kombination mit planaren Sauerstoff-sensitiven Sensorfolien die zeitlichen und räumlichen Veränderungen des Sauerstoffverbrauchs adhärenter Zellen im *Monolayer* überwacht, ermöglicht die *in silico* Methode zusätzlich die simultane Untersuchung weiterer kritischer Faktoren, wie dem Sauerstoffpartialdruck, der Höhe der Mediumssäule oder dem Einfluss des Kulturgefäßes. *In vitro* wäre das Vorgehen sehr zeitaufwändig, zumal nicht alle Parameter hinreichend genau analysiert werden können. Außerdem verhindert der geringe Durchsatz des Systems eine Simultanität, da nur wenige Proben pro Durchgang gemessen werden können.

Infolgedessen wurden ausgehend von einem Modell, welches mit experimentellen Daten validiert und damit dessen Reliabilität bestätigt wurde, alle oben genannten Faktoren, welche die Sauerstoffverteilung beeinflussen, geprüft. Diese ganzheitliche *in silico* Analyse erfolgte für die Geometrien einer 96-Well Platte sowie für Systeme mit permeablen Transwell®- und cellQART®-Membraneinsätzen. Bei Letzterem wurde die Analyse um die strukturellen Designs des Membraneinsatzes sowie der Eigenschaften der Filtermembranen erweitert mit dem Ziel, das optimale experimentelle Setup zu ermitteln, bei welchem die Sensorantwort das zelluläre Geschehen auf der Filtermembran widerspiegelt.

Für eine feinere Optimierung der Simulationsmodelle müssten noch wenige grundlegende Experimente, vor allem hinsichtlich der tatsächlichen Zelldichte zum Zeitpunkt der Sauerstoffmessung und somit zum Zeitpunkt der Simulation, durchgeführt werden. Hierfür wäre es sinnvoll, die Adhäsions- und Proliferationsprozesse bis zum Start der Messung zu überwachen, da die tatsächliche Zellzahl essenziell für die rechnerische Ermittlung der zellulären Verbrauchsrate ist. Aufgrund der Tatsache, dass die Sauerstoff-sensitiven Sensorfolien undurchsichtig sind, könnten diese durch transparente ersetzt werden, um die genannten Parameter optisch mit einem Phasenkontrastmikroskop überwachen zu können. Eine Alternative

wäre die gleichzeitige Aussaat der Zellen mit einer identischen Zelldichte in separate 96-Well Platten. Anschließend wäre es einerseits möglich, die Proliferation mittels ECIS oder PrestoBlue™ zu beobachten und simultan dazu die Sauerstoffverteilung mit dem VisiSens System zu analysieren.

Im Gegensatz zum anfänglichen Vorgehen, das *in silico* Modell durch Experimente zu validieren, könnte dies zukünftig auch in umgekehrter Reihenfolge erfolgen. Insofern könnte die Reliabilität der *in vitro* Methoden mit den zugrundeliegenden Simulationsergebnissen überprüft werden. Zudem könnten beispielsweise zeitaufwändige experimentelle Optimierungsassays *in silico* durchgeführt werden, um lediglich den tatsächlichen Untersuchungsgegenstand *in vitro* zu erforschen.

6 Untersuchung von 3D Zellaggregaten

3D Gewebemodelle bilden eine Brücke zwischen *in vitro* 2D Zellkulturen und Tierversuchen, da sie durch die 3D Gewebearchitektur, Zell-Zell- und Zell-Matrixkontakte sowie ein anderes Mikromilieu eine größere Ähnlichkeit zu dem *in vivo* Szenario aufweisen. Multizelluläre Sphäroide sind dabei besonders in den Fokus der Forschung gerückt und werden häufig in der Krebsforschung angewendet (Campioni et al., 2022; Joseph et al., 2018; Kapalczyńska et al., 2018). Dies liegt darin begründet, dass diese avaskuläre Tumore in deren Struktur und Wachstumskinetik imitieren. Mit zunehmender Größe des Aggregats bilden sich isozentrische Schichten mit einer proliferativen, einer ruhenden und einer nekrotischen Zone. Aufgrund der metabolischen Aktivität der äußeren Zellschichten wird die Diffusion von Nährstoffen, wie Sauerstoff oder Glukose zum Zentrum gehemmt. Es kommt zur Entwicklung von Gradienten, welche sowohl den Stoffwechsel der Zellen in den einzelnen Zonen beeinflussen als auch deren Lebensfähigkeit (Grimes et al., 2016; Lazzari et al., 2017; Leung et al., 2015; Sutherland, 1988).

Aufgrund der komplexen Struktur von 3D Gewebemodellen und der resultierenden Unterschiede in der Mikroumgebung wurden zahlreiche mathematische und *in silico* Modelle entwickelt, mit dem Ziel, die darin stattfindenden Mechanismen besser zu verstehen. Diese ermöglichen nicht nur eine Optimierung von *in vitro* Studien, sondern liefern auch Erkenntnisse, welche experimentell nur schwer zugänglich wären oder einen extremen Zeitaufwand erfordern würden (Materi & Wishart, 2007). Die zunehmende Attraktivität und wachsende Anzahl eben dieser Analysemethoden zeigt sich in der Literatur, wie bei der Untersuchung der Wachstumskinetik von Sphäroiden (Grimes et al., 2016), der darin vorherrschenden Sauerstoffverteilung (Grimes, Kelly et al., 2014; Leedale et al., 2019; Leedale et al., 2014) oder pharmakologischer Prozesse (Mehta et al., 2012; Sefidgar et al., 2014; Ward & King, 2003).

In den folgenden Kapiteln wird die *in silico* Sauerstoffverteilung in multizellulären Sphäroiden auf Basis empirischer Daten aus *in vitro* Studien untersucht. Der Modellierungsprozess erfolgt dabei *vice versa* zum zugrundeliegenden experimentellen Vorgehen (siehe **Abbildung 52**).

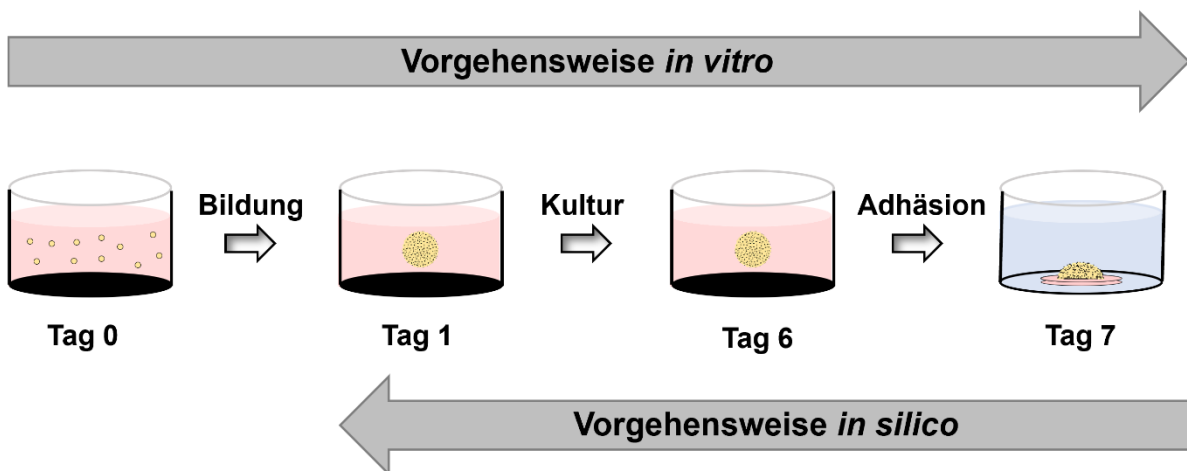


Abbildung 52: Darstellung der Prozesse *in vitro* und *in silico* zur Untersuchung der verschiedenen Level der Oxygenierung innerhalb von Sphäroiden der Zelllinien MCF-7 und U373. Der Modellierungsprozess erfolgt dabei *vice versa* zur experimentellen Vorgehensweise. Ausgehend von den empirischen Daten der ratiometrischen Sauerstoffmessung an Tag 7 sowie zusätzlichen morphometrischen Analysen sollen Rückschlüsse auf die Atmungsaktivität vor dem Adhäsionsprozess und während der sechstägigen Kulturzeit gezogen werden.

In vitro wurden Sphäroide der Zelllinien MCF-7 und U373 gemäß dem Protokoll in **Kapitel 4.1.4** mit unterschiedlicher Zellzahl generiert. Nach der Bildung der Aggregate und weiteren sechs Tagen in Kultur wurde die Oxygenierung mit dem ratiometrischen Messsystem VisiSens TD, welches in **Kapitel 3.2** beschrieben wurde, in einem Querschnitt des Gewebes überwacht. Die Voraussetzung für diese nicht-invasive Analyse ist, dass die Sphäroide über einen Zeitraum von 24 h auf der Oberfläche von planaren Sauerstoff-sensitiven Sensorfolien adhärieren und dadurch die geometrische Form einer Halbsphäre annehmen. Um das experimentelle Vorgehen so genau wie möglich modellieren und untersuchen zu können, werden zunächst die morphologischen Veränderungen der Sphäroide während der sechstägigen Kulturzeit und im Zuge des Adhäsionsprozesses mikroskopisch untersucht (siehe **Kapitel 6.1**). Mit Hilfe aller empirisch ermittelten Daten wird in **Kapitel 6.2.2** das *in silico* Modell adhärenter Sphäroide validiert und die Atmungsaktivität quantifiziert. Ausgehend von den validierten *in silico* Ergebnissen wird das Ziel verfolgt, durch weitere kontinuierliche Computersimulationen, Rückschlüsse auf die Sauerstoffverteilung vor dem Adhäsionsprozess (siehe **Kapitel 6.2.3**) und anschließend auf diejenige während der sechstägigen Kulturzeit (siehe **Kapitel 6.2.5**) ziehen zu können. Infolgedessen können *in silico* die Prozesse innerhalb des Sphäroids von der Bildung der Aggregate

bis zu deren morphologischer Veränderung erforscht werden, was *in vitro* nicht in gleicher Weise möglich wäre. Zusätzlich wird die chemische Modulation der oxidativen Phosphorylierung und die Einflüsse permeabler Kultursubstrate auf die Sauerstoffgradienten studiert. Auf die Analyse weiterer Parameter, wie die Auswirkungen der allgemeinen Kulturbedingungen, wird in diesem Rahmen verzichtet und auf die Ergebnisse in **Kapitel 5** verwiesen.

6.1 Morphologische Analyse von Sphäroiden

Die Kombination von *in vitro* und *in silico* Verfahren ermöglicht einen tiefergehenden Einblick in die Funktionsweise eines komplexen biologischen Systems. Die Voraussetzung dafür ist, dass die Modelle geometrisch und mathematisch hinreichend genau mit dem biologischen System übereinstimmen. Für die Analyse der *in silico* Sauerstoffverteilung in Sphäroiden auf Basis experimenteller Ergebnisse ist es essenziell, die grundlegenden geometrischen Parameter zu quantifizieren. Dazu wurden Sphäroide der Zelllinien MCF-7 und U373 mit unterschiedlichen Aussaatdichten generiert und mikroskopisch während der Kulturzeit und im Verlauf des Adhäsionsprozesses untersucht (**MCF-7**: 4k, 12k, 16k und 20k Zellen/96-Well; **U373**: 6k, 10k, 20k und 30k Zellen/96-Well). Die quantifizierten Werte wurden auf ganze μm gerundet.

6.1.1 Einfluss der Kulturzeit auf die Morphologie von Sphäroiden

Die geometrische Veränderung der Sphäroide während einer Kulturzeit von sechs Tagen wurde mit Bildern am Phasenkontrastmikroskop dokumentiert. Exemplarische Bilder für die Zellaggregate unterschiedlichen Zelltyps und Aussaatdichte sind in **Abbildung 90** (MCF-7) und **Abbildung 91** (U373) in **Kapitel 10.1** dargestellt. Davon ausgehend wurden, wie in **Kapitel 4.1.7** beschrieben, die Durchmesser der Sphäroide je Aussaatdichte und Tag bestimmt. Die gemittelten Ergebnisse sind in **Abbildung 53** gezeigt. Insgesamt wurden mehr als sechs MCF-7 Sphäroide (**A**) und mehr als zwölf U373 Sphäroide (**B**) pro Aussaatdichte untersucht. Für die verschiedenen Zellzahlen je MCF-7 Sphäroid (**A**) ist zu beobachten, dass die gemittelten Durchmesser zunächst abnehmen. Ab dem zweiten Tag in Kultur ist ein näherungsweise lineares Wachstumsverhalten zu beobachten. Die Wachstumsraten wurden durch Anwendung eines linearen Fits auf die jeweiligen Wachstumskurven ermittelt. Die größte Veränderung im Durchmesser pro Zeit liegt mit $(23 \pm 1) \mu\text{m} \cdot \text{d}^{-1}$ bei einer Aussaatdichte von 4k Zellen/Well (—). Mit zunehmender Zellzahl nimmt die Wachstumsrate linear ab bis zu einem Wert von $(0,1 \pm 4) \mu\text{m} \cdot \text{d}^{-1}$ für 20k Zellen/Well (—). Aufgrund der Tatsache, dass die Durchmesser bei höheren Aussaatdichten weitgehend konstant bleiben, fallen Ungenauigkeiten bei deren Bestimmung mehr ins Gewicht. Infolgedessen sind

die Standardfehler des Mittelwertes bei den gemittelten Wachstumsraten oft größer als die absolute Veränderung im Durchmesser pro Zeiteinheit. Insgesamt wird jedoch deutlich, dass kleine MCF-7 Sphäroide schneller wachsen als große. Bei U373 Zellaggregaten unterschiedlicher Aussaatdichte (**B**) ist über den gesamten Beobachtungszeitraum kein Wachstum erkennbar. Diese schrumpfen exponentiell während der gesamten Kulturzeit, wobei die Kontraktion bei höheren Aussaatdichten (—) stärker ist als bei kleineren (—). Für 30k Zellen/Well (—) sinkt der Durchmesser von knapp $(900 \pm 3) \mu\text{m}$ an Tag 1 auf $(500 \pm 5) \mu\text{m}$ an Tag 6. Bei Sphäroiden mit einer Aussaatdichte von 6k Zellen/Well (—) ist die beobachtete Abnahme von $(371 \pm 2) \mu\text{m}$ auf $(277 \pm 1) \mu\text{m}$ geringer.

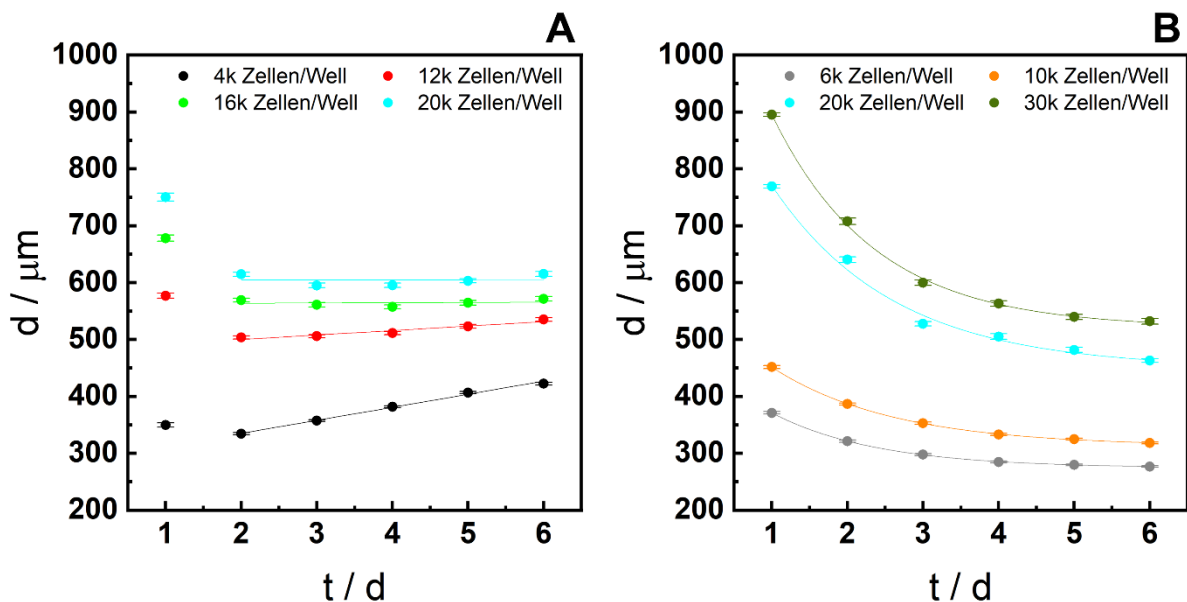


Abbildung 53: Zeitabhängige Veränderung der Durchmesser von Sphäroiden der Zelllinien MCF-7 (**A**) und U373 (**B**) während einer Kulturzeit von sechs Tagen. Insgesamt wurden mehr als sechs MCF-7 Sphäroide pro Aussaatdichte (MW \pm SEM; $n \geq 6(3)$) und mehr als zwölf U373 Zellaggregate pro Aussaatdichte (MW \pm SEM; $n \geq 12(3)$) in drei unabhängigen Messreihen analysiert.

Ausgehend von den quantifizierten Werten für die gemittelten Durchmesser der Sphäroide unterschiedlicher Zelllinien und Aussaatdichten wurden zusätzlich die Einflüsse der Kulturzeit auf die Volumina der Zellaggregate in **Abbildung 54** visualisiert. Dazu wurden die Volumina unter Annahme einer perfekten Kugel berechnet und die resultierenden Werte pro Aussaatdichte gemittelt. Die gemittelten Werte wurden anschließend auf einen definierten Zeitpunkt normiert und die Fehler

wurden mit der Gauß'schen Fehlerfortpflanzung ermittelt. Bei MCF-7 Sphäroiden (**A**) wurde auf das jeweilige Volumen am zweiten Tag der Kulturzeit normiert. Dies liegt darin begründet, dass das Wachstum im Durchmesser erst am zweiten Tag beginnt. Bei der Zelllinie U373 (**B**) wurde auf die entsprechenden Volumina am ersten Tag normiert. Die Normierung ermöglicht es, das Wachstum der Sphäroide unterschiedlicher Aussaatdichte direkt miteinander zu vergleichen und die bereits gewonnenen Erkenntnisse zu untermauern. Bei MCF-7 Sphäroiden mit den Aussaatdichten 16k Zellen/Well (●) und 20k Zellen/Well (●) ist zu beobachten, dass diese frühestens ab dem dritten Tag in Kultur im Volumen wachsen. Diese Tatsache wäre allein durch die Ergebnisse in **Abbildung 53** nicht deutlich geworden. Somit zeigt sich für die Zellaggregate beider Zelltypen, dass ab einer bestimmten Größe, welche durch die Aussaatdichte kontrolliert wird, die Kontraktion länger andauert. Zudem ist diese abhängig von der verwendeten Zelllinie.

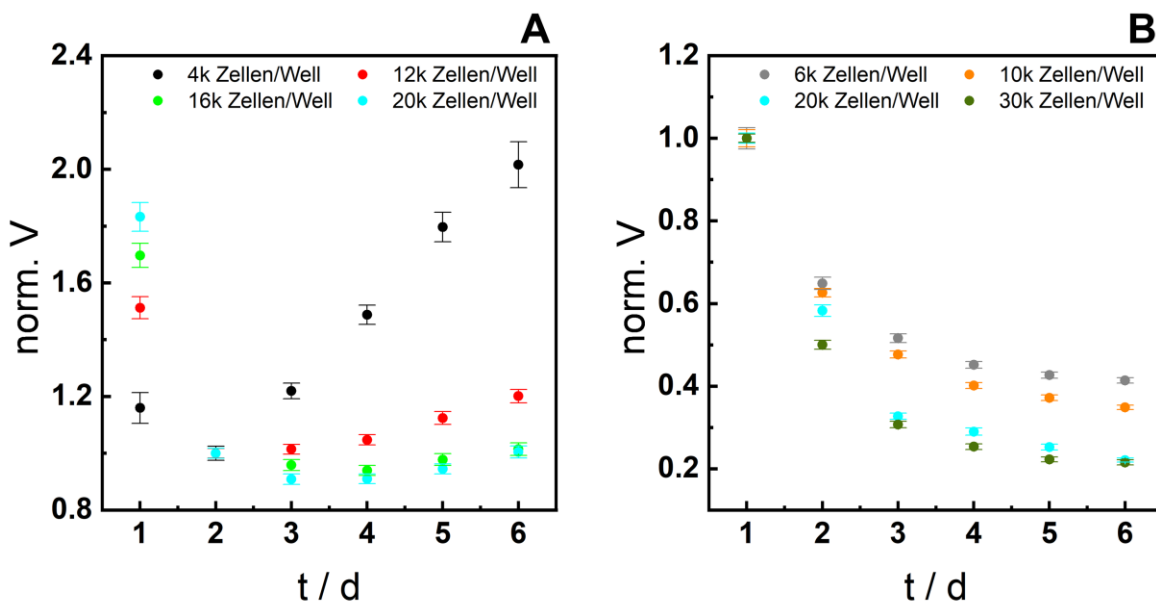


Abbildung 54: Zeitabhängige Veränderung der Volumina von Sphäroiden der Zelllinien MCF-7 (**A**) und U373 (**B**) während einer Kulturzeit von sechs Tagen. Insgesamt wurden mehr als sechs MCF-7 Sphäroide pro Aussaatdichte (MW \pm SEM; $n \geq 6(3)$) und mehr als zwölf U373 Zellaggregate pro Aussaatdichte (MW \pm SEM; $n \geq 12(3)$) in drei unabhängigen Messreihen analysiert. Die quantifizierten Werte wurden gemittelt und anschließend auf einen definierten Zeitpunkt normiert (**MCF-7**: $t = 2$ d; **U373**: $t = 1$ d).

Durch die erlangten Resultate wird deutlich, dass lediglich MCF-7 Sphäroide mit den Aussaatdichten 4k Zellen/Well und 12k Zellen/Well ab dem zweiten Tag in Kultur eine

Wachstumskinetik aufweisen, welche ähnlich zu Tumoren *in vivo* ist. Durch Anwendung der Gompertz Fitfunktion ist es möglich, die Zeitspanne, in der sich das Volumen der Sphäroide das erste Mal verdoppelt, graphisch zu ermitteln (siehe **Abbildung 92** in **Kapitel 10.1**). Allerdings ist diese mit (4 ± 5) d (4k Zellen/Well) und (16 ± 2250) d (12k Zellen/Well) bedeutend größer als die Verdopplungszeiten für adhärenente MCF-7 Zellen im *Monolayer*, welche mit Hilfe der Proliferationsassays in **Kapitel 5.3** quantifiziert wurden. Zudem ist die Fehlerbehaftung groß, was mit der mehr oder weniger guten Eignung der Gompertz Fitfunktion zusammenhängt (4k Zellen/Well: $R^2 = 0,99$; 12k Zellen/Well: $R^2 = 0,92$). Nichtsdestotrotz liegt die Vermutung nahe, dass sich bereits isozentrische Schichten ausgebildet haben und somit nur die Zellen in der äußeren proliferativen Zone zum Wachstum beitragen. Die Radien der proliferativen Zonen in den Sphäroiden unterschiedlicher Aussaatdichte wurden sukzessiv mit Hilfe des Modells eines Hohlkörpers und folgenden drei Annahmen berechnet:

1. Die Sphäroide seien perfekte Sphären.
2. Die Anzahl der Zellen im Zellaggregat zu Beginn des Wachstums sei identisch zur jeweiligen Aussaatdichte.
3. Die Verdopplungszeiten für MCF-7 Zellen in 3D Zellaggregaten entsprechen dem quantifizierten Wert von (27 ± 1) h für adhärenente Zellen im *Monolayer*.

Infolge der theoretischen Annahmen, der Berechnung mit Hilfe der Gompertz Fitfunktion und der Vielzahl an Rechenschritten wird, trotz einer konsequent durchgeführten Fehlerfortpflanzung, auf die Darstellung der resultierenden Fehler verzichtet.

Durch die Relation aus dem tatsächlichen Volumen nach (27 ± 1) h und dem hypothetischen wurden zunächst die prozentualen Anteile der Zellen bestimmt, welche proliferieren oder ruhen. Davon ausgehend wurde das Volumen und der Radius der ruhenden Zone berechnet. Durch die jeweilige Subtraktion des Radius der ruhenden Zone vom tatsächlichen Radius des Zellaggregats nach (27 ± 1) h ergeben sich schließlich proliferative Zonen mit einer Schalendicke vom $70 \mu\text{m}$ für 4k Zellen/Well¹

¹ $(70 \pm 108) \mu\text{m}$

und 60 μm für 12k Zellen/Well². Es ist ein Trend bezüglich der Abnahme der Dicke der proliferativen Zone bei steigenden Aussaatdichten erkennbar.

6.1.2 Einfluss der Adhäsion auf die Morphologie von Sphäroiden

Für die Analyse der morphologischen Veränderungen im Zuge des Adhäsionsprozesses wurden die Zellaggregate vor und nach der 24-stündigen Adhäsion auf den Sauerstoff-sensitiven Sensorfolien untersucht. Sphäroide in Suspension wurden am sechsten Tag der Kulturzeit durch Aufnahmen am Phasenkontrastmikroskop dokumentiert, während die 3D Struktur der adhärenen Sphäroide 27 h nach dem Transfer auf die Sensorfolie mittels einer Lebendfärbung mit Calcein-Acetoxy-methylester am konfokalen Laser-Raster Mikroskop visualisiert wurde (siehe **Kapitel 4.2.3**). Insgesamt wurden je Zelldichte mehr als neun Sphäroide in Suspension der Zelllinie MCF-7 und mehr als zwölf für die Zellaggregate mit U373 Zellen untersucht. Bei adhärenen Zellaggregaten wurden mehr als zwei Sphäroide je Zelllinie und initialer Zellzahl zum Zeitpunkt der Zellaussaat t_0 analysiert. Die mikroskopischen Bilder exemplarischer Sphäroide je initialer Zellzahl sind in **Abbildung 55** (MCF-7) und **Abbildung 56** (U373) gezeigt, wobei die initiale Zellzahl von links nach rechts (**A**) – (**D**) zunimmt. Die erste Bildreihe in beiden Abbildungen zeigt die phasenkontrastmikroskopischen Aufnahmen (xy) der Sphäroide in Suspension. In der zweiten und dritten Bildreihe sind die CLSM-Bilder adhärenen Sphäroide gleicher Zellzahl in der Aufsicht (xy) und der Seitenansicht (xz) dargestellt. Dabei ist die rote Fluoreszenz in den CLSM-Bildern das Resultat der Emission der Sauerstoff-sensitiven Sensorfolie, während die grüne zytoplasmatische Fluoreszenz die lebenden Zellen zeigt. Dadurch, dass die Eindringtiefe sowohl für die Fluoreszenzfarbstoffe als auch für die Anregung mit Laserlicht begrenzt ist, ist es im Rahmen der konfokalen Laser-Raster Mikroskopie lediglich möglich, die äußeren Zellschichten sichtbar zu machen. Nichtsdestotrotz wird die morphologische Veränderung von Sphären zu Halbsphären durch den Adhäsionsprozesses klar sichtbar. Außerdem ist erkennbar, dass die Sphäroide sowohl vor als auch nach der Adhäsion mit zunehmender Zellzahl größer werden.

² (60 \pm 400000) μm

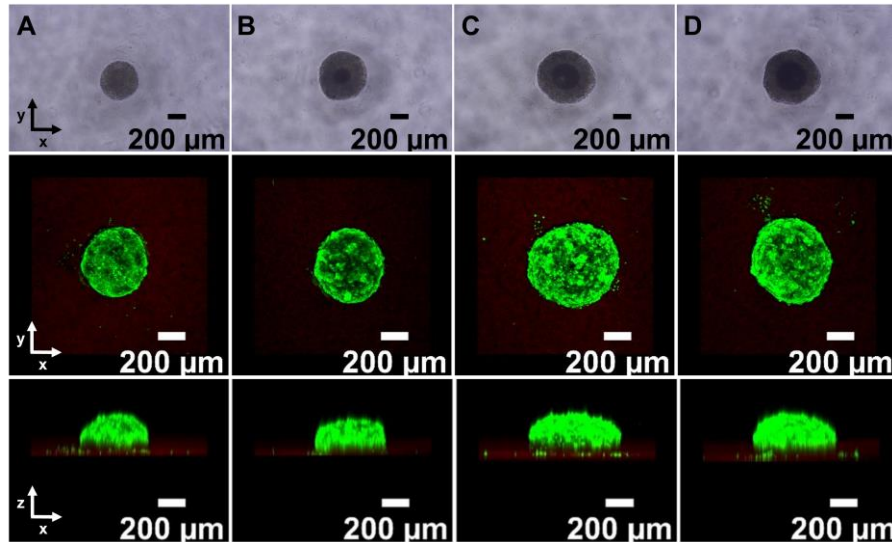


Abbildung 55: Bilder von MCF-7 Sphäroiden unterschiedlicher initialer Zellzahl vor dem Adhäsionsprozess und 27 h nach Transfer auf die Sensorfolie (**A:** 4k Zellen/Well, **B:** 12k Zellen/Well, **C:** 16k Zellen/Well, **D:** 20k Zellen/Well). Die erste Reihe zeigt phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen (xy) der Zellaggregate in Suspension, während in der mittleren Reihe fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen adhärenz Sphäroide (xy) nach Lebendfärbung mit Calcein-AM am CLSM dargestellt sind. In der unteren Reihe ist die dazugehörige Seitenansicht (xz) abgebildet.

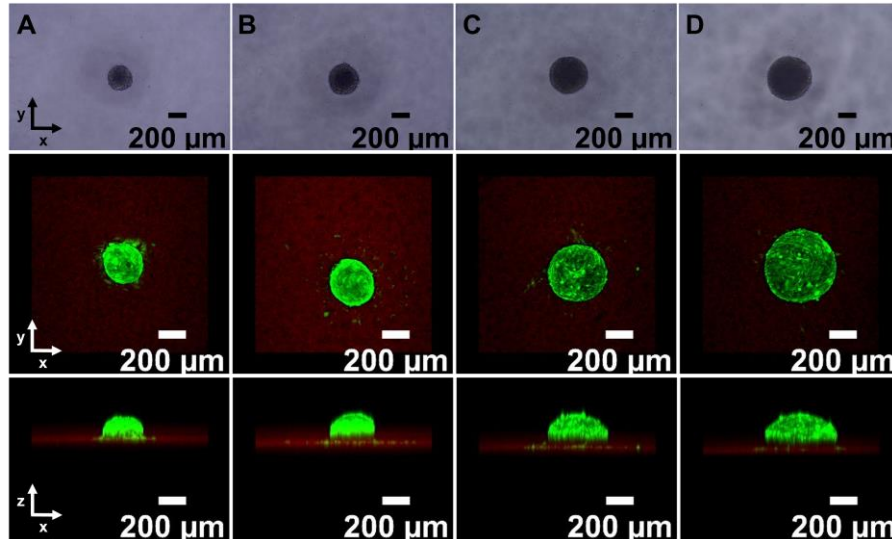


Abbildung 56: Bilder von U373 Sphäroiden unterschiedlicher initialer Zellzahl vor dem Adhäsionsprozess und 27 h nach Transfer auf die Sensorfolie (**A:** 6k Zellen/Well, **B:** 10k Zellen/Well, **C:** 20k Zellen/Well, **D:** 30k Zellen/Well). Die erste Reihe zeigt phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen (xy) der Zellaggregate in Suspension, während in der mittleren Reihe fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen adhärenz Sphäroide (xy) nach Lebendfärbung mit Calcein-AM am CLSM dargestellt sind. In der unteren Reihe ist die dazugehörige Seitenansicht (xz) abgebildet.

Mit Hilfe der mikroskopischen Aufnahmen in der xy-Ebene und der anschließenden Auswertung mit der Software NIH ImageJ wurden die Radien der Sphäroide vor und nach dem Adhäsionsprozess ermittelt. Die Höhen der adhärenen Sphäroide (xz-Schnitt) wurden durch das rasterförmige Scannen in einer definierten xy-Ebene bei gleichzeitiger Veränderung der z-Position am CLSM quantifiziert. Die resultierenden Werte der einzelnen Sphäroide wurden anschließend für jeden Zelltyp und jede Zellzahl gemittelt und mit den zugehörigen Standardfehlern des Mittelwertes in den Säulendiagrammen in **Abbildung 57** (MCF-7: **A**; U373: **B**) visualisiert. Die Ergebnisse in (**A**) zeigen, dass die Radien für MCF-7 Sphäroide in Suspension mit zunehmender Zellzahl ansteigen. Diese erhöhen sich von gemittelten $(221 \pm 2) \mu\text{m}$ bei einer initialen Zellzahl von 4k Zellen/Well auf $(308 \pm 2) \mu\text{m}$ bei 20k Zellen/Well. Ähnliches ist auch für die Sphäroide der Zelllinie U373 (**B**) zu beobachten. Diese besitzen gemittelte Radien zwischen $(140 \pm 1) \mu\text{m}$ bei 6k Zellen/Well und $(244 \pm 1) \mu\text{m}$ bei 30k Zellen/Well. Zudem wird ersichtlich, dass sich MCF-7 und U373 Sphäroide mit einer identischen Zellzahl von 20k Zellen/Well in der Größe unterscheiden. Die gemittelten Daten der phasenkontrastmikroskopischen Aufnahmen ergeben eine Differenz von nahezu $(108 \pm 2) \mu\text{m}$ im Radius der Sphäroide in Suspension. Bei den Radien der adhärenen Sphäroide beider Zelllinien ist ein ähnlicher Trend erkennbar. Somit bestätigen die morphometrischen Daten die optischen Beobachtungen in **Abbildung 55** und **Abbildung 56**. Bei einem Vergleich der Radien vor und nach dem Adhäsionsprozess wird zudem deutlich, dass diese nach Adhäsion für jede betrachtete Zellzahl marginal größer sind. Im Falle adhärenen MCF-7 Sphäroide weichen die Radien bis zu $(13 \pm 8) \mu\text{m}$ (12k Zellen/Well) von den gemittelten Radien in Suspension ab. Bei adhärenen Sphäroiden der Zelllinie U373 liegt der maximale Unterschied bei $(9 \pm 3) \mu\text{m}$ für 30k Zellen/Well. Die quantifizierten und gemittelten Höhen adhärenen Sphäroide (MCF-7 und U373) zeigen, dass diese in jedem Fall kleinere Werte annehmen als die Radien. Demnach sind die gemittelten Werte in den beiden Halbachsen unterschiedlich, was gegen eine perfekte halbsphärische Geometrie spricht. Die Abweichung zwischen dem Radius und der Höhe liegt bei adhärenen MCF-7 Sphäroiden zwischen $(60 \pm 6) \mu\text{m}$ (4k Zellen/Well) und $(95 \pm 7) \mu\text{m}$ (20k Zellen/Well). Prozentual gesehen wären dies circa $(25 \pm 2) \%$ bei 4k Zellen/Well und $(30 \pm 2) \%$ bei 20k Zellen/Well. Bei U373 Sphäroiden steigt die Differenz ebenso

mit zunehmender Zellzahl an und ist mit $(85 \pm 6) \mu\text{m}$ (circa $(34 \pm 2) \%$) am größten für Sphäroide mit einer Zellzahl von 30k Zellen/Well. Zusammenfassend führt dies zu folgendem Fazit: Auf der einen Seite ändern sich die Radien der Sphäroide durch den Adhäsionsprozess sowohl für MCF-7 Zellen als auch für U373 Zellen nur geringfügig. Allerdings ist der Unterschied zwischen den Radien und den Höhen adhärenter Sphäroide bedeutender. Demzufolge ist deren Geometrie mehr ellipsoid als sphärisch. Die Diskrepanz in den Halbachsen ist dabei für große Sphäroide mit circa $(30 \pm 2) \%$ (siehe: 20k Zellen/Well in **A**) stärker ausgeprägt im Vergleich zu kleineren Zellaggregaten mit circa $(14 \pm 1) \%$ (siehe: 6k Zellen/Well in **B**). Zuletzt wird bei genauerer Betrachtung der Fehlerbalken deutlich, dass diese bei allen untersuchten Zellzahlen für Sphäroide der Zelllinie MCF-7 größer sind als bei solchen mit U373 Zellen. Somit ist die Reproduzierbarkeit von MCF-7 Sphäroiden im Allgemeinen als geringer einzustufen.

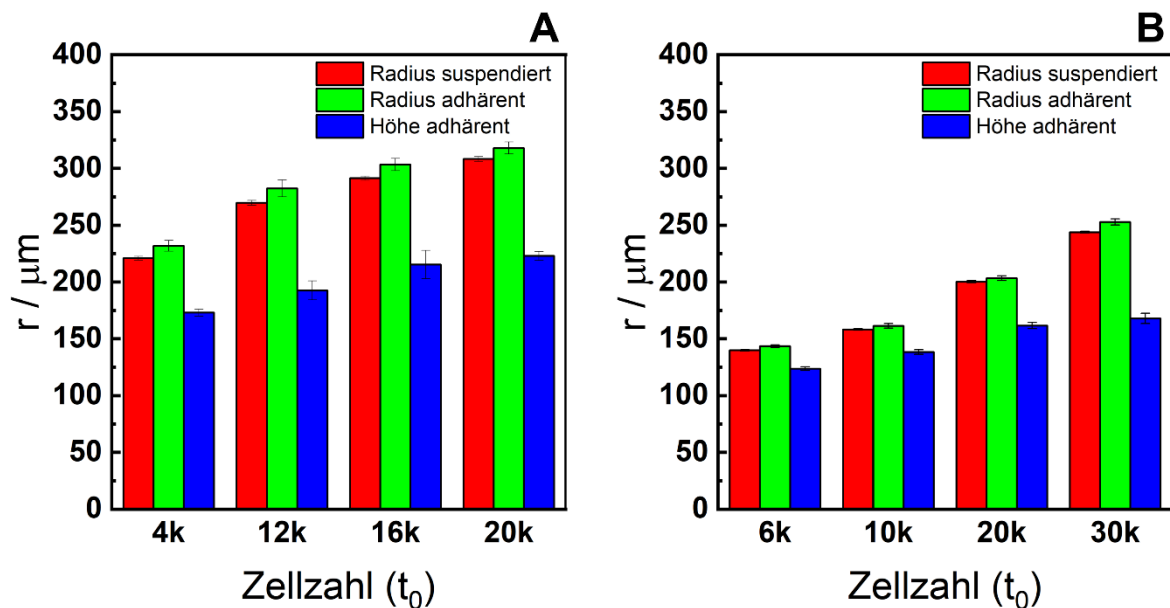


Abbildung 57: Vergleich der gemittelten Werte der Radien von Sphäroiden in Suspension sowie der Radien und Höhen von adhärenen Sphäroiden für die beiden Zelllinien MCF-7 (**A**; MW \pm SEM; $n \geq 2(3)$) und U373 (**B**; MW \pm SEM; $n \geq 2(3)$) nach sechs Tagen in Kultur. Die unterschiedlichen Zellzahlen beziehen sich auf die Zellzahl am Tag der Aussaat t_0 . Die Radien für Sphäroide in Suspension wurden mittels mikroskopischer Aufnahmen am Phasenkontrastmikroskop bestimmt. Aus den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen am CLSM wurden die Radien (xy-Schnitt) und die Höhen (xz-Schnitt) der adhärenen Sphäroide quantifiziert.

6.1.3 Diskussion

Die Sphäroide der Zelllinien MCF-7 und U373 wurden nach der *liquid overlay* Methode generiert. Der Einfluss der Kulturzeit wurde über einen Zeitraum von sechs Tagen durch Aufnahmen an einem inversen Phasenkontrastmikroskop dokumentiert. Die anfängliche Größe der Zellaggregate 24 h nach Zellaussaat wurde dabei durch variierende Aussaatdichten kontrolliert, wobei der Durchmesser mit zunehmender Zellzahl steigt. Anschließend wurde für beide Zelllinien eine Phase der Kompaktierung beobachtet, in welcher die Durchmesser zunächst abnehmen. Dieser Prozess endet bei MCF-7 Sphäroiden nach 24 h mit der Bildung sphärischer Aggregate mit glatten Oberflächen. Anschließend zeigen diese ein lineares Wachstumsverhalten im Durchmesser. Dabei besitzen Sphäroide mit kleinen Aussaatdichten große Wachstumsraten. Mit zunehmender Zellzahl nehmen diese kontinuierlich ab, sodass sich die Durchmesser über die Kulturzeit nur noch marginal ändern. U373 Sphäroide schrumpfen hingegen exponentiell während des gesamten Beobachtungszeitraumes, wobei die Kompaktierung bei höheren Aussaatdichten stärker ausgeprägt ist. Das Verhalten der Zellaggregate während der Kulturzeit ist somit von deren Größe und vom Zelltyp abhängig. Zudem wird dieses durch die drei Phasen der anfänglichen Aggregatbildung (Bildung loser Aggregate, Kompaktieren und Beginn des Wachstums) und demnach einer variierenden Wachstumskinetik beeinflusst (Amereh et al., 2021; Costa et al., 2016; Smyrek et al., 2019; Sutherland, 1988). Freyer (1988) beobachtete mikroskopisch das Wachstumsverhalten von Sphäroiden verschiedener Zelllinien. Sowohl die Volumina von Sphäroiden mit Tumor- als auch normalen Zelllinien zeigten über einen Zeitraum von 30 Tagen eine anfänglich exponentielle Wachstumsphase, gefolgt von einer Abnahme der Wachstumsrate bis zum Erreichen eines nahezu konstanten Volumens. Die Dauer der jeweiligen Phasen variierte dabei je nach Zelltyp. Zudem waren Unterschiede in den Wachstumsraten und den konstanten, maximalen Größen (Sättigungsgröße) zwischen den Zelltypen erkennbar. Gong et al. (2015) untersuchten das Wachstum von MCF-7 Sphäroiden der Aussaatdichten 2k-, 4k-, und 8k Zellen/Well über einen Zeitraum von 15 Tagen. Von Tag 1 auf Tag 2 nahm in jedem Fall der Durchmesser ab. Anschließend wuchsen die Zellaggregate bis zum Erreichen einer Plateauphase nach circa 12 – 15 Tagen. Die

Wachstumsrate im Durchmesser war mit 31 % bei 2k Zellen/Well am größten und nahm auf 8 % ab bei 8k Zellen/Well. Ebenso wurde der maximale Durchmesser bei großen Sphäroiden früher erreicht. Die anfängliche Kompaktierung dauerte bei DLD1 Sphäroiden mit einer Zelldichte von 10k Zellen/Well vier Tage an, bevor diese wuchsen (Grimes, Kelly et al., 2014). Während eines Zeitraums von 14 Tagen beobachteten Carrasco-Mantis, Randelovic et al. (2023) eine Reduzierung des Durchmessers um nahezu die Hälfte für Sphäroide der humanen Glioblastomzelllinie U251. Ebenso zeigten T98G Sphäroide mit einer Aussaatdichte von 2k Zellen/Well kein Wachstum über eine Zeit von zehn Tagen, sondern vielmehr eine leichte Abnahme im Durchmesser (Calori et al., 2022). Die variierenden Charakteristika im Wachstum von Sphäroiden unterschiedlicher Zelllinien können unter Berücksichtigung verschiedener Aspekte begründet werden: die Zellpackungsdichte, interzelluläre Wechselwirkungen und die Bildung von biologischen Zonen. So stellten Bell et al. (2001) während einer Studie über fünf Wochen fest, dass sich die Zellzahl in U373 Sphäroiden innerhalb von drei Wochen kaum änderte, jedoch sank die **Zellpackungsdichte**. Erst ab der dritten Woche nahmen die Zellzahl und die Zellpackungsdichte zu. In der Studie von S. Y. Lee et al. (2010) wurde die Bildung dicht gepackter MCF-7 Sphäroide mit einer Aussaatdichte von 400 Zellen/Well mit starken Zell-Zell Interaktionen durch die Expression von E-Cadherinen auf der Oberfläche der Zellen in Verbindung gebracht. Ebenso führten Cui et al. (2017) die dichte Packung in MCF-7 Sphäroiden auf E-Cadherine zurück, während eine geringe Expression von eben diesen in U373 Zellen beobachtet wurde (Xia et al., 2010). Somit steht die Zellpackungsdichte in einem engen Zusammenhang mit **interzellulären Adhäsionskräften**, wie über E-Cadherine und β -Integrine ausgeübt. Erstere gehören zur Familie der Transmembranproteine, welche von Calciumionen abhängig sind, und unterstützen stabile Zell-Zell Interaktionen. Zweitere sind Adhäsionsproteine, welche die Zellen mit der extrazellulären Matrix verbinden. Die Etablierung solch komplexer Zell-Zell und Zell-Matrix Kontakte fördert die schnelle Bildung von kompakten Sphäroiden. Infolgedessen kompaktieren die Zellaggregate bis zu einem minimalen Radius, was die Expression von β -Integrinen erhöht. Dies wiederum löst die Expression von E-Cadherin aus, was den Zeitraum des Kompaktierens bestimmt (Lin et al., 2006; Smyrek et al., 2019; Swami, 2014). Sobald eine kompakte Struktur

gebildet ist, beginnt daraufhin das Wachstum durch Zellproliferation im Sphäroid (Amereh et al., 2021). Mit dem Ziel, das Wachstumsverhalten von MCF-7 Sphäroiden analysieren zu können, wurde die benötigte Zeit, um das initiale Volumen zu verdoppeln, graphisch für die Zelldichten 4k Zellen/Well und 12k Zellen/Well quantifiziert. Mit Werten von (4 ± 5) d und (16 ± 2250) d sind die Verdopplungszeiten bedeutend größer als für adhärente Zellen im *Monolayer* mit (27 ± 1) h. Einen ähnlichen Unterschied zwischen 2D und 3D Gewebemodellen ermittelten Aghamiri et al. (2019). Die Verdopplungszeit für MCF-7 Sphäroide mit einem initialen Durchmesser von $300 \mu\text{m}$ lag bei circa (42 ± 1) h im Vergleich zu circa $(22,5 \pm 0,2)$ h für die 2D Zellkultur. Trotz der Tatsache, dass der Durchmesser ähnlich zu dem MCF-7 Sphäroid mit 4k Zellen/Well mit $(334 \pm 2) \mu\text{m}$ ist, sind die Verdopplungszeiten unterschiedlich. Der Grund hierfür könnte darin liegen, dass im Gegensatz zur Analyse in dieser Arbeit, in der Studie von Aghamiri et al. (2019) das Medium zweimal wöchentlich während des Wachstums gewechselt wurde. Tannock und Kopelyan (1986) kamen jedoch zu dem Schluss, dass ein Wechsel des Mediums keinen Einfluss auf das Wachstum von MGH-U1 Sphäroide hat. Haji-Karim und Carlsson (1978) beobachteten, dass die Zeit für die Verdopplung des Volumens von U118-MG Sphäroiden umso länger ist, je größer der Durchmesser ist. Ebenso stellten Marusić et al. (1994) mithilfe mathematischer Modelle fest, dass sich die Verdopplungszeiten in 2D und 3D unterscheiden. In der Studie von Sutherland (1988) stellte die Verdopplungszeit in 2D sogar die untere Grenze von derjenigen in 3D dar. Somit könnte die langsamere Verdopplungszeit im Wesentlichen von der Größe der Sphäroide abhängen und der damit einhergehenden Erzeugung **biologischer Zonen**. Da nur die proliferative Zone für das Wachstum verantwortlich ist (Sutherland, 1988), wurde diese rechnerisch für MCF-7 Sphäroide der beiden Zelldichten bestimmt. Dabei wurden die Schichtdicken der proliferativen Zonen mit $70 \mu\text{m}$ (4k Zellen/Well) und $60 \mu\text{m}$ (12k Zellen/Well) quantifiziert, welche mit den berichteten Werten von $50 - 350 \mu\text{m}$ in der Literatur übereinstimmen (Ballangrud et al., 1999; Haji-Karim & Carlsson, 1978; Mueller-Klieser, 1987; Sutherland, 1988). Demnach ist die Schichtdicke der proliferativen Zone bei kleineren Aussaatdichten größer und die Verdopplungszeit kürzer. Von einem ähnlichen Zusammenhang berichteten Olea et al. (1992), welche das Wachstum von MCF-7 Sphäroiden mit verschiedenen Durchmessern ($200 \mu\text{m} < d < 750 \mu\text{m}$) über 30

Tage charakterisierten. In Kombination mit einem radiomarkierten Thymidin DNA-Labeling (^3H -TdR) quantifizierten diese zusätzlich die proliferative Aktivität der Zellen. Bei Sphäroiden mit $d < 200\ \mu\text{m}$ war die Verdopplungszeit einerseits ähnlich zu adhären Zellen im *Monolayer*. Andererseits war das radiomarkierte Thymidin homogen im gesamten Sphäroid verteilt. Mit zunehmender Größe ($d > 750\ \mu\text{m}$) waren die mit Thymidin markierten Zellen nur noch im äußeren Rand erkennbar und die Verdopplungszeit erhöhte sich auf bis zu 20 d. Analog konnten Bredel-Geissler et al. (1992) die proliferative Zone in EMT6/Ro Sphäroiden auf wenige Zelllagen am Rand beschränken. Eine weitere Färbemethode mit einem ähnlichen Resultat nutzten Riffle et al. (2017). Mittels dem Antigen Ki-67 markierten sie proliferative Zellen in A673 Sphäroiden und beobachteten eine komplette Färbung bei $d \approx 400\ \mu\text{m}$. Sobald der Durchmesser größer als $500\ \mu\text{m}$ war befanden sich die Ki-67 positiven Zellen zwischen $70 - 150\ \mu\text{m}$ vom Rand des Sphäroids entfernt, wobei der Abstand mit zunehmendem Durchmesser abnahm. Zudem ist die Dicke des lebensfähigen Randes laut Freyer (1988) der einzige Parameter, für welchen ein direkter Einfluss auf die Sättigungsgröße in Sphäroiden unterschiedlicher Zelllinien nachgewiesen werden konnte. Die Erklärung hierfür beruht auf einem Modell, welches von Landry et al. (1982) entwickelt wurde und von Freyer und Sutherland (1986) bestätigt wurde. In diesem deskriptiven Modell hängt das Wachstum eng mit der Lebensfähigkeit der Zellen im 3D System zusammen. Bei kleinen Sphäroiden sind die Faktoren, welche beide Phänomene begünstigen (*growth promoters* und *viability promoters*), unabhängig voneinander, da sie alle Zellen erreichen. Infolge des Wachstums sinkt die Konzentration der wachstumsfördernden Koeffizienten im Zentrum und es kommt zur Bildung von biologischen Zonen. Durch das fortschreitende Wachstum als Folge der Mitose in der proliferativen Zone sinkt die Konzentration der *viability promoters*, wie Sauerstoff oder Glukose, mit zunehmender Entfernung von der Oberfläche des Sphäroids. Es entstehen Konzentrationsgradienten, welche zur Entwicklung von Nekrose führen können. Sobald dieser Zeitpunkt eingetreten ist, wird die Proliferation in den äußeren Schichten durch die Diffusion zytostatischer Faktoren, wie metabolischer Abfallprodukte, aus dem Zentrum gehemmt. Die Dicke des lebensfähigen Rands wird daraufhin sukzessiv reduziert, bis es zum Stillstand des Wachstums kommt und eine Sättigungsgröße erreicht wird. Basierend auf den

Erkenntnissen des Modells konnte in der Studie mit EMT6/Ro Sphäroiden nachgewiesen werden, dass das Wachstum von Sphäroiden positiv mit den biologischen Zonen und den resultierenden Konzentrationsgradienten von Glukose, Sauerstoff oder Stoffwechselabfallprodukten korreliert. Den Zusammenhang zwischen variierendem Sauerstofflevel, dem Wachstum von MGH-U1 Sphäroiden und dem Zelltod untersuchten ebenfalls Tannock und Kopelyan (1986). Diese konnten zeigen, dass bei einer Abnahme der Sauerstoffkonzentration das Wachstum verlangsamt wird. Bull et al. (2020) analysierten die zelluläre Dynamik in Sphäroiden im Rahmen mathematischer Modellierungen und gelangten zu ähnlichen Erkenntnissen hinsichtlich den Nährstoffkonzentrationen und dem Sphäroidwachstum.

6.2 Sauerstoffverteilung in Sphäroiden

In allen *in silico* Modellen zur Untersuchung der Oxygenierung in multizellulären Sphäroiden wurden Fick'sche Diffusionsprozesse und eine Reaktionskinetik nach Michaelis-Menten vorausgesetzt, da die Sauerstoffverteilung über das Gleichgewicht aus Sauerstoffdiffusion und -verbrauch bestimmt ist (Mueller-Klieser, 1984). Dabei wurden die Diffusionskoeffizienten von Sauerstoff im umgebenden Medium sowie im Sphäroid selbst als konstant angenommen. Gleiches gilt für die maximalen volumenbezogenen Sauerstoffverbrauchsrate R_{\max} , nachdem deren Wert *in silico* bestimmt wurde. Die Integration über den Ausdruck der Michaelis-Menten Verbrauchskinetik im *Postprocessing* der Modellierung ermöglicht anschließend die Quantifizierung der globalen Sauerstoffverbrauchsrate R_{global} . Weitere Grundlagen der mathematischen Modellierung sowie eine detaillierte Aufführung der modelltechnischen Annahmen sind **Kapitel 4.3.2** und **4.3.4** zu entnehmen. Die Einheiten der Sauerstoffverbrauchsrate wurden für R_{\max} in den COMSOL Standardeinheiten $\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$ und für R_{global} in $\text{pmol}\cdot\text{s}^{-1}$ angegeben. Das Vorgehen beim Runden erfolgte auf die gleiche Art und Weise wie in **Kapitel 5** erläutert. Die *in vitro* Ergebnisse wurden auf signifikante Stellen gerundet. Bei den *in silico* Daten hingegen wurde eine andere Rundungsmethode verwendet, da sonst marginale Unterschiede nicht sichtbar gemacht hätten werden können. So wurden diese auf maximal zwei Nachkommastellen gerundet, wobei die Rundungsstelle je nach Wert der nachfolgenden Stelle auf- (Wert der Folgestelle: ≥ 5) beziehungsweise abgerundet (Wert der Folgestelle: < 5) wurde. Bei der Darstellung der Eingangsvariablen in COMSOL wurde hingegen auf das Runden verzichtet, da die Angabe der exakten Werte essenziell für reproduzierbare Simulationsergebnisse ist.

6.2.1 Einfluss kritischer Parameter auf die *in silico* Sauerstoffverteilung

Die Ergebnisse aus **Kapitel 6.1.2** zeigen, dass sich die Geometrie der Sphäroide im Zuge des Adhäsionsprozesses ändert. Die quantifizierten Werte für den Radius r und die Höhe h variieren zudem je nach Zelltyp und Zellzahl. Diese Tatsache führt in Kombination mit den grundlegenden Annahmen des Modells dazu, dass die geometrischen Parameter zusammen mit der maximalen volumenbezogenen

Sauerstoffverbrauchsrate R_{\max} , welche aus einer Anpassung der *in silico* Sauerstoffprofile an diejenigen der sensorischen Messung resultiert, die einzigen *Inputvariablen* in den Simulationen darstellen. Hierbei sei anzumerken, dass der bereits erläuterte Zusammenhang zwischen R_{\max} und R_{global} bei den Analysen stets berücksichtigt werden muss. Demzufolge wird in diesem Abschnitt der Einfluss dieser Parameter auf die stationären *in silico* Sauerstoffprofile eines adhärenen Modellsphäroids bei $t = 1 \text{ h}$ untersucht. Die Profile wurden dabei durch eine *2D Schnittlinie* in der *xy*-Ebene der Sauerstoff-sensitiven Sensorfolie generiert (siehe **Kapitel 4.3.6**). Dies ermöglicht die Analyse der lateralen Sauerstoffgradienten in einem Querschnitt durch das umgebende Medium und dem Sphäroid analog zur *in vitro* Sauerstoffmessung. Der Datensatz, welcher den Modellsphäroid beschreibt, ist in **Tabelle 16** zusammengefasst. Davon ausgehend wurde systematisch einer der genannten Parameter verändert, während alle anderen konstant gehalten wurden.

Tabelle 16: Auflistung der Ausgangsvariablen für die Analyse der Sauerstoffverteilung in einem adhärenen Modellsphäroid. Durch deren systematische und sukzessive Veränderung können die Einflüsse auf die Sauerstoffprofile analysiert werden.

Parameter	Wert
Radius r	150 μm
Höhe h	150 μm
Maximale Sauerstoffverbrauchsrate R_{\max}	$1,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$
Globale Sauerstoffverbrauchsrate R_{global}	0,1 $\text{pmol} \cdot \text{s}^{-1}$

Zunächst wurde der Parameter R_{\max} von $0,1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$ bis $0,1 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$ variiert. Dies wiederum impliziert eine Veränderung der Werte für R_{global} von $5,23 \cdot 10^{-3} \text{ pmol} \cdot \text{s}^{-1}$ bis $0,35 \text{ pmol} \cdot \text{s}^{-1}$. Die resultierenden Sauerstoffprofile mit dem Sauerstoffpartialdruck $p\text{O}_2$ als Funktion der Entfernung vom Zentrum des Sphäroids ($r = 0 \mu\text{m}$) sind in **Abbildung 58** gezeigt.

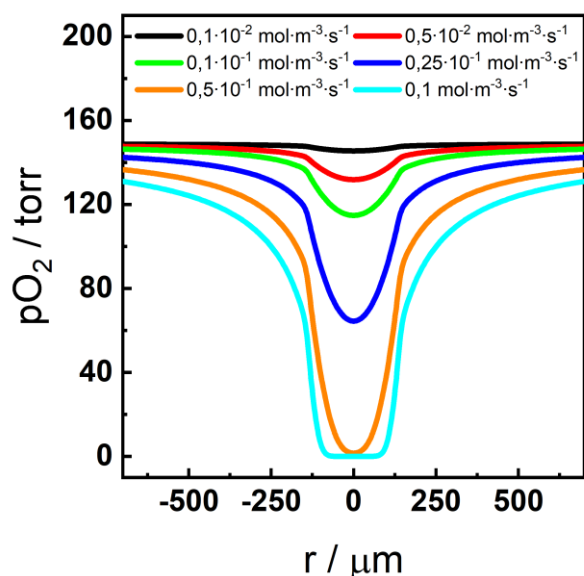


Abbildung 58: Abhängigkeit der *in silico* Sauerstoffprofile eines adhärenen Modellsphäroids von der maximalen Sauerstoffverbrauchsrate R_{\max} . Die Querschnitte durch das umgebende Medium und den Sphäroid zeigen die lateralen pO_2 Gradienten zum Zeitpunkt $t = 1$ h. Auf der x-Achse ist die radiale Distanz vom Zentrum des Sphäroids ($r = 0 \mu\text{m}$) und auf der y-Achse der Sauerstoffpartialdruck pO_2 aufgetragen. $T = 37^\circ\text{C}$.

Beinahe alle Profile besitzen eine Grundform, welche ähnlich zu der einer Parabel ist. Die Ausnahme bildet das Sauerstoffprofil für die maximale Sauerstoffverbrauchsrate von $0,1 \text{ mol}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$ (—). Dieses weist einen U-förmigen Verlauf mit einer zentralen Plateauregion bis circa $70 \mu\text{m}$ vom Zentrum des Sphäroids ($r = 0 \mu\text{m}$) entfernt auf. Die Plateauregion mit nahezu konstanten pO_2 Werten resultiert aus der Definition der Michaelis-Menten Reaktionskinetik und der darin implementierten kritischen Sauerstoffkonzentration c_{krit} . Sobald Regionen innerhalb des Sphäroids kleinere pO_2 Werte als $c_{\text{krit}} = 0,07 \text{ torr}$ annehmen, wird der Sauerstoffverbrauch in eben diesen Gebieten gestoppt und dadurch das *in vivo* Phänomen der Nekrose berücksichtigt. Jedes der dargestellten Profile zeigt zudem eine leichte Abnahme des Sauerstoffpartialdrucks außerhalb des Sphäroids ($r > r_{\text{Sphäroid}} = 150 \mu\text{m}$) und einen steilen Abfall innerhalb des Zellaggregats ($0 < r < r_{\text{Sphäroid}} = 150 \mu\text{m}$). Die Abnahme des pO_2 im Medium ist bei kleinen Werten für R_{\max} gering. Mit abnehmender radialer Entfernung zur Oberfläche des Sphäroids sinkt der Sauerstoffpartialdruck lediglich von anfänglichen 149 torr auf $147,7 \text{ torr}$ für $0,1\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$ (—) und auf $142,9 \text{ torr}$ für $0,5\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$ (—). Je größer die Werte für R_{\max} sind, desto stärker ist der

beobachtete Gradient. Ein ähnlicher Trend ist auch für die lateralen Sauerstoffgradienten innerhalb des Sphäroids zu beobachten. Diese werden mit zunehmenden Werten für R_{\max} steiler. Im Zentrum des Sphäroids variiert der pO_2 zwischen 145,5 torr (—) und 0,04 torr (—). Die Größe des Zellaggregats und der darin stattfindende Sauerstoffverbrauch bestimmen demnach im Wesentlichen die Breite und Steilheit des Sauerstoffprofils im Querschnitt von umgebendem Medium und Sphäroid. Dadurch, dass der Radius in der vorliegenden Analyse als konstant angenommen wurde, ist die Breite der Profile identisch.

Bei den Parametervariationen in **Abbildung 59** wurde der Radius r sukzessiv in 50 μm Schritten bis zu einem Wert von 400 μm erhöht. Dabei wurde in einer Analyse R_{\max} konstant gehalten (**A**) und in der anderen R_{global} (**B**), um zusätzlich die Korrelation der beiden Parameter und deren unterschiedliche Auswirkungen auf die lateralen Sauerstoffgradienten aufzuzeigen. Auf den ersten Blick wird ersichtlich, dass die Sauerstoffprofile in beiden Fällen umso breiter sind, je größer der Radius des zugrundeliegenden Sphäroids ist. Zudem sind Unterschiede in der Ausbildung der lateralen Gradienten erkennbar. Bei konstanten Werten für R_{\max} (**A**) sind diese sowohl im Medium als auch innerhalb des Sphäroids mit zunehmendem Radius ausgeprägter. So sinkt der Sauerstoffpartialdruck im Medium mit abnehmender Distanz zur Oberfläche des Sphäroids von 149 torr auf 125 torr (—) und 85 torr (—). Innerhalb des Zellaggregats nehmen die pO_2 Werte auf 87 torr (—) und 0,7 torr (—) ab. Dies liegt darin begründet, dass sich mit zunehmendem Radius auch die Volumina erhöhen und somit die globale Sauerstoffverbrauchsrate pro Sphäroid bei konstantem R_{\max} . Trotz der steigenden Differenz zwischen den pO_2 Werten am Rand des Sphäroids und im Zentrum, bleibt die Steilheit der Gradienten nahezu unverändert. Unter der Annahme von konstanten globalen Sauerstoffverbrauchsraten pro Sphäroid (**B**) sind die lateralen Gradienten im Medium nahezu identisch. Die Gradienten innerhalb des Zellaggregats verhalten sich *vice versa* zu denjenigen in (**A**). Neben deren unterschiedlicher Steigung, ist die stärkste Abnahme des pO_2 beim kleinsten Radius (—) zu beobachten, welcher im Zentrum des Sphäroids auf 87 torr sinkt. Mit wachsenden Radien steigt der Sauerstoffpartialdruck im Zentrum auf Werte zwischen 98,8 torr (—) und

122,5 torr (—). Diese Beobachtung geht mit der Tatsache einher, dass die Werte für R_{\max} , bei konstantem R_{global} , genau dann kleinere Werte annehmen, wenn r groß ist.

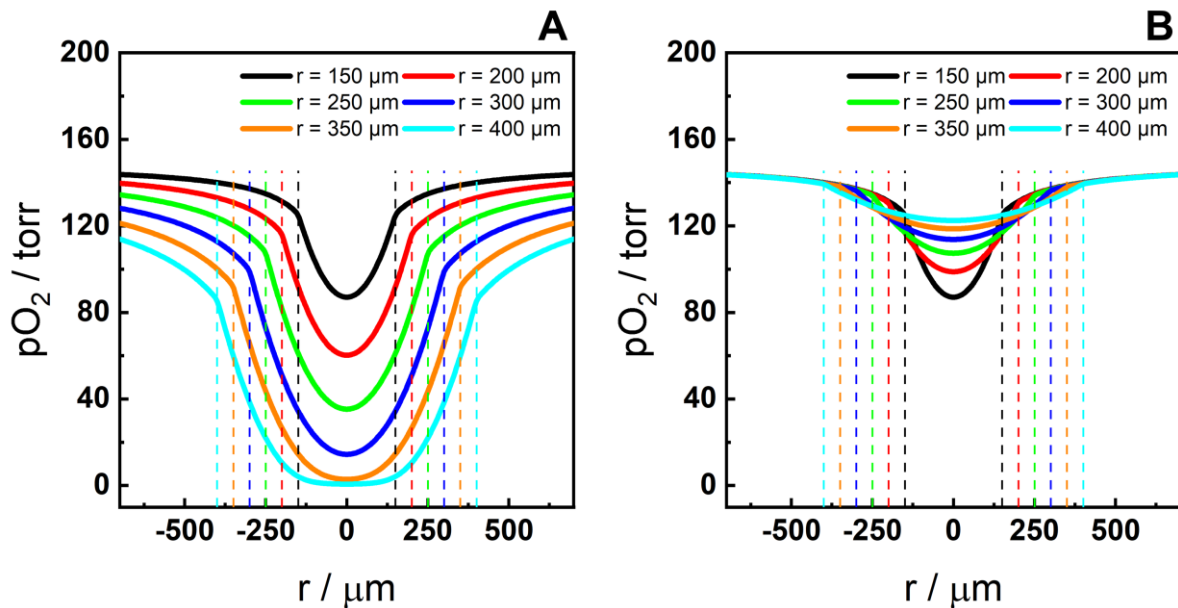


Abbildung 59: Abhängigkeit der *in silico* Sauerstoffprofile eines adhärenen Modellsphäroids vom Radius r . Die Querschnitte durch das umgebende Medium und den Sphäroid zeigen die lateralen pO_2 Gradienten zum Zeitpunkt $t = 1$ h. In **(A)** wird die maximale volumenbezogene Sauerstoffverbrauchsrate R_{\max} als konstant angenommen und in **(B)** die globale Sauerstoffverbrauchsrate R_{global} . Auf der x-Achse ist die radiale Distanz vom Zentrum des Sphäroids ($r = 0 \mu\text{m}$) und auf der y-Achse der Sauerstoffpartialdruck pO_2 aufgetragen. $T = 37^\circ\text{C}$.

In der letzten Analyse wurde die Höhe h des adhärenen Sphäroids von einer perfekten Halbsphäre ($r = h = 150 \mu\text{m}$) auf ellipsoide Formen geändert, während r konstant gehalten wurde. Aus Simulationssicht können die Höhe h und der Radius r unabhängig voneinander betrachtet werden, um deren individuelle Einflussfaktoren auf die Sauerstoffprofile zu untersuchen. Allerdings ist anzumerken, dass diese Analyse keine Entsprechung in der Realität hat, wie die mikroskopischen Studien in **Kapitel 6.1.2** gezeigt haben. Die Auswirkungen der Analyse auf die resultierenden Sauerstoffprofile (siehe **Abbildung 60**) wurden erneut bei konstanten maximalen Sauerstoffverbrauchsrate R_{\max} **(A)** untersucht sowie unter der Annahme, dass R_{global} **(B)** konstant ist. Dadurch, dass sich die Radien der Sphäroide nicht ändern, ist die Breite aller Sauerstoffprofile identisch.

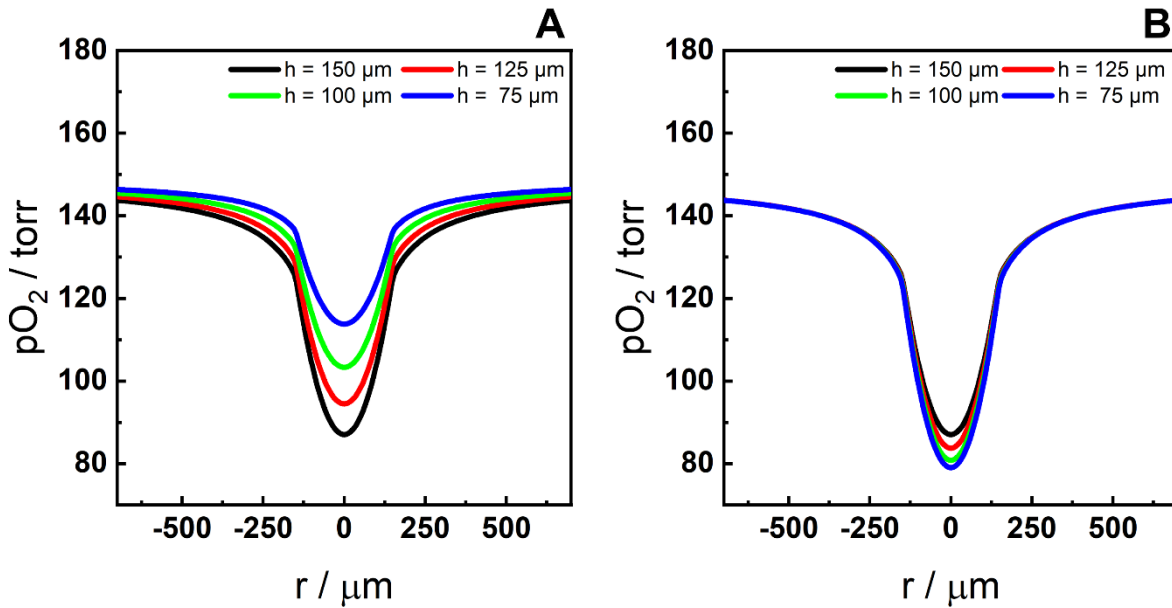


Abbildung 60: Abhängigkeit der *in silico* Sauerstoffprofile eines adhärenen Modellsphäroids von der Höhe h . Die Querschnitte durch das umgebende Medium und den Sphäroid zeigen die lateralen pO_2 Gradienten zum Zeitpunkt $t = 1$ h. In (A) wird die maximale volumenbezogene Sauerstoffverbrauchsrate R_{max} als konstant angenommen und in (B) die globale Sauerstoffverbrauchsrate R_{global} . Auf der x-Achse ist die radiale Distanz vom Zentrum des Sphäroids ($r = 0 \mu m$) und auf der y-Achse der Sauerstoffpartialdruck pO_2 aufgetragen. $T = 37^\circ C$.

Bei konstantem R_{max} (siehe **Abbildung 60 A**) ist zu beobachten, dass mit zunehmender Zirkularität der Halbsphäre der Abfall des pO_2 innerhalb des Zellaggregats umso steiler ist und die zentralen Werte sinken. Die Unterschiede der Gradienten im Medium sind hingegen weniger stark ausgeprägt. Bei genauerer Betrachtung der resultierenden Werte für R_{global} wird ersichtlich, dass diese von $h = 150 \mu m$ bis $h = 75 \mu m$ um 49,8 % sinken. Somit nimmt R_{global} im genannten Bereich nahezu im gleichen Maße ab wie die Höhe (50 %). Für den Fall, dass R_{global} konstant ist (B), unterscheiden sich die Sauerstoffprofile kaum voneinander. Hier stimmen nicht nur die Gradienten im Medium überein, sondern es ähneln sich auch diejenigen innerhalb des sauerstoffverbrauchenden Sphäroids. Der einzige Unterschied besteht in der Sauerstoffkonzentration im Zentrum, welche mit zunehmender Höhe größer ist. So weisen perfekte Halbsphären einen zentralen pO_2 von 87 torr (—) auf, während bei einer Abnahme der Höhe um 50% der pO_2 lediglich 79 torr (—) beträgt. Die Korrelation zwischen der Höhe h und der jeweils variablen Sauerstoffverbrauchsrate ist in beiden Fällen unterschiedlich. Während sich h und R_{global} bei konstanten Werten für R_{max} (A)

prozentual nahezu identisch ändern, ist der Trend zwischen h und R_{\max} bei konstantem R_{global} (**B**) entgegengesetzt. Hier sinkt die Höhe von $h = 150 \mu\text{m}$ bis $h = 75 \mu\text{m}$ zwar ebenfalls um 50 %, allerdings steigt die maximale Sauerstoffverbrauchsrate R_{\max} um 50 % an.

Zusammenfassend wird aus den Ergebnissen aus **Abbildung 59** und **Abbildung 60** deutlich, dass Veränderungen in R_{\max} und R_{global} unterschiedliche Auswirkungen auf die Sauerstoffprofile adhärenter Sphäroide haben. Dies liegt darin begründet, dass R_{\max} eine volumenbezogene Größe darstellt und R_{global} unabhängig vom betrachteten Volumen ist. Wird nun die Geometrie der Sphäroide und damit auch das Volumen verändert, führt dies trotz konstantem R_{\max} zu einer entsprechenden Änderung der globalen Verbrauchsrate pro Sphäroid. Infolgedessen nehmen die zentralen Regionen niedrigere $p\text{O}_2$ Werte an. Bei konstanten Werten für R_{global} hingegen wird angenommen, dass jeder betrachtete Sphäroid, unabhängig vom Volumen, die gleiche Rate an Sauerstoff verbraucht. Somit sind die Veränderungen in den lateralen Sauerstoffgradienten weniger stark ausgeprägt.

6.2.2 *In vitro* und *in silico* Sauerstoffgradienten in adhärenen Sphäroiden auf Sauerstoff-sensitiven Sensorfolien

Nachdem in **Kapitel 6.2.1** der Einfluss der Variablen (Radius r , Höhe h und maximale Sauerstoffverbrauchsrate R_{\max}) auf die Sauerstoffprofile eines Modellsphäroids veranschaulicht wurde, wird im Folgenden das *in silico* Modell adhärenter Sphäroide unterschiedlichen Zelltyps (MCF-7 und U373) und unterschiedlicher Zellzahl mit den empirischen Daten der ratiometrischen Sauerstoffmessungen verglichen und validiert. Die Zellzahl bezieht sich dabei immer auf diejenige am Tag der Aussaat (t_0). Die für die Modellierung nötigen geometrischen Parameter (Radius r und Höhe h) stammen aus den mikroskopischen Studien in **Kapitel 6.1.2**, welche aus Gründen der Übersichtlichkeit in **Tabelle 17** zusammengefasst sind. Davon ausgehend wurde das *in silico* Modell lediglich durch eine Variation des Parameters R_{\max} gemäß einer Augenscheinvalidität an die experimentellen Ergebnisse angepasst, da statistische Optimierungsverfahren kein Bestandteil des vorliegenden COMSOL Moduls sind. Auf die Darstellung der Fehler wurde verzichtet, da in COMSOL nur die Absolutwerte eingepflegt werden können. Die

laterale Sauerstoffverteilung wurde *in vitro* am siebten Tag der Kulturzeit über einen Zeitraum von 1 h in 200 μL L-15 Medium in einem offenen System aufgezeichnet (37°C und 0 % CO_2). Dies liegt darin begründet, dass weitere *in vitro* Studien, welche nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit sind, gezeigt haben, dass sich die Profile im Allgemeinen ab $t = 1\text{ h}$ nicht mehr wesentlich verändern.

Tabelle 17: Darstellung der gemittelten Werte für die Parameter r (Radius) und h (Höhe) der adhärenen Sphäroide unterschiedlichen Zelltyps und Zellzahl (t_0) am siebten Tag der Kulturzeit, welche im Rahmen der geometrischen Modellierung verwendet wurden. Die Daten stammen aus den CLSM-Studien aus Kapitel 6.1.2.

Zelltyp	Zellzahl (t_0) / Zellen/Well	Radius r / μm	Höhe h / μm
MCF-7	4k	231,9	173,1
MCF-7	12k	282,4	192,6
MCF-7	16k	303,5	215,4
MCF-7	20k	317,9	223
U373	6k	143,5	123,7
U373	10k	161,4	138,3
U373	20k	203,4	161,6
U373	30k	252,8	167,9

Die Sauerstoffprofile der *in vitro* und *in silico* Studien zum Zeitpunkt $t = 1\text{ h}$ sind in **Abbildung 61** in Abhängigkeit vom Zelltyp (MCF-7: **A**; U373: **B**) und der Zellzahl gezeigt. Die gestrichelten Profile symbolisieren die Ergebnisse der *in silico* Modellierung nach Optimierung des Parameters R_{max} und die durchgezogenen Kurven stellen die empirischen Daten der ratiometrischen Sauerstoffmessungen dar. Auf den ersten Blick wird deutlich, dass die *in silico* Sauerstoffprofile für beide Zelltypen, mit Ausnahme der MCF-7 Sphäroide mit 20k Zellen/Well (—), eine Grundform besitzen, welche ähnlich zu der einer Parabel sind. Die Sauerstofflevel nehmen im umgebenden Medium zunächst leicht ab. Eine drastischere Abnahme des pO_2 ist hingegen von der Oberfläche des Sphäroids ($r = r_{\text{Sphäroid}}$) zum Zentrum ($r = 0\text{ }\mu\text{m}$) zu beobachten. Zudem ist die Differenz zwischen den normoxischen pO_2 Werten im Medium und denjenigen

im Zentrum umso stärker, je größer die betrachtete Zellzahl – und damit auch der Sphäroid – ist. Ähnliches wird für die *in vitro* Ergebnisse sichtbar, wobei MCF-7 Sphäroide mit 12k Zellen/Well (—), 16k Zellen/Well (—) und 20k Zellen/Well (—) zentrale Plateauregionen aufweisen. Die Übereinstimmung zwischen den lateralen *in vitro* und *in silico* Sauerstoffgradienten ist für adhärente Sphäroide aus U373 Zellen (B) besser als für MCF-7 Zellaggregate (A).

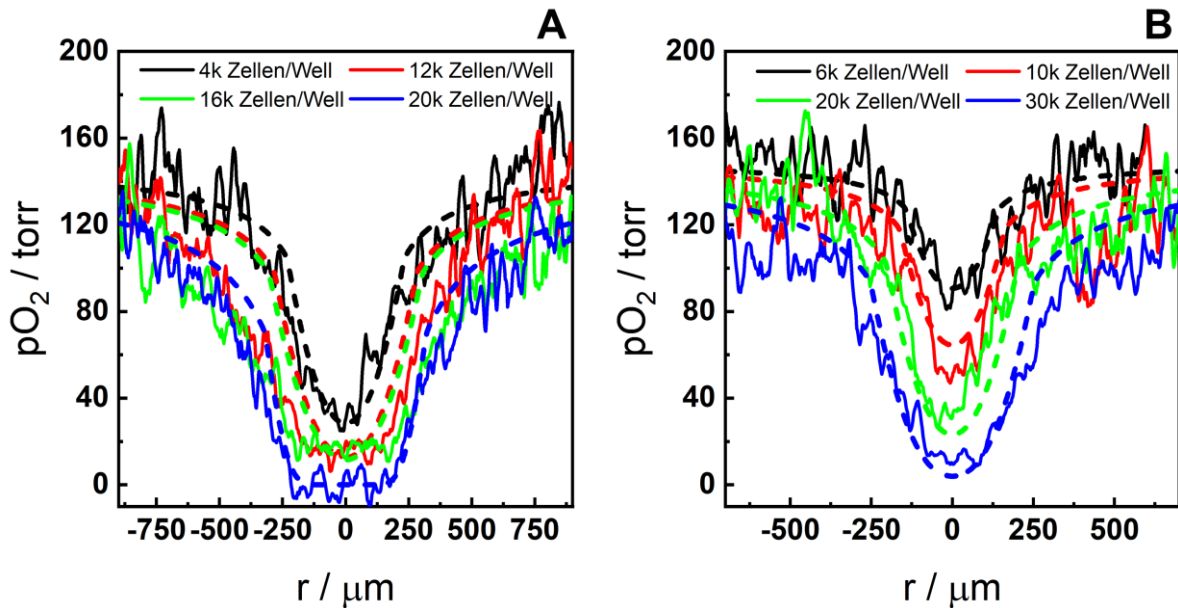


Abbildung 61: Laterale pO₂ Gradienten aus dem Querschnitt durch das umgebende Medium und den Sphäroid aus MCF-7 Zellen (A) bzw. U373 Zellen (B) unterschiedlicher Aussaatdichte zum Zeitpunkt $t = 1$ h nach Beginn der Messung. Die gestrichelten Profile zeigen die Ergebnisse der *in silico* Modellierung. Die durchgezogenen Kurven stellen die empirischen Daten der ratiometrischen Sauerstoffmessungen dar, welche in einem Zellkulturinkubator bei 37° C und 0 % CO₂ durchgeführt wurden. Auf der x-Achse ist die radiale Distanz vom Zentrum des Sphäroids ($r = 0$ µm) und auf der y-Achse der Sauerstoffpartialdruck pO₂ aufgetragen.

Die Werte für die volumenbezogenen Sauerstoffverbrauchsraten R_{\max} und die globalen Sauerstoffverbrauchsraten R_{global} adhärenter U373 Sphäroide, welche sich im Zuge der Anpassung ergeben, sind in **Tabelle 18** dargestellt. Mit zunehmender Zellzahl wächst die Größe der Sphäroide und somit auch die globale Verbrauchsrate pro Sphäroid, wenngleich bei den Werten für R_{\max} kein derartiger Trend zu beobachten ist.

Tabelle 18: Daten der maximalen und globalen Sauerstoffverbrauchsraten der *in silico* Sauerstoffprofile adhärenter U373 Sphäroide aus **Abbildung 61 B**. Die Werte für R_{\max} wurden nicht gerundet, da kleinste Veränderungen in den Eingabevariablen zu veränderten Ergebnissen führen würden.

Zellzahl (t_0) / Zellen/Well	R_{\max} / $\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$	R_{global} / $\text{pmol}\cdot\text{s}^{-1}$
6k	$1,72\cdot 10^{-2}$	0,09
10k	$1,99\cdot 10^{-2}$	0,15
20k	$2,02\cdot 10^{-2}$	0,27
30k	$1,85\cdot 10^{-2}$	0,39

Da die Profile für MCF-7 Sphäroide in **Abbildung 61 A** nur schwer voneinander unterscheidbar sind, sind diese nochmals einzeln für jede betrachtete Zellzahl (t_0) in **Abbildung 62** gezeigt. Somit werden die Diskrepanzen zwischen den lateralen pO_2 Gradienten im Experiment und der Simulation deutlicher hervorgehoben. Während die Profile für 4k Zellen/Well (**A**) und 20k Zellen/Well (**D**) gut übereinstimmen, sind die Abweichungen bei 12k Zellen/Well (**B**) und 16k Zellen/Well (**C**) drastischer. Obwohl die Sauerstoffkonzentrationen im Zentrum mit durchschnittlichen Werten von (16 ± 4) torr (—) und $(12,3 \pm 0,8)$ torr (—) sehr ähnlich sind, weisen die experimentellen Profile zentrale Plateauregionen auf. Zudem sind eindeutige Unterschiede in den Gradienten von der Oberfläche des Sphäroids zum Zentrum hin zu beobachten. Diese bilden sich in den Simulationen bei viel kleineren Radien aus als in den experimentell ermittelten Profilen. Zusammen mit den Daten aus **Abbildung 59 A** führt dies zu der Vermutung, dass die Radien der untersuchten Sphäroide in der ratiometrischen Sauerstoffmessung anders waren als in der zugrundeliegenden CLSM-Studie.

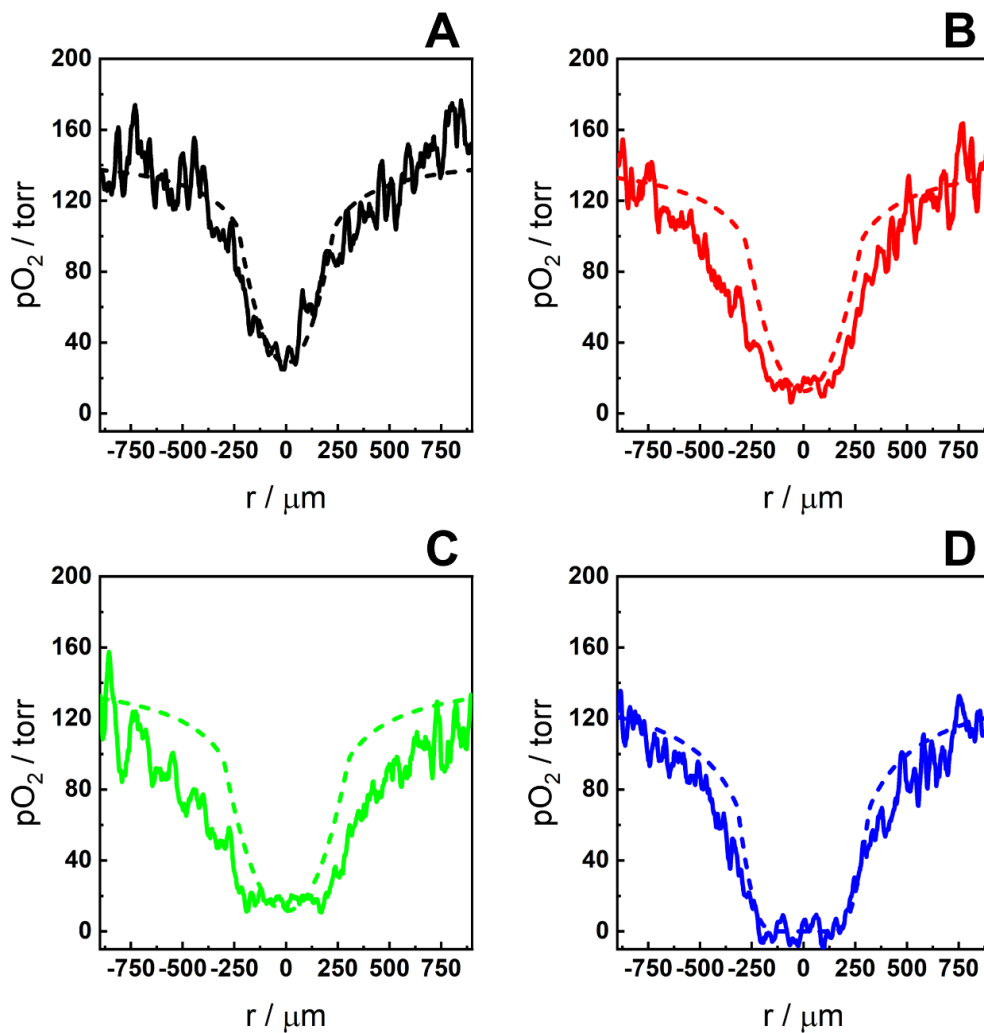


Abbildung 62: Laterale pO_2 Gradienten aus dem Querschnitt durch das umgebende Medium und den Sphäroid aus MCF-7 Zellen zum Zeitpunkt $t = 1$ h nach Beginn der Messung. Die gestrichelten Profile zeigen die Ergebnisse der *in silico* Modellierung und die durchgezogenen Kurven die empirischen Daten der ratiometrischen Sauerstoffmessung für einen adhären Sphäroid mit einer initialen Zellzahl von 4k Zellen/Well (A), 12k Zellen/Well (B), 16k Zellen/Well (C) und 20k Zellen/Well (D). Auf der x-Achse ist die radiale Distanz vom Zentrum des Sphäroids ($r = 0 \mu m$) und auf der y-Achse der Sauerstoffpartialdruck pO_2 aufgetragen. $T = 37^\circ C$.

Infolgedessen wurden die Parameter r , h und R_{max} schrittweise verändert, mit dem Ziel, eine bessere Übereinstimmung zwischen den Profilen zu erhalten. Dazu wurde zunächst eine Parametervariation des Radius r in COMSOL durchgeführt, da der Radius die Profile maßgeblich hinsichtlich deren Breite verändert (siehe **Abbildung 59**). Nachdem eine hinreichend genaue Lösung für r gefunden wurde, wurde der dazugehörige Wert für die Höhe h über eine lineare Fitfunktion im Rahmen einer Interpolationsstudie berechnet. Dazu wurden Wertepaare für r und h

aus den CLSM-Studien geplottet (siehe **Abbildung 63**), um die experimentell ermittelte Beziehung zwischen den Parametern zu berücksichtigen. Die Legitimation einer linearen Fitfunktion wird dabei unter Anführung von drei Gründen gerechtfertigt. Wenngleich die Daten einen parabolischen Zusammenhang vermuten lassen, wäre die berechnete Höhe irgendwann größer als der Radius, was generell und gemäß den Daten der CLSM-Studie relativ unwahrscheinlich ist. Das zweite Argument liegt darin begründet, dass das Verhältnis zwischen den experimentell ermittelten Werten für r und h nahezu konstant bleibt. Zudem ist der betrachtete Wertebereich der Radien auf der x-Achse mit knapp $100\ \mu\text{m}$ relativ klein. Würde eben dieser durch Hinzunahme weiterer Auslesepunkte und unter Beibehaltung des zugrundeliegenden Verhältnisses vergrößert werden, würde die Legitimation des linearen Fits auch optisch ersichtlich werden.

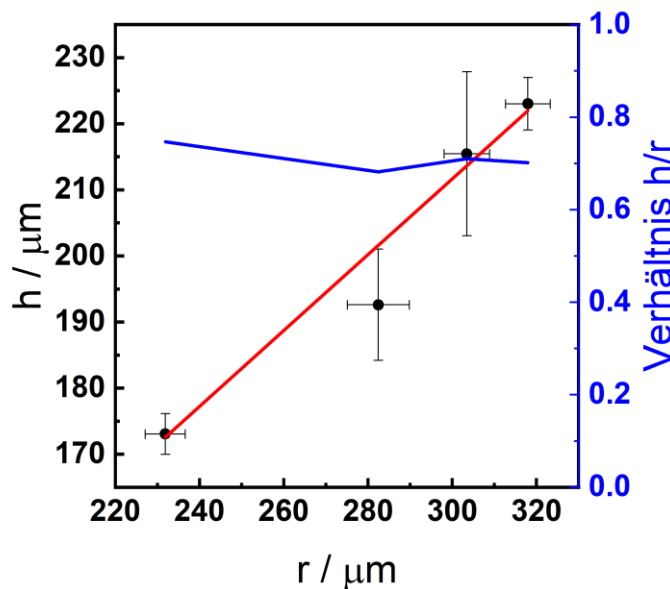


Abbildung 63: Darstellung der Höhe h als Funktion des Radius r . Die Daten stammen aus der CLSM-Studie in **Kapitel 6.1.2** für adhärenente MCF-7 Sphäroide unterschiedlicher Zellzahl (t_0). Mit dem Ziel die Radien der Sphäroide aus der ratiometrischen Sauerstoffmessung zu ermitteln, wurde zunächst eine Parametervariation über r in COMSOL durchgeführt. Nachdem eine hinreichend genaue Lösung gefunden wurde, wurden die dazugehörigen Höhen h mittels einer linearen Fitfunktion berechnet. Das nahezu konstante Verhältnis zwischen den Datenpunkten legitimiert dessen Anwendung.

Die neuen Werte für r und h , welche aus dem dargestellten Vorgehen resultieren, sind **Tabelle 19** zu entnehmen.

Tabelle 19: Darstellung der neu ermittelten Werte für die Parameter r (Radius) und h (Höhe) der adhärennten MCF-7 Sphäroide unterschiedlicher Zellzahl (t_0). Die Werte wurden im Rahmen einer Interpolationsstudie mittels einer linearen Fitfunktion ($h = mr + b$) berechnet. Dabei sind die Parameter der Fitfunktion wie folgt definiert: h : Höhe [μm], r : Radius [μm], m : Steigung [$(0,57 \pm 0,05) \mu\text{m}^{-1}$] und b : Ordinatenabschnitt [$(39,577 \pm 12,227) \mu\text{m}$].

Zellzahl (t_0) / Zellen/Well	Radius r / μm	Höhe h / μm
4k	250	183
12k	400	269
16k	440	292
20k	480	315

Anschließend wurde erneut versucht, unter Verwendung der Parameter in **Tabelle 19** und einer Variation der maximalen Sauerstoffverbrauchsrate R_{max} , eine adäquate Übereinstimmung zwischen den Sauerstoffprofilen aus der Messung und der Modellierung zu erhalten. Wie aus **Abbildung 64** ersichtlich wird, ist die Übereinstimmung zwischen den lateralen pO_2 Gradienten aus dem Querschnitt durch das umgebende Medium und den Sphäroid bedeutend besser als in **Abbildung 62**. Bei den Profilen **(C)** und **(D)** sind die Standardfehler des Mittelwerts für den Sauerstoffpartialdruck an der Oberfläche des *in silico* und *in vitro* Sphäroids gesunken. So liegen diese bei (90 ± 9) torr in **(C)** und bei $(85,5 \pm 10,8)$ torr in **(D)**, während der gemittelte pO_2 in **Abbildung 62 B** einen Wert von (79 ± 18) torr annimmt und in **Abbildung 62 C** von (78 ± 20) torr. Hierbei sei anzumerken, dass die Werte an definierten radialen Distanzen unter Berücksichtigung der Schwankungen der experimentellen Daten analysiert werden müssen. Nichtsdestotrotz sind die *in vitro* und *in silico* Sauerstoffprofile adhärenter MCF-7 Sphäroide ähnlich für jede betrachtete Zellzahl. Aufgrund der besseren Übereinstimmung wird deutlich, dass die morphometrischen Maße entscheidend sind für valide *in silico* Ergebnisse. Diese können sich jedoch oftmals aufgrund externer Einflüsse in der Kultivierung ändern, selbst dann, wenn es sich um Sphäroide des gleichen Zelltyps und der gleichen Aussaatdichte handelt.

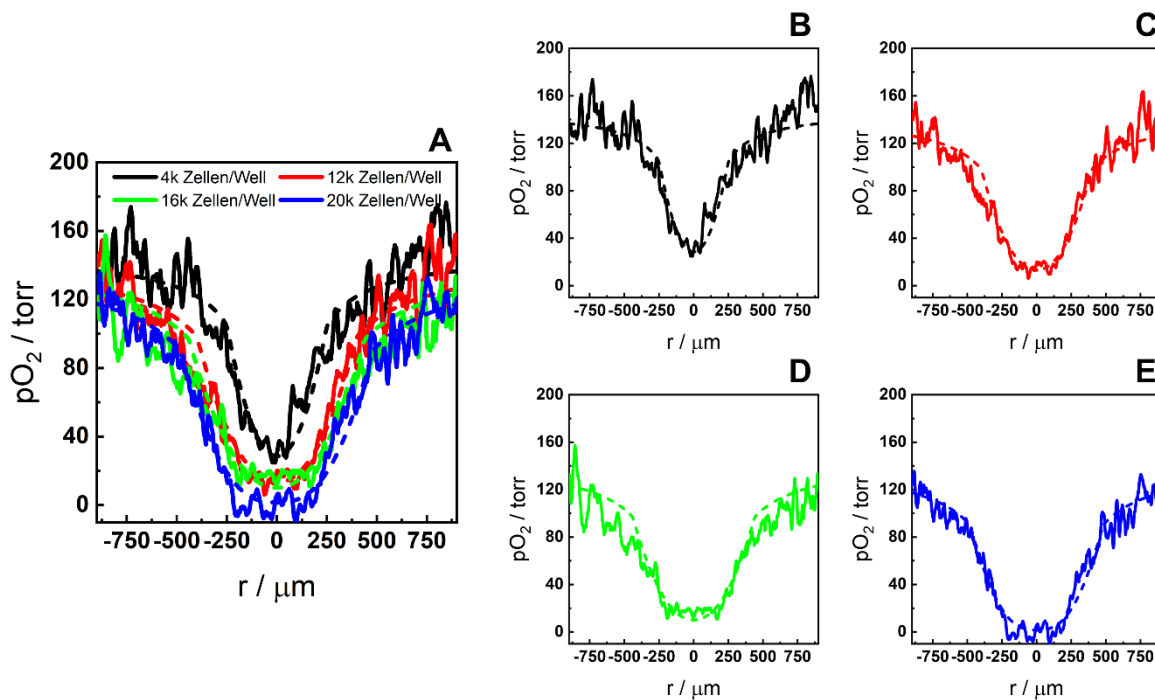


Abbildung 64: Laterale pO_2 Gradienten aus dem Querschnitt durch das umgebende Medium und den MCF-7 Sphäroid zum Zeitpunkt $t = 1$ h nach Beginn der Messung. Die gestrichelten Profile zeigen die Ergebnisse der *in silico* Modellierung und die durchgezogenen Kurven die empirischen Daten der ratiometrischen Sauerstoffmessung. Während in (A) eine zusammenfassende Darstellung der Sauerstoffprofile für Sphäroide aller Zellzahlen gezeigt ist, sind diese nochmals einzeln in (B) – (E) unter Verwendung der gleichen Farben abgebildet. Auf der x-Achse ist die radiale Distanz vom Zentrum des Sphäroids ($r = 0 \mu m$) und auf der y-Achse der Sauerstoffpartialdruck pO_2 aufgetragen. $T = 37^\circ C$.

Eine vergleichende Übersicht der resultierenden Sauerstoffverbrauchsraten R_{max} und R_{global} der Parameteroptimierung ist für beide Herangehensweisen in **Tabelle 20** gezeigt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden dabei die mikroskopisch untersuchten Sphäroide mit dem Zusatz (M) versehen. Die Werte für die Sphäroide, welche aus den geometrischen Daten der *in vitro* Sauerstoffmessung hervorgehen, erhalten den Vermerk (S).

Tabelle 20: Daten der maximalen und globalen Sauerstoffverbrauchsrate für die MCF-7 Sphäroide mit den *in silico* Sauerstoffprofilen in **Abbildung 61 A** und **Abbildung 64** bei $t = 1$ h. Der Zusatz (M) steht dabei für die mikroskopisch untersuchten Sphäroide. Die Daten zu den Sphäroiden aus dem beschriebenen Optimierungsprozess erhalten den Vermerk (S). Die Werte für R_{\max} wurden nicht gerundet, da kleinste Veränderungen in den Eingabevariablen zu veränderten Ergebnissen führen würden.

Zellzahl (t_0) / Zellen/Well	R_{\max} (M) / $\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$	R_{\max} (S) / $\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$	R_{global} (M) / $\text{pmol}\cdot\text{s}^{-1}$	R_{global} (S) / $\text{pmol}\cdot\text{s}^{-1}$
4k	$1,44\cdot 10^{-2}$	$1,35\cdot 10^{-2}$	0,27	0,31
12k	$1,12\cdot 10^{-2}$	$0,65\cdot 10^{-2}$	0,34	0,55
16k	$1,01\cdot 10^{-2}$	$0,56\cdot 10^{-2}$	0,39	0,62
20k	$0,93\cdot 10^{-2}$	$0,55\cdot 10^{-2}$	0,42	0,75

Beim Vergleich der Daten wird deutlich, dass die Werte für R_{\max} und R_{global} in beiden Herangehensweisen dem gleichen Trend folgen. Die volumenbezogenen Sauerstoffverbrauchsrate nehmen in beiden Fällen ab, während die globalen zunehmen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in der allgemeinen Untersuchung der kritischen Einflussfaktoren auf die Sauerstoffprofile in **Abbildung 59** beobachtet.

Eine Besonderheit der FEM-Analysen ist, dass, neben der Quantifizierung der Absolutwerte für die maximalen und globalen Sauerstoffverbrauchsrate, zudem die lateralen Gradienten der lokalen Sauerstoffverbrauchsrate R_{O_2} visualisiert werden können. Diese Tatsache ermöglicht einen tiefergehenden Einblick in die Atmungsaktivität der Zellen innerhalb eines Sphäroids in Abhängigkeit von deren radialer Position. In **Abbildung 65** sind diese für die Sphäroide der Zelllinien MCF-7 (**A**) und U373 (**B**) dargestellt, welche aus den *in silico* Modellen mit einer guten Übereinstimmung zwischen Experiment und Simulation hervorgehen.

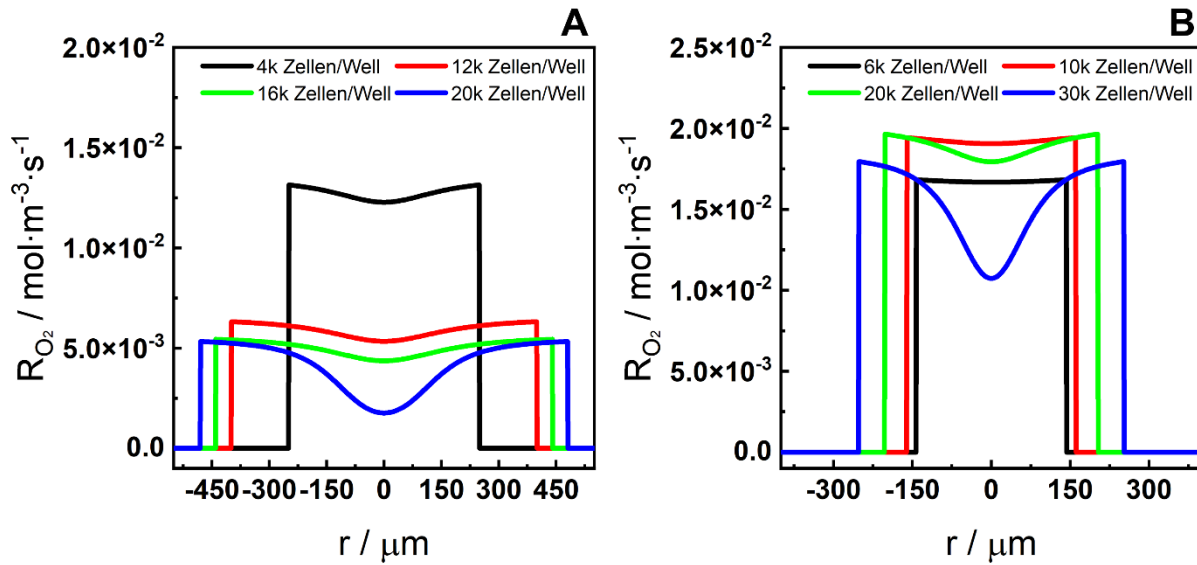


Abbildung 65: Darstellung der lokalen Sauerstoffverbrauchsrate R_{O_2} in Abhängigkeit von der radialen Distanz vom Zentrum des Sphäroids zum Zeitpunkt $t = 1$ h. In (A) sind die lateralen Gradienten für MCF-7 Sphäroide unterschiedlicher Zellzahl (t_0) gezeigt, während in (B) diejenigen für die Zellaggregate mit U373 Zellen visualisiert sind. $T = 37^\circ\text{C}$.

Die Werte der lokalen Sauerstoffverbrauchsrate an der Oberfläche des Sphäroids entsprechen bei jedem Zelltyp und jeder Aussaatdichte dem Absolutwert für R_{\max} (siehe R_{\max} (S) in **Tabelle 20** und R_{\max} in **Tabelle 18**). Außerhalb des Sphäroids im umgebenden Medium wird kein Sauerstoff verbraucht und somit ist $R_{O_2} = 0 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$. Die Gradienten innerhalb des Sphäroids sind mit zunehmender Zellzahl (t_0) stärker ausgeprägt. So ist die Atmungsaktivität der Zellen innerhalb von U373 Sphäroiden (B) mit 6k Zellen/Well (—) und 10k Zellen/Well (—) nahezu konstant. Bei den Zellaggregaten mit 20k Zellen/Well und 30k Zellen/Well sinken die Werte für R_{O_2} im Zentrum auf knapp $1,79 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$ (—) und $1,07 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$ (—). Die Gradienten der lokalen Sauerstoffverbrauchsrate innerhalb von MCF-7 Sphäroiden zeigen einen ähnlichen Trend, wenngleich dieser nicht so deutlich ist. Dies liegt darin begründet, dass die quantifizierten Werte für R_{\max} kleiner sind und somit das Gleichgewicht zwischen Diffusion und Verbrauch auch bei größeren Durchmessern leichter erhalten bleibt.

6.2.3 Sauerstoffverteilung in suspendierten Sphäroiden

Die *in vitro* Methode der ratiometrischen Sauerstoffmessung aus **Kapitel 6.2.2** ermöglicht die nicht-invasive Verfolgung der Sauerstoffgradienten über den Querschnitt des kultivierten Gewebes. Diese Tatsache stellt einen der wesentlichen Vorteile gegenüber Polarographischen Elektroden dar (Wolfbeis, 2015). Allerdings kommt es im Rahmen der ratiometrischen Methode zu einer morphologischen Veränderung des Gewebes, was der suspendierten, nicht mit Oberflächen in Kontakt tretenden Morphologie widerspricht. Avaskuläre Tumore liegen häufig als Sphären vor und nicht als adhärenente Halbsphären (Sutherland & McCredie, 1971). Somit wird im folgenden Kapitel untersucht, ob und inwiefern sich die Sauerstoffgradienten unter Berücksichtigung der jeweiligen Geometrien unterscheiden. Zudem können die resultierenden *in silico* Ergebnisse für die Planung und Interpretation zukünftiger *in vitro* Experimente herangezogen werden.

Die *in silico* Analyse der Sauerstoffverteilung in suspendierten Sphäroiden wurde unter den gleichen Grundannahmen durchgeführt wie diejenige von adhärenenten Sphäroiden auf planaren Sauerstoff-sensitiven Sensorfolien. Infolgedessen sind, unter der Annahme einer perfekten Sphäre, der Radius r und die maximale volumenbezogene Sauerstoffverbrauchsrate R_{\max} die einzigen Variablen des betrachteten Systems. Ein analoges Vorgehen wie in **Kapitel 6.2.2** ist dabei allerdings nicht möglich, da keine empirischen Daten von MCF-7 und U373 Sphäroiden vor dem Adhäsionsprozess vorliegen. Somit wurde ausgehend von den validierten *in silico* Ergebnissen adhärenenter Sphäroide versucht, die Sauerstoffverteilung in Sphäroiden in Suspension zu modellieren und Änderungen, die auf der Morphologie basieren, zu identifizieren. Es wurde angenommen, dass die in **Kapitel 6.2.2** quantifizierten Werte für R_{\max} bei Sphäroiden des gleichen Zelltyps und gleicher Zellzahl (t_0) in beiden Fällen (Suspension und Adhäsion) identisch sind und sich lediglich die Geometrien der Sphäroide ändern. Diese Annahme basiert auf der Vermutung, dass die lateralen *in vitro* Sauerstoffgradienten im Wesentlichen das Resultat der sechstägigen Kulturzeit sind und weniger durch den Adhäsionsprozess sowie die Dauer der anschließenden Sauerstoffmessung beeinflusst werden. Für die Simulation von U373 Sphäroiden unterschiedlicher Zellzahl wurden die gemittelten Radien aus den

phasenkontrastmikroskopischen Aufnahmen (siehe **Kapitel 6.1.2**) verwendet. Dies ist dadurch gerechtfertigt, dass die Daten der mikroskopischen Studien aus dem gleichen Untersuchungszeitraum stammen und nur eine geringe Varianz in den Radien vor- und nach dem Adhäsionsprozess aufweisen. Außerdem zeigt die Übereinstimmung zwischen den *in vitro* und *in silico* Sauerstoffgradienten adhärenter U373 Sphäroide (siehe **Abbildung 61 B**), dass sich U373 Sphäroide im Allgemeinen reproduzierbar herstellen lassen. Bei MCF-7 Sphäroiden ist dies nicht möglich, da die Radien adhärenter Sphäroide gleicher Zellzahl (t_0) und folglich auch diejenigen in Suspension zum Zeitpunkt der ratiometrischen Sauerstoffmessung offensichtlich größer waren als in den mikroskopischen Studien (siehe **Abbildung 62** und **Abbildung 64**). Die volumenbezogenen Sauerstoffverbrauchsdaten wurden allerdings für adhärente Sphäroide mit den geometrischen Maßen aus **Tabelle 19** quantifiziert. Infolgedessen wurden die Radien von MCF-7 Sphäroiden in Suspension im Rahmen einer Interpolationsstudie erneut ermittelt. Dazu wurden zunächst die gemittelten Radien der adhärenen Sphäroide aus den mikroskopischen Studien als Funktion derjenigen in Suspension aufgetragen (siehe **Abbildung 66**). Damit wurde die grundlegende Beziehung zwischen den Parametern berücksichtigt. Nach Umstellen folgender linearer Fitfunktion wurden anschließend die Radien in Suspension berechnet:

$$r_{\text{adhärent}} = m r_{\text{suspendiert}} + b \quad (33)$$

mit dem Radius $r_{\text{adhärent}}$ der adhärenen Sphäroide aus **Tabelle 19**, dem gesuchten Radius $r_{\text{suspendiert}}$ der Sphäroide in Suspension, der Steigung m $[(0,99 \pm 0,02) \mu\text{m}^{-1}]$ und dem y- Ordinatenabschnitt b $[(12 \pm 6) \mu\text{m}]$.

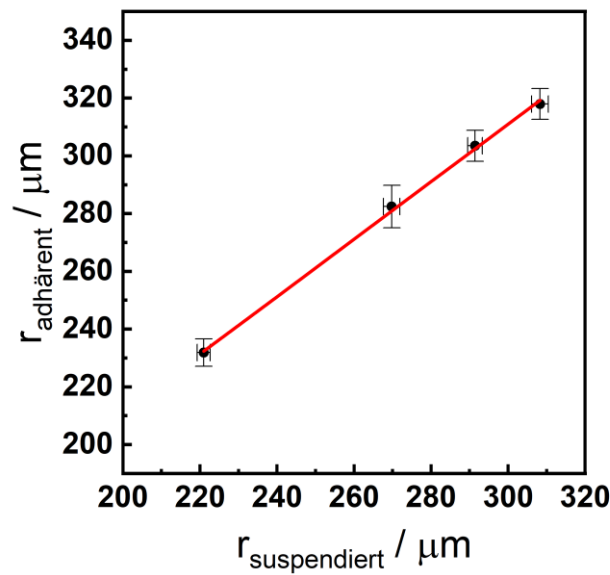


Abbildung 66: Darstellung des Radius $r_{\text{adhärenz}}$ adhärenter Sphäroide als Funktion des Radius $r_{\text{suspendiert}}$ von Sphäroiden in Suspension. Die Daten stammen aus den mikroskopischen Studien in **Kapitel 6.1.2** für MCF-7 Sphäroide unterschiedlicher Zellzahl (t_0).

Die Ergebnisse der Interpolationsstudie mittels der linearen Fitfunktion sind in **Tabelle 21** aufgeführt.

Tabelle 21: Darstellung der im Rahmen einer Interpolationsstudie ermittelten Werte für den Radius $r_{\text{suspendiert}}$ von MCF-7 Sphäroiden unterschiedlicher Zellzahl (t_0) am Tag 6 der Kulturzeit. Auf die Berechnung der Fehler wurde verzichtet, da diese irrelevant für die *in silico* Untersuchung sind.

Zellzahl (t_0) / Zellen/Well	Radius $r_{\text{suspendiert}} / \mu\text{m}$
4k	239
12k	389
16k	430
20k	470

Anhand der ermittelten Werte von R_{max} und $r_{\text{suspendiert}}$ wurde die Sauerstoffverteilung in Sphäroiden unterschiedlichen Zelltyps und unterschiedlicher Zellzahl simuliert. Die *1D Plots* der Sauerstoffprofile wurden mittels einer *2D Schnittlinie* auf Höhe des halben Durchmessers generiert (siehe **Abbildung 30 C**). Somit können die lateralen pO_2 Gradienten aus dem Querschnitt des Sphäroids in Suspension denjenigen der adhärenen Halbsphären aus **Abbildung 64** und **Abbildung 61 B** gegenübergestellt

werden. Die Profile von Sphäroiden in Suspension werden durch durchgezogene Linien symbolisiert, die adhärenen Sphäroide durch gestrichelte.

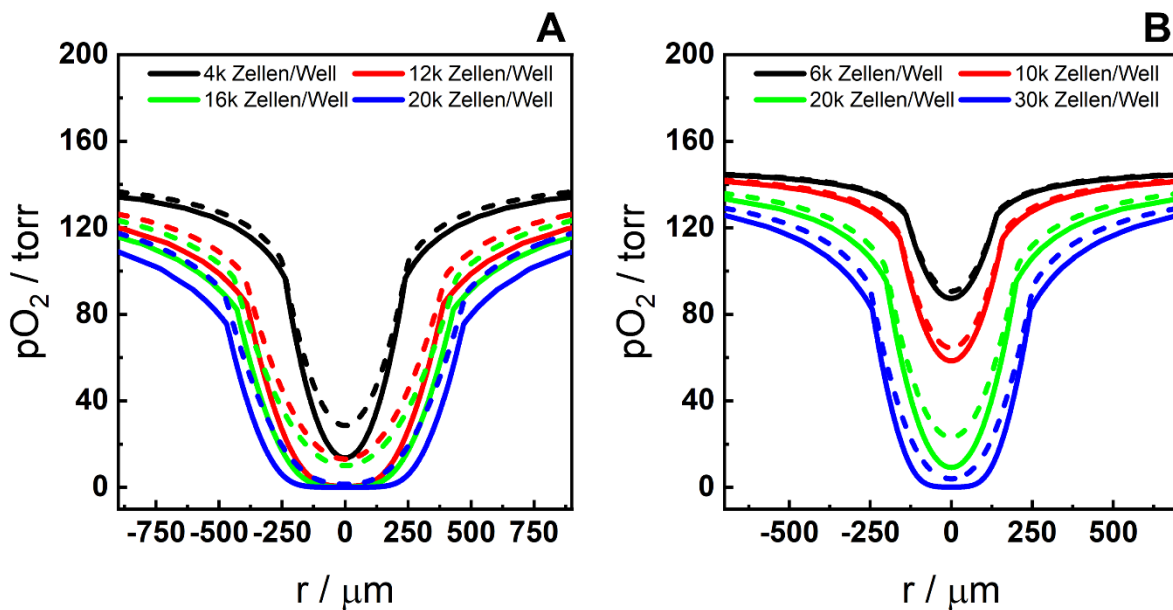


Abbildung 67: Laterale $p\text{O}_2$ Gradienten aus dem Querschnitt durch das umgebende Medium und den Sphäroid aus (A) MCF-7 Zellen und (B) U373 Zellen zum Zeitpunkt $t = 1$ h. Die gestrichelten Profile zeigen die Ergebnisse der adhärenen Sphäroide und die durchgezogenen Kurven stellen die der Sphäroide in Suspension für unterschiedliche Zellzahlen (t_0) dar. Auf der x-Achse ist die radiale Distanz vom Zentrum des Sphäroids ($r = 0 \mu\text{m}$) und auf der y-Achse der Sauerstoffpartialdruck $p\text{O}_2$ aufgetragen. $T = 37^\circ\text{C}$.

Für beide Zelllinien in **Abbildung 67** (MCF-7: A; U373: B) wird deutlich, dass die lateralen $p\text{O}_2$ Gradienten adhärenen Sphäroide von solchen in Suspension abweichen. Einerseits verlaufen diese für Zweitere im Allgemeinen bei niedrigerem $p\text{O}_2$ Level. Andererseits beginnt der steile Abfall des $p\text{O}_2$ zwar für jede Zellzahl an der Oberfläche des Sphäroids und damit bei einer radialen Distanz, welche dem zugrundeliegenden Radius entspricht, aber wegen der Varianz zwischen $r_{\text{adhären}}$ und $r_{\text{suspendiert}}$ differiert dieser Abfall oftmals. Außerdem ist zu beobachten, dass die Diskrepanzen bei Sphäroiden der Zelllinie U373 generell weniger stark ausgeprägt sind als bei MCF-7 Zellen, da diese grundsätzlich kleiner im Durchmesser sind und die Abweichung zwischen Radius r und Höhe h für die adhärenen Zellaggregate geringer ist. Bei U373 Sphäroiden der Zellzahlen 6k Zellen/Well (—) und 10k Zellen/Well (—) sind, mit Ausnahme der zentralen $p\text{O}_2$ Werte ($r = 0 \mu\text{m}$), kaum Abweichungen zwischen den Profilen erkennbar. Durch die niedrigeren Level der Oxygenierung

scheinen MCF-7 Sphäroide (**A**) mit 12k Zellen/Well (Suspension —), 16k Zellen/Well (Suspension —) und 20k Zellen/Well (Adhäsion/Suspension —) sowie U373 Sphäroide in Suspension (**B**) mit 30k Zellen/Well (—) zentrale Plateauregionen aufzuweisen. Werden die pO_2 Werte im Zentrum der genannten Sphäroide genauer betrachtet, wird deutlich, dass lediglich der MCF-7 Sphäroid in Suspension mit 20k Zellen/Well (—) Werte unterhalb von $c_{krit} = 0,07$ torr und damit eine zentrale Plateauregion mit $r = 76,51 \mu m$ besitzt. Alle anderen Profile haben zentrale pO_2 Werte, die größer als 0,07 torr sind. Der Anschein einer zentralen Plateauregion resultiert demnach aus der Skalierung der Graphen, durch die minimale Veränderungen im pO_2 innerhalb dieser Bereiche nicht ersichtlich werden. Die Sauerstoffgradienten sowie die Diskrepanzen zwischen Sphäroiden in Suspension und adhärenen Sphäroiden können zudem durch 3D Plots mit der entsprechenden Farbcodierung von 0 torr (blau) bis 150 torr (rot) sichtbar gemacht werden. Die Bereiche, in welchen der pO_2 unterhalb von c_{krit} ist, sind weiß codiert. In **Abbildung 68** ist die stationäre 3D Sauerstoffverteilung ($t = 1$ h) exemplarisch für Sphäroide in Suspension und adhärenen Sphäroide der größten Zellzahl (MCF-7: 20k Zellen/Well; U373: 30k Zellen/Well) dargestellt, wobei sich die Perspektiven unterscheiden. Bei den adhärenen Sphäroiden zeigen die 3D Plots nicht die Frontansicht (yz), sondern den Fußabdruck in der Sauerstoff-sensitiven Sensorfolie. Dies liegt zum einen darin begründet, dass die *in vitro* Sauerstoffmessung mit dem VisiSens TD System bildgestützt erfolgt. Die Profildigramme werden durch die Umwandlung von Rohdatenbilder der Sensorfolie in Falschfarbenbilder mit einer entsprechenden Zweipunkt Kalibrierung ausgewertet (Pütz, 2021; Schmittlein, 2017). Dabei sind die *in vitro* Falschfarbenbilder ähnlich zu den dargestellten Fußabdrücken adhärenen *in silico* Sphäroide. Zum anderen sind durch diese Darstellung die lateralen pO_2 Gradienten aus dem Querschnitt der betrachteten Sphäroide optisch besser vergleichbar.

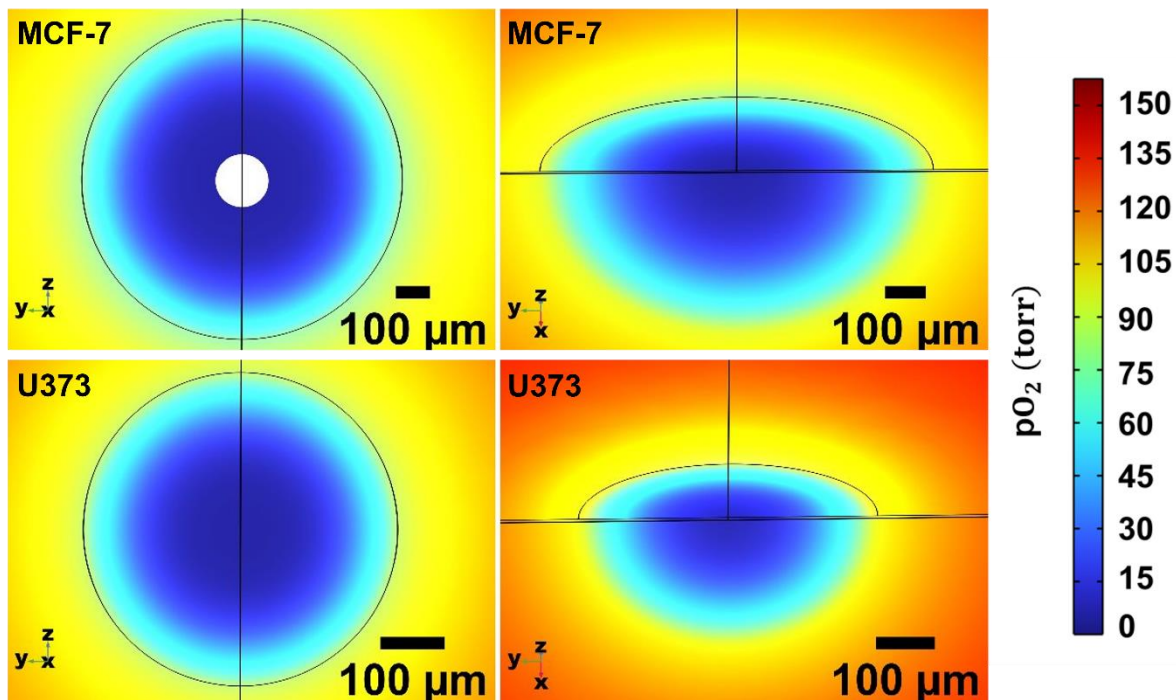


Abbildung 68: 3D Sauerstoffverteilung in suspendierten Sphäroiden (links) und in adhärenen Sphäroiden (rechts) der Zelllinie MCF-7 (20k Zellen/Well) und U373 (30k Zellen/Well) zum Zeitpunkt $t = 1$ h. Infolge der 2D-achsensymmetrischen Natur des Modells können die Ergebnisse durch einen Rotations-Datensatz in 3D dargestellt werden. In der Farbcodierung des Plots spiegeln dunkelrote Bereiche hohe pO_2 Werte wider, während niedrige blau codiert sind. Die Regionen, in welchen die Sauerstoffkonzentration unterhalb von $c_{krit} = 0,07$ torr liegt, bleiben weiß.

Die Diskrepanzen in den Sauerstoffgradienten zwischen adhärenen Sphäroiden und Sphäroiden in Suspension, welche sowohl in den Sauerstoffprofilen als auch in den 3D Plots erkennbar sind, können mit Hilfe der quantifizierten globalen Sauerstoffverbrauchsrate erklärt werden. Trotz der Annahme, dass die Werte für R_{max} , je nach Zelltyp und Zellzahl, in beiden Modellen identisch sind, unterscheiden sich die Werte für R_{global} . Dies liegt darin begründet, dass sich die Geometrie bei Sphäroiden in Suspension von einer Halbsphäre zu einer Sphäre ändert. Somit verdoppelt sich das Volumen in 3D und im Zuge der Integration über die gesamte Oberfläche des zugrundeliegenden Sphäroids müssten sich auch die Werte für R_{global} duplizieren. Bei genauerer Betrachtung von **Abbildung 69** wird allerdings deutlich, dass dies nicht der Fall ist.

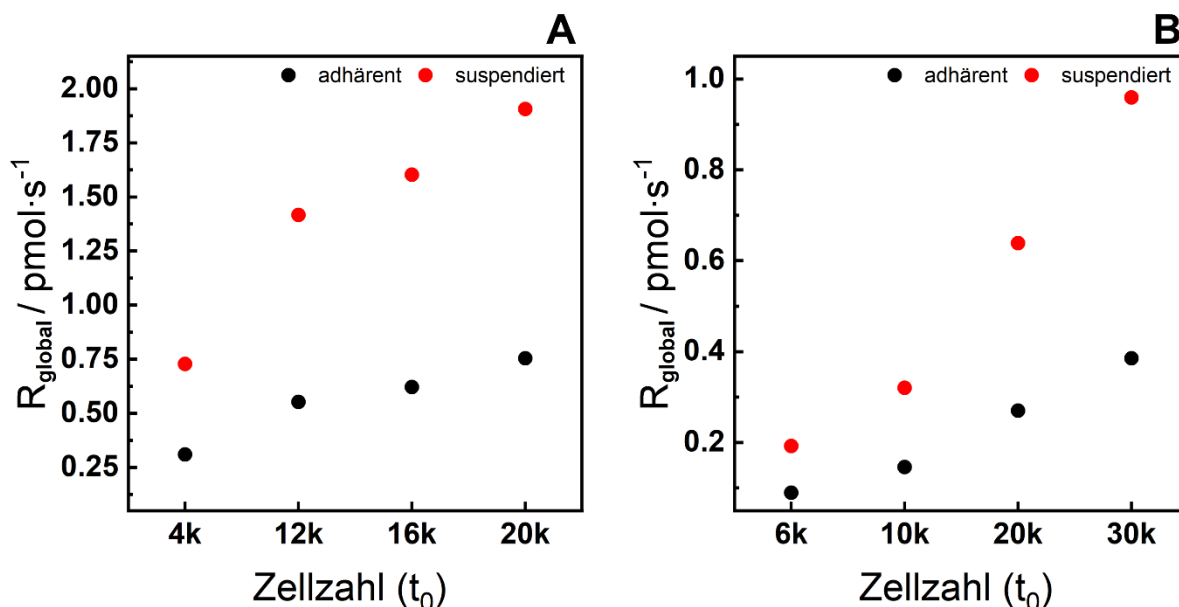


Abbildung 69: Vergleichende Darstellung der globalen Sauerstoffverbrauchsrate pro Sphäroid der Zelllinien MCF-7 (**A**) und U373 (**B**). Die schwarzen Datenpunkte zeigen dabei die Werte für R_{global} von adhärenenten Sphäroiden unterschiedlicher Zellzahl (t_0), während die roten diejenigen von Sphäroiden in Suspension darstellen. $T = 37^\circ \text{C}$.

Adhärenente MCF-7 Sphäroide (**A**) unterschiedlicher Zellzahl (t_0) besitzen globale Sauerstoffverbrauchsrate zwischen $0,31 \text{ pmol} \cdot \text{s}^{-1}$ (4k Zellen/Well) und $0,75 \text{ pmol} \cdot \text{s}^{-1}$ (20k Zellen/Well). Das prozentuale Verhältnis zwischen diesen Werten und denjenigen für R_{global} von Sphäroiden gleicher Zellzahl in Suspension liegt jedoch nicht bei den vermuteten 50 %, sondern zwischen 39,6 % (20k Zellen/Well) und 42,6 % (4k Zellen/Well). Ähnliches ist auch bei den Sphäroiden der Zelllinie U373 zu beobachten. Lediglich bei U373 Sphäroiden mit 6k Zellen/Well ist der Wert für R_{global} nach der Adhäsion mit 46,5 % nahezu die Hälfte von dem Sphäroid in Suspension. Unter Berücksichtigung der geometrischen Maße der jeweiligen Sphäroide (siehe **Tabelle 19** und **Abbildung 57 B**) wird deutlich, dass die adhärenenten Sphäroide mit zunehmender Zellzahl mehr von der perfekten Halbsphäre abweichen. Das Ausmaß der Abweichung von einer perfekten Halbsphäre könnte somit der Grund für die Unterschiede im prozentualen Verhältnis der globalen Sauerstoffverbrauchsrate pro Sphäroid (adhärenent/suspendiert) darstellen. Um diese Aussage zu verifizieren, werden in **Abbildung 70** erneut die lateralen pO_2 Gradienten im Querschnitt verglichen. Der Unterschied zu **Abbildung 67** besteht in der Variation der Grundannahme. Die Sphäroide in Suspension bilden nun keine perfekten 3D Sphären mehr ($a = b = c$),

sondern nehmen die Form eines Ellipsoids mit $a = b$ an. Der Wert für c ist dabei identisch zur Höhe h des entsprechenden adhärenen Sphäroids. Ein Ellipsoid ist im Allgemeinen durch folgende Gleichung gegeben (Grimes & Currell, 2018):

$$\frac{x^2}{a^2} + \frac{y^2}{b^2} + \frac{z^2}{c^2} = 1$$

(34)

wobei a , b und c die Längen der Halbachsen sind.

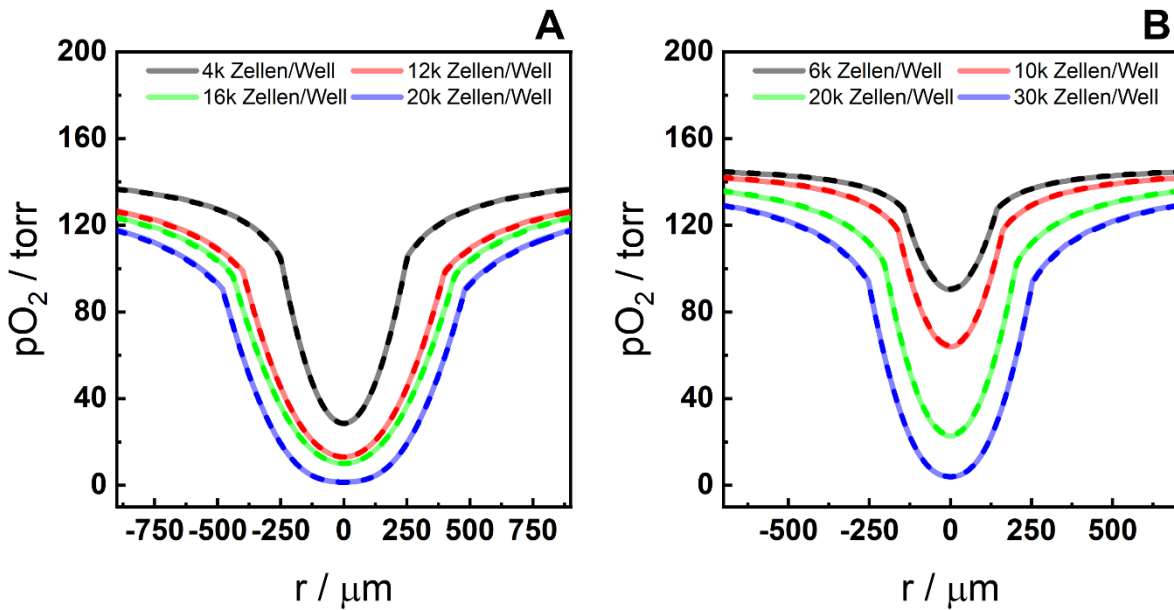


Abbildung 70: Laterale pO_2 Gradienten aus dem Querschnitt durch das umgebende Medium und den Sphäroid aus (A) MCF-7 Zellen und (B) U373 Zellen zum Zeitpunkt $t = 1$ h. Die gestrichelten Profile zeigen die Ergebnisse der adhärenen Sphäroide und die durchgezogenen Kurven stellen die der ellipsoiden Sphäroide in Suspension für unterschiedliche Zellzahlen (t_0) dar. Auf der x-Achse ist die radiale Distanz vom Zentrum des Sphäroids ($r = 0 \mu m$) und auf der y-Achse der Sauerstoffpartialdruck pO_2 aufgetragen. $T = 37^\circ C$.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Sauerstoffprofile für die Sphäroide beider Zelllinien (MCF-7: A; U373: B) für jeden der betrachteten Fälle (suspendiert/adhärenent) und jede Zellzahl (t_0) übereinstimmen. Somit wird deutlich, dass die zuvor beobachteten Diskrepanzen lediglich ein Resultat der unterschiedlichen Geometrien sind und nicht durch die Annahme identischer Werte für die volumenbezogene maximale Sauerstoffverbrauchsrate verursacht werden. Des Weiteren wird ersichtlich, dass die Varianz zwischen $r_{suspendiert}$ und $r_{adhärenent}$ vernachlässigbar ist. Diese Erkenntnisse

müssen bei der Interpretation der Ergebnisse aus *in vitro* Sauerstoffmessungen adhärenter Sphäroide berücksichtigt werden, vor allem wenn daraus gegebenenfalls Schlussfolgerungen auf die Sauerstoffverteilung in den Sphäroiden vor dem Adhäsionsprozess gezogen werden sollen. Ob *in vitro* Sphäroide tatsächlich als Kugeln oder Ellipsoide vorliegen, müsste im Rahmen einer zusätzlichen 3D Analyse am konfokalen Laser-Raster Mikroskop genauer analysiert werden. In den folgenden *in silico* Analysen wird jedoch weiterhin angenommen, dass es sich um perfekte Sphären handelt, zumal aus den gezeigten Ergebnissen ersichtlich wird, dass die Annahme bezüglich der zugrundeliegenden Atmungsaktivität pro Volumen- und Zeiteinheit davon unberührt bleibt.

6.2.4 Vorhersage mittels FEM-Simulationen

In silico Techniken können vielfältig in der Forschung eingesetzt werden. So eignen sie sich nicht nur zur Validierung experimenteller Ansätze, sondern ermöglichen es auch, Interpolationen und Extrapolationen für Probleme zu erstellen für welche unter Umständen keine empirischen Daten vorliegen (Materi & Wishart, 2007). Im folgenden Kapitel werden eben diese Aspekte der FEM-Simulationen im Hinblick auf die Sauerstoffverteilung in suspendierten Sphäroiden genutzt. Dabei wird für MCF-7 Sphäroide für deren Größe keine sensorischen Messungen existieren eine Interpolation erstellt, welche auf den validierten Ergebnissen der vorherigen Kapitel basiert, während bei U373 Sphäroiden eine Extrapolation durchgeführt wird.

MCF-7 Sphäroide in Suspension

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass sich die morphometrischen Daten zwischen den mikroskopisch untersuchten MCF-7 Sphäroiden und denjenigen, die aus der ratiometrischen Sauerstoffmessung abgeleitet wurden, unterscheiden. Diese Tatsache hat wiederum einen Einfluss auf die lateralen Sauerstoffgradienten und die Atmungsaktivität. Das Ziel ist nun, die Sauerstoffprofile für die Sphäroide mit den geometrischen Parametern aus **Kapitel 6.1.2** basierend auf den quantifizierten Verbrauchsraten aus **Abbildung 69 A** zu interpolieren. Die mikroskopisch untersuchten Sphäroide werden dabei erneut mit dem Zusatz (M) versehen. Die Daten zu den Sphäroiden, welche aus der Validierungsrechnung zu den experimentellen

Sauerstoffmessungen hervorgehen, erhalten den Vermerk (S). Dadurch, dass es sich um Sphäroide des gleichen Zelltyps und der gleichen Zellzahl handelt, wurde angenommen, dass die Beziehung zwischen dem Radius und der globalen Verbrauchsrate pro Sphäroid erhalten bleibt. Infolgedessen wurden die ermittelten Werte für R_{global} (S) als Funktion der zugehörigen Radien $r_{\text{suspendiert}}$ (S) aufgetragen (siehe **Abbildung 71**). Mithilfe einer linearen Fitfunktion wurden schließlich die wahrscheinlichen Verbrauchsrate für die Sphäroide (M) unterschiedlicher Zellzahl interpoliert. Die Ergebnisse der Interpolationsstudie sowie die Eigenschaften der Fitfunktion sind in **Tabelle 23** in **Kapitel 10.1** aufgeführt.

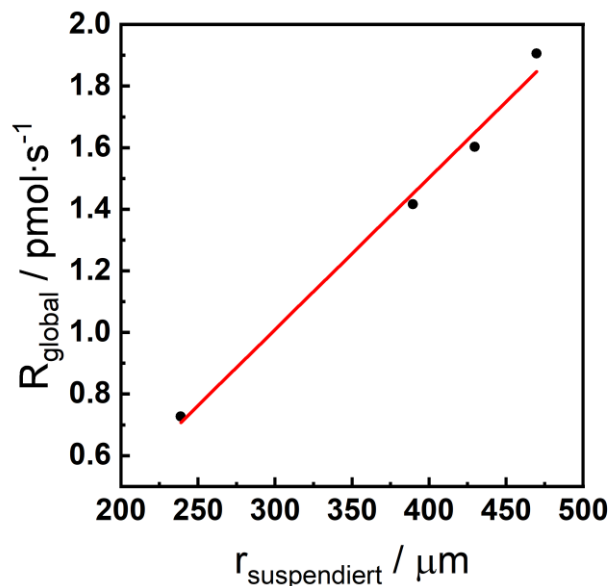


Abbildung 71: Darstellung der globalen Sauerstoffverbrauchsrate pro MCF-7 Sphäroid unterschiedlicher Zellzahl (t_0) als Funktion des Radius $r_{\text{suspendiert}}$ der zugehörigen Sphäroide in Suspension. Die Daten resultieren aus der *in silico* Analyse des vorherigen Kapitels. Mithilfe einer linearen Fitfunktion wurden die Verbrauchsrate für die Sphäroide unterschiedlicher Zellzahl mit den Radien aus **Abbildung 57 A** interpoliert.

Anschließend wurde mit dem Wissen über die Werte der globalen Sauerstoffverbrauchsrate R_{global} (M) die *in silico* Analyse der Sauerstoffverteilung durchgeführt. Die dafür nötigen *Inputvariablen* in COMSOL sind in **Tabelle 22** dargestellt. Zusätzlich sind die quantifizierten Werte für r (S) und R_{max} (S) gezeigt, um die Wertepaare direkt miteinander vergleichen zu können. Es sei anzumerken, dass die mit R_{global} (M) einhergehenden Werte für R_{max} (M) die gleichen sind wie sie

ursprünglich für die adhärenen Sphäroide mit den Radien und Höhen aus der CLSM-Studie (siehe **Tabelle 20**) ermittelt wurden. Diese Tatsache bestätigt erneut die getroffene Annahme, dass R_{\max} identisch für Sphäroide in Suspension und adhärenente Zellaggregate ist. Zusätzlich werden hiermit die verschiedenen Interpolationsstudien in den **Kapiteln 6.2.2 – 6.2.3** legitimiert. Es wird deutlich, dass die grundlegenden Beziehungen zwischen den Parametern zu jedem Zeitpunkt erhalten blieben. Dies wiederum ermöglicht die Vorhersage der Sauerstoffverteilung in Sphäroiden des gleichen Zelltyps mit beliebigen sphärischen oder ellipsoiden Geometrien, welche kein Bestandteil experimenteller Messungen sind.

Tabelle 22: Inputvariablen in COMSOL für die Vorhersage der Sauerstoffverteilung in suspendierten MCF-7 Sphäroiden. Die mikroskopisch untersuchten Sphäroide sind mit dem Zusatz (M) versehen. Die Daten zu den Sphäroiden, welche aus der Validierungsrechnung der Sauerstoffmessungen hervorgehen, erhalten den Vermerk (S). Die Werte für R_{\max} wurden nicht gerundet, da kleinste Veränderungen in den Eingabevariablen zu veränderten Ergebnissen führen würden.

Zellzahl (t_0) / Zellen/Well	r (M) / μm	r (S) / μm	R_{\max} (M) / $\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$	R_{\max} (S) / $\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$
4k	220,9	239	$1,44\cdot 10^{-2}$	$1,35\cdot 10^{-2}$
12k	269,8	389	$1,12\cdot 10^{-2}$	$0,65\cdot 10^{-2}$
16k	291,4	430	$1,01\cdot 10^{-2}$	$0,56\cdot 10^{-2}$
20k	308,3	470	$0,93\cdot 10^{-2}$	$0,55\cdot 10^{-2}$

Die Ergebnisse in **Abbildung 72** zeigen die Gegenüberstellung der lateralen Sauerstoffgradienten aller untersuchten MCF-7 Sphäroide in Suspension (**A**) sowie deren globale Sauerstoffverbrauchsrate (**B**). Die durchgezogenen Kurven und die schwarzen Datenpunkte stellen die Ergebnisse für die Sphäroide der mikroskopischen Studien dar (M). Die gestrichelten Profile sowie die roten Datenpunkte symbolisieren diejenigen für die Sphäroide aus der experimentellen Sauerstoffmessung (S). Die Sauerstoffprofile in **Abbildung 72 A** besitzen einen ähnlichen Verlauf. Sie unterscheiden sich lediglich in deren Breite und der Tatsache, dass die lateralen Gradienten aus dem Querschnitt durch das umgebende Medium und den MCF-7 Sphäroid abweichende pO_2 Level besitzen. Ersteres liegt in den variierenden Radien der Sphäroide begründet. Ähnliches konnte auch in den Parametervariationen zu

Abbildung 59 A beobachtet werden. Die unterschiedlichen pO_2 Level können unter anderem mit den Ergebnissen in **(B)** erläutert werden. Je größer die Radien der betrachteten Sphäroide gleicher Zellzahl sind, desto größer sind die globalen Sauerstoffverbrauchsrate pro Sphäroid. Ein ähnlicher Trend ist in der Zunahme von R_{global} innerhalb einer Gruppe von Sphäroiden (M oder S) zu erkennen. Hier nehmen die Werte mit steigender Zellzahl (t_0) zu, wobei steigende Zellzahlen wiederum zunehmende Radien implizieren. Je größer die zugrundeliegende Verbrauchsrate pro Sphäroid ist, umso niedriger ist das pO_2 Level des dazugehörigen lateralen Sauerstoffgradienten.

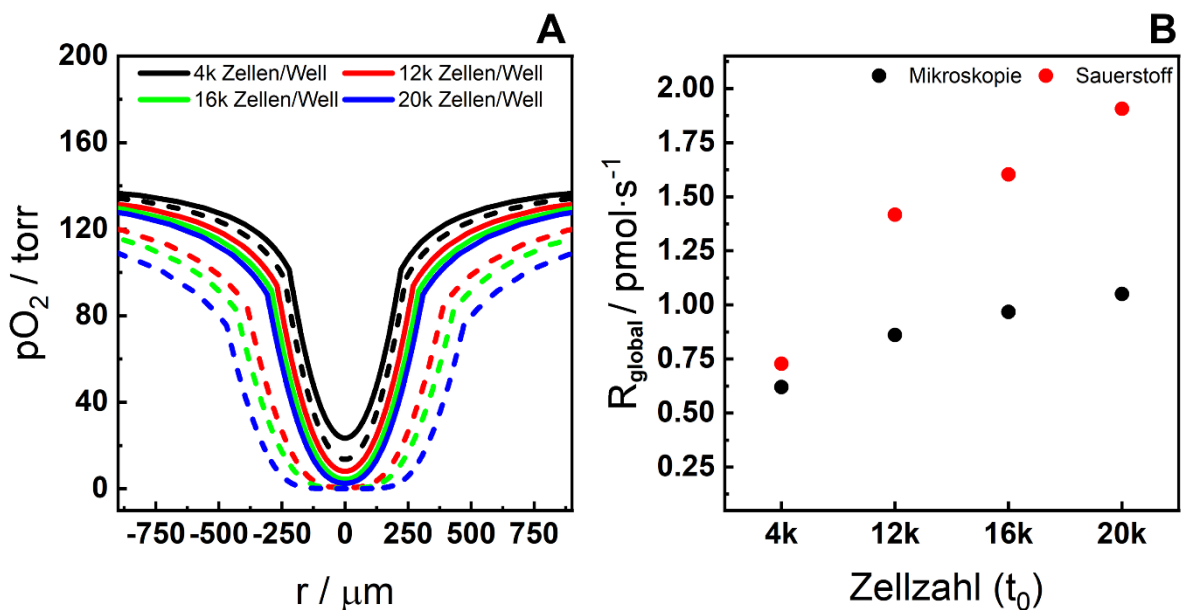


Abbildung 72: Laterale pO_2 Gradienten aus dem Querschnitt durch das umgebende Medium und den MCF-7 Sphäroid unterschiedlicher Zellzahl (t_0) **(A)** sowie die quantifizierten globalen Sauerstoffverbrauchsrate **(B)** zum Zeitpunkt $t = 1$ h. Die durchgezogenen Kurven **(A)** und die schwarzen Datenpunkte **(B)** zeigen die Ergebnisse für die Sphäroide der mikroskopischen Studien. Die gestrichelten Profile **(A)** sowie die roten Datenpunkte **(B)** symbolisieren diejenigen aus den experimentellen Sauerstoffmessungen. $T = 37^\circ C$.

U373 Sphäroide in Suspension

Bei U373 Sphäroiden in Suspension wurde eine Extrapolation erstellt, um die Sauerstoffverteilung in Sphäroiden der Zellzahl 45k Zellen/Well (t_0) zu modellieren. Der für die Modellierung nötige Radius von $296,5 \mu m$ wurde im Rahmen einer weiteren Wachstumsstudie ermittelt, welche von Simone Bäumler (Universität Regensburg) durchgeführt wurde. Diese Studie hat gezeigt, dass U373 Sphäroide mit einer

Aussaatdichte von 45k Zellen/Well kein Wachstum über eine Kulturzeit von sechs Tagen zeigen. Somit wurde für die Extrapolation angenommen, dass keine Proliferation stattfindet. Werden die Werte der globalen Verbrauchsrate aus **Abbildung 69 B** ebenfalls unter diesem Aspekt betrachtet, resultiert im Zuge einer Division von R_{global} durch die betrachtete Zellzahl in allen Fällen eine zelluläre Verbrauchsrate von $32 \text{ amol} \cdot \text{s}^{-1}$. Dieser Wert ist analog zu demjenigen, welcher im Rahmen der Studie adhärenter U373 Zellen im *Monolayer* in **Kapitel 5.1.1** quantifiziert wurde. Infolgedessen wurde die globale Sauerstoffverbrauchsrate von Sphäroiden mit 45k Zellen/Well aus diesen Angaben ermittelt, woraus sich ein Wert von $1,44 \text{ pmol} \cdot \text{s}^{-1}$ ergibt. Die resultierende Sauerstoffverteilung in **Abbildung 73** zeigt das Ergebnis dieser theoretischen Überlegungen. Das extrapolierte Sauerstoffprofil für Sphäroide der Zellzahl 45k Zellen/Well folgt einem ähnlichen Trend, welcher für Sphäroide der Zellzahlen 6k Zellen/Well (—) bis 30k Zellen/Well (—) beobachtet wurde. Der Unterschied besteht darin, dass nun eine kritische Größe erreicht ist, bei welcher eine zentrale Plateauregion ausgebildet wird. Diese erstreckt sich um eine radiale Distanz bis zu $112,6 \mu\text{m}$ vom Zentrum entfernt.

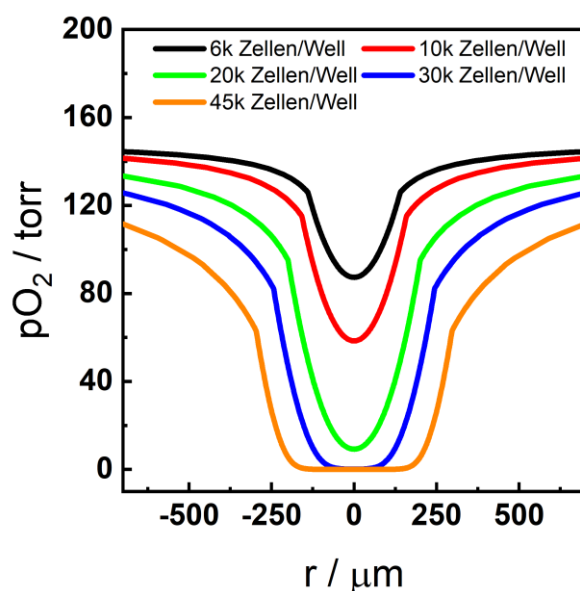


Abbildung 73: Laterale $p\text{O}_2$ Gradienten aus dem Querschnitt durch das umgebende Medium und den suspendierten U373 Sphäroid unterschiedlicher Zellzahl (t_0). Auf der x-Achse ist die radiale Distanz vom Zentrum des Sphäroids ($r = 0 \mu\text{m}$) und auf der y-Achse der Sauerstoffpartialdruck $p\text{O}_2$ aufgetragen. $T = 37^\circ\text{C}$.

6.2.5 Einfluss der Kulturzeit auf die Sauerstoffverteilung in Sphäroiden

In den bisherigen Kapiteln wurde die Sauerstoffverteilung in Sphäroiden der Zelllinien MCF-7 und U373 zu definierten Zeitpunkten untersucht. Dazu wurde das grundlegende *in silico* Modell für den Fall adhärenter Sphäroide auf Sauerstoffsensitiven Sensorfolien mit empirischen Daten validiert. Davon ausgehend wurden die lateralen pO_2 Gradienten aus dem Querschnitt der suspendierten Sphäroide vor dem Adhäsionsprozess an Tag 6 nach Zellaussaat vorausgesagt und die Sauerstoffverbrauchsrate (R_{max} und R_{global}) quantifiziert. Auf Basis dieser Werte wird im Folgenden der Einfluss der gesamten Kulturzeit auf die Oxygenierung innerhalb der Zellaggregate modelliert. Das Ziel dieser Untersuchung ist es, vertiefte Einblicke in die dynamischen Prozesse zu gewinnen, welche experimentell nur schwer zugänglich sind. Zudem soll die Annahme bewiesen werden, dass die gebildeten Gradienten zum Zeitpunkt der ratiometrischen Sauerstoffmessung im Wesentlichen auf die Kulturzeit zurückzuführen sind.

Der Einfluss der Kulturzeit und die damit einhergehenden radialen Veränderungen auf die Atmungsaktivität der betrachteten Sphäroide wurden *in silico* mittels einer *deformierten Geometrie* modelliert (siehe **Kapitel 4.3.3**). Die dafür nötigen geometrischen Daten liefern die experimentell ermittelten Fitfunktionen in **Abbildung 53**, welche als analytische Funktionen in das Modell implementiert wurden. MCF-7 Sphäroide zeigen ein lineares Wachstumsverhalten, wobei die Wachstumsraten für die unterschiedlichen Aussaatdichten der Steigung der jeweiligen linearen Fitfunktion ($y = mx + b$) entsprechen. Dadurch, dass MCF-7 Sphäroide erst ab dem zweiten Tag nach Zellaussaat im Durchmesser wachsen, umfasst der Untersuchungszeitraum *in silico* lediglich fünf Tage und die Zeitskala ändert sich auf $t_{Simulation} = t_{Experiment} - 1$. Dies liegt darin begründet, dass der gesamte Zeitraum nicht durch eine Funktion beschrieben werden kann und der erste Ausgabezeitpunkt stets 0 sein sollte. Bei U373 Sphäroiden wurde die FEM-Analyse über den gesamten Zeitraum von sechs Tagen durchgeführt und die Zeitskala bleibt identisch zur experimentellen Studie, sodass $t_{Simulation} = t_{Experiment}$. Die negativen Wachstumsraten der kompaktierenden Zellaggregate ergeben sich aus der Ableitung der exponentiellen Fitfunktion ($y = y_0 + A[\exp(R_{ox})]$). Für die mathematische Modellierung der

Atmungsaktivität während der Wachstumsstudie wurden zusätzlich zu den bisherigen folgende Annahmen getroffen. Als maximale volumenbezogene Sauerstoffverbrauchsrate wurden für MCF-7 Sphäroide unterschiedlicher Aussaatdichte die Werte R_{\max} (M) aus **Tabelle 22** als konstant angenommen, wodurch Proliferationsprozesse berücksichtigt wurden. Aufgrund der Tatsache, dass U373 Zellaggregate während der Kulturzeit kompaktieren, wird für die Modellierung der Sauerstoffverteilung angenommen, dass keine Proliferation stattfindet und die Werte der globalen Sauerstoffverbrauchsrate aus **Abbildung 69 B** konstant bleiben. Somit ist die Atmungsaktivität der einzelnen Sphäroide zu jedem Zeitpunkt gleich. Das negative Wachstum wurde insofern berücksichtigt, dass die maximale Sauerstoffverbrauchsrate R_{\max} zum Zeitpunkt t in dem Ausdruck der Reaktionskinetik nach Michaelis-Menten als Funktion des entsprechenden Sphäroidvolumens definiert wurde:

$$R_{\max}(t) = \frac{R_{\text{global}}}{V(t)} \quad (35)$$

Die Volumina $V(t)$ wurden automatisch durch die Volumenformel einer perfekten Kugel berechnet mit Radien gemäß der implementierten experimentellen Fitfunktion. Die Parameter der zugrundeliegenden Fitfunktionen sowie die für die Modellierung nötigen Sauerstoffverbrauchsrate sind in **Tabelle 24** (MCF-7) sowie in **Tabelle 25** (U373) in **Kapitel 10.1** zusammengefasst. Die Veränderungen in den Volumina über den Zeitraum der *in silico* Modellierung, welche die Grundlage für das Verständnis der Atmungsaktivität bilden, sind in **Abbildung 74** gezeigt. Hier wurden alle Werte auf das Volumen am ersten Tag der Analyse normiert. Die zeitabhängigen Verläufe sind ähnlich zu den experimentellen in **Abbildung 54**. MCF-7 Sphäroide (**A**) mit einer Aussaatdichte von 4k Zellen/Well (—) zeigen den größten und schnellsten Volumenzuwachs. Bei größeren Aussaatdichten (— und —) ist hingegen kaum eine Veränderung in den betrachteten Volumina zu erkennen. Dies unterscheidet sich zu den experimentellen Ergebnissen und kann dadurch erklärt werden, dass die Fitfunktionen der zeitabhängigen Veränderungen im Durchmesser die Grundlage der Modellierung bilden und nicht diejenigen im Volumen. Bei U373 Zellaggregaten (**B**)

wird die Kompaktierung über die Zeit von sechs Tagen deutlich, wobei diese mit zunehmender Aussaatdichte stärker ausgeprägt ist.

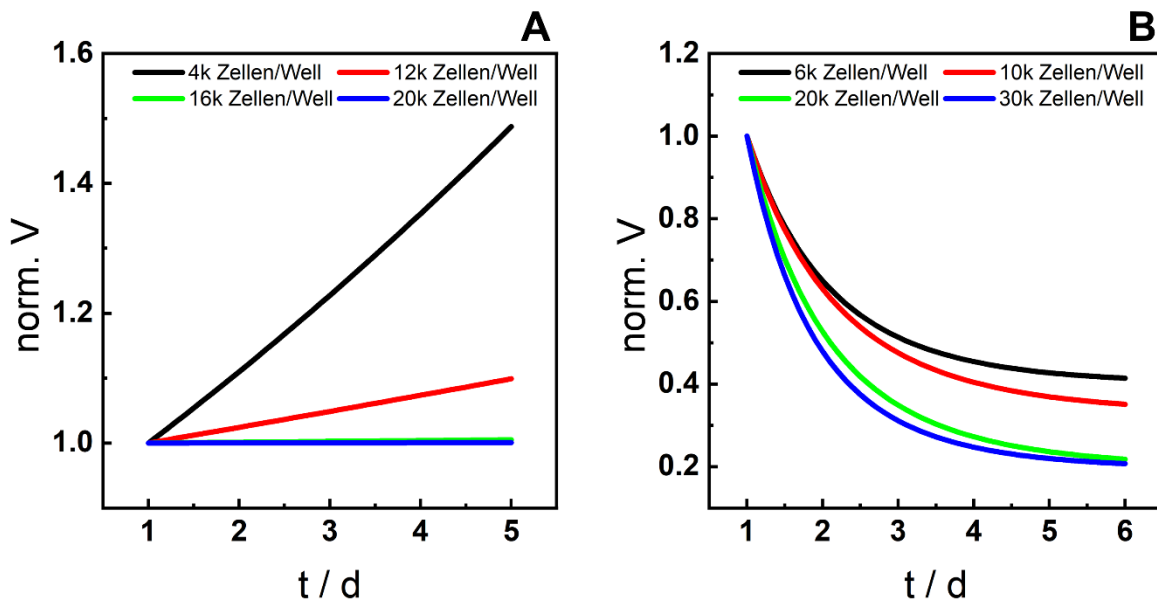


Abbildung 74: Zeitabhängige Veränderung der normierten Volumina von Sphäroiden der Zelllinien MCF-7 (A) und U373 (B) während der Dauer der FEM-Analyse. $T = 37^\circ\text{C}$.

Dadurch, dass das Wachstumsverhalten der Sphäroide beider Zelllinien sehr unterschiedlich ist und infolgedessen auch die Annahmen in der mathematischen Modellierung differieren, werden die Ergebnisse im Folgenden getrennt voneinander dargestellt.

MCF-7 Sphäroide

Der Einfluss der Kulturzeit auf die $p\text{O}_2$ Gradienten von MCF-7 Sphäroiden unterschiedlicher Aussaatdichte sind durch 3D Plots mit einer entsprechenden Farbcodierung von 0 torr (blau) bis 150 torr (rot) in **Abbildung 75** visualisiert. Hierbei sei nochmals auf die Unterschiede in der Zeitskalierung zwischen Experiment und Simulation hingewiesen. Die Sauerstoffverteilung an Tag 1 beispielsweise entspricht den Sphäroiden mit den geometrischen Maßen der experimentellen Studie an Tag 2. Das Wachstum der Zellaggregate über den betrachteten Zeitraum und die damit einhergehenden Unterschiede in den $p\text{O}_2$ Gradienten sind bei MCF-7 Sphäroiden mit einer Aussaatdichte von 4k Zellen/Well (A) am deutlichsten erkennbar. Mit zunehmender Aussaatdichte scheint der Einfluss der Kulturzeit auf die

Sauerstoffverteilung geringer zu werden. Nichtsdestotrotz sind die infolge der Atmungsaktivität resultierenden Sauerstoffgradienten sichtbar. Weiterhin zeigt sich, dass keiner der untersuchten Sphäroide Regionen besitzt mit pO_2 Werten unterhalb der definierten kritischen Sauerstoffkonzentration von 0,07 torr, welche mittels einer weißen Farbcodierung sichtbar gemacht werden würden.

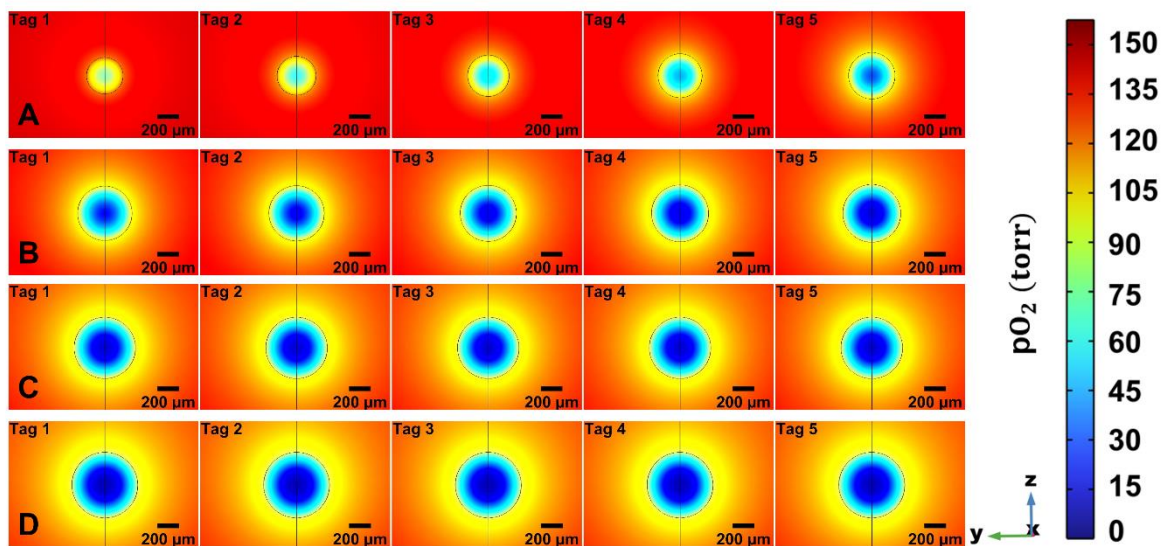


Abbildung 75: 3D Plots zur Visualisierung des Einflusses der Kulturzeit auf die Sauerstoffverteilung in suspendierten MCF-7 Sphäroiden unterschiedlicher Aussaatdichte (**A:** 4k Zellen/Well, **B:** 12k Zellen/Well, **C:** 16k Zellen/Well und **D:** 20k Zellen/Well). Infolge der 2D-achsensymmetrischen Natur des Modells können die Ergebnisse durch einen *Rotations-Datensatz* in 3D in der (yz)-Perspektive dargestellt werden. In der Farbcodierung des Plots spiegeln dunkelrote Bereiche hohe pO_2 Werte wider, während niedrige blau codiert sind.

In den Profillinien in **Abbildung 76**, welche die Querschnitte durch die 3D Plots darstellen, sind die verschiedenen Level der Oxygenierung noch besser erkennbar. Durch die Annahme einer konstanten maximalen Sauerstoffverbrauchsrate R_{max} ist die FEM-Analyse für jede Aussaatdichte ähnlich zu derjenigen mit einem allgemeinen Sweep über den Radius r bei konstantem R_{max} (siehe **Kapitel 6.2.1**). Analog zu den Sauerstoffprofilen in **Abbildung 59 A** nimmt der Sauerstoffpartialdruck pO_2 von der Oberfläche der Sphäroide zu jedem Kulturzeitpunkt steil ab und erreicht stabile Werte im Zentrum ($r = 0 \mu m$). Für Sphäroide mit den Aussaatdichten 16k Zellen/Well (**C**) und 20k Zellen/Well (**D**) stimmen die lateralen pO_2 Gradienten während der gesamten Kulturzeit überein. Bei Zellaggregaten mit kleineren Aussaatdichten unterscheiden sich diese hingegen. Infolge des Wachstums nehmen auch die globalen

Sauerstoffverbrauchsrate R_{global} pro Sphäroid zu. Je größer die Wachstumsrate, desto stärker ist die Zunahme von R_{global} und umso gravierender ist der Einfluss der Kulturzeit auf die Sauerstoffverteilung. Dies wiederum führt dazu, dass größere Diskrepanzen im Level der Oxygenierung sichtbar sind.

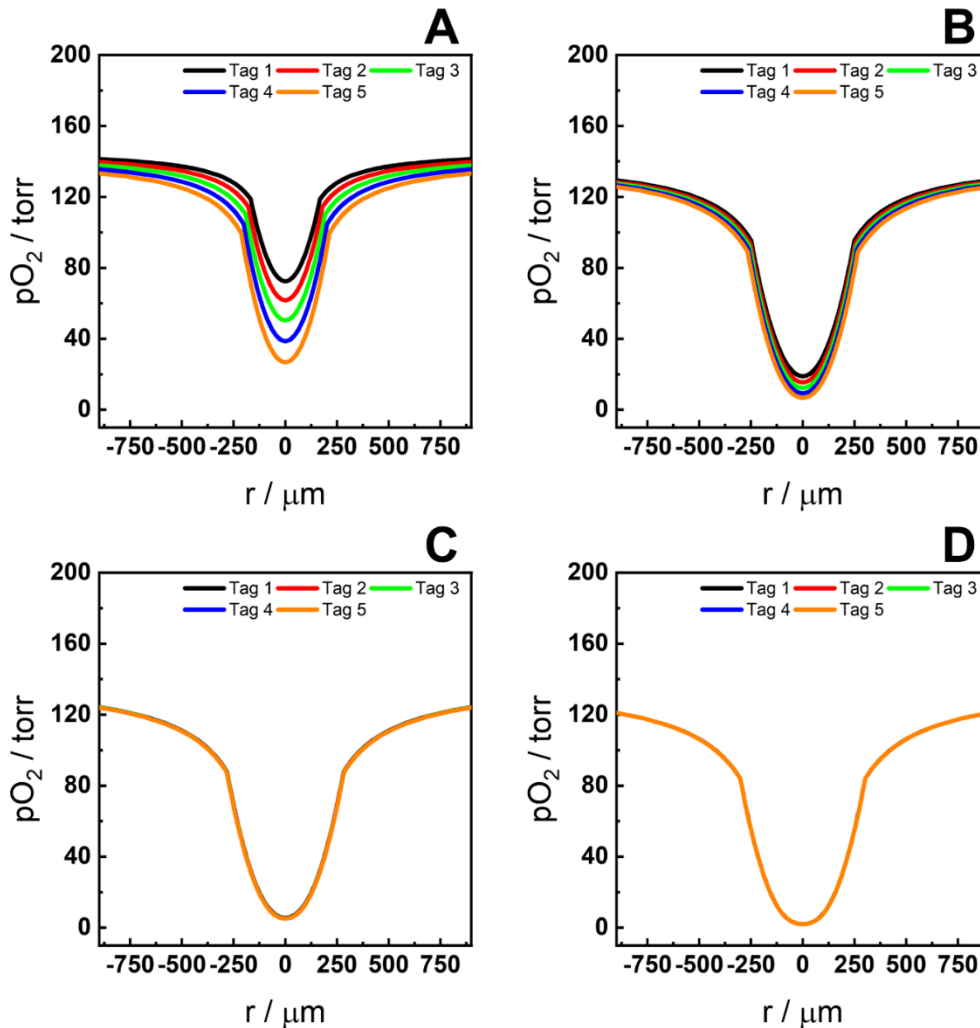


Abbildung 76: Laterale pO_2 Gradienten aus dem Querschnitt durch das umgebende Medium und den suspendierten MCF-7 Sphäroid unterschiedlicher Aussaatdichte (**A**: 4k Zellen/Well, **B**: 12k Zellen/Well, **C**: 16k Zellen/Well und **D**: 20k Zellen/Well) im Verlauf von fünf Tagen Kulturzeit. Auf der x-Achse ist die radiale Distanz vom Zentrum des Sphäroids ($r = 0 \mu m$) und auf der y-Achse der Sauerstoffpartialdruck pO_2 aufgetragen. $T = 37^\circ C$.

Der allgemeine Zusammenhang zwischen der Größe der Sphäroide und deren Atmungsaktivität wird nochmals in **Abbildung 77** hervorgehoben, wobei in (**A**) die lateralen Gradienten der lokalen Sauerstoffverbrauchsrate R_{O_2} am ersten Tag der Wachstumsstudie und in (**B**) am letzten Tag dargestellt sind. Zu beiden Zeitpunkten

nimmt R_{O_2} von der Oberfläche der Sphäroide unterschiedlicher Aussaatdichte zum Zentrum hin ab. Dadurch, dass die Radien durch die Aussaatdichte und die Proliferationsrate bestimmt werden, variieren die Profile für die lokale Reaktionsrate. So sind die Profile von Sphäroiden mit großen Radien zum einen breiter als für kleinere Zellaggregate. Zum anderen sind die Sauerstoffverbrauchsrate in den äußeren Regionen stets kleiner und die Gradienten stärker. Dies lässt darauf schließen, dass das Gleichgewicht zwischen der Diffusion und dem Verbrauch von Sauerstoff mit zunehmender Größe gestört ist. Bei einem direkten zeitabhängigen Vergleich der Profile von Sphäroiden mit gleicher Aussaatdichte wird deutlich, dass sich diese nur für 4k Zellen/Well (—) und 12k Zellen/Well (—) ändern, während diejenigen von 16k Zellen/Well (—) und 20k Zellen/Well (—) zu beiden Zeitpunkten nahezu identisch sind. Dies deckt sich mit den Beobachtungen der lateralen pO_2 Gradienten.

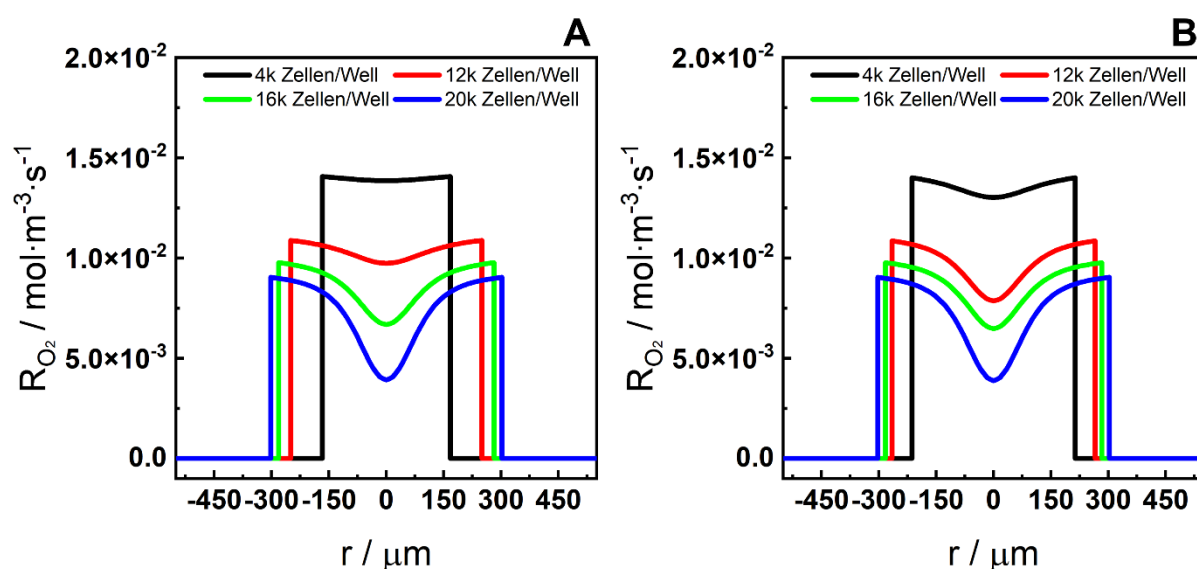


Abbildung 77: Darstellung der lokalen Sauerstoffverbrauchsrate R_{O_2} in Abhängigkeit von der radialen Distanz vom Zentrum der MCF-7 Sphäroide unterschiedlicher Aussaatdichte. In (A) sind die lateralen Gradienten am ersten Tag und in (B) am fünften Tag der Wachstumsstudie gezeigt. $T = 37^\circ\text{C}$.

U373 Sphäroide

Die Sauerstoffverteilung in U373 Sphäroiden unterschiedlicher Aussaatdichte während einer Kulturzeit von sechs Tagen wurde ebenfalls mittels 3D Plots (siehe **Abbildung 78**) und Profillinien (siehe **Abbildung 79**) analysiert. Infolge der Annahme einer konstanten globalen Sauerstoffverbrauchsrate R_{global} je Aussaatdichte bei variierendem Radius r ähneln die Sauerstoffprofile denjenigen der Parametervariationen in **Abbildung 59 B** und können entsprechend analysiert werden. Durch die Kombination beider Darstellungsmethoden wird deutlich, dass der Einfluss der Kulturzeit auf die Sauerstoffgradienten ausgeprägter ist, je stärker die zugrundeliegende Kompaktierung der Zellaggregate ist. So liegt die Abnahme im Durchmesser zwischen dem ersten und dem sechsten Tag in Kultur zwischen 25,6 % bei 6k Zellen/Well (**A**) und 41 % bei 30k Zellen/Well (**D**). Der Sauerstoffpartialdruck im Zentrum hingegen nimmt mit fortschreitender Kulturzeit zwischen 15 % (**A**) und 95,5 % (**D**) ab.

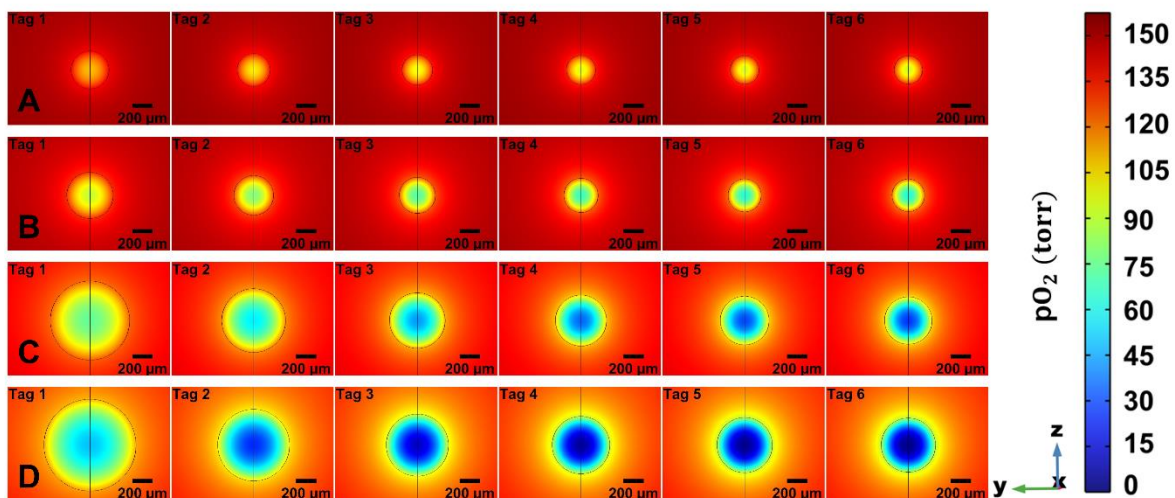


Abbildung 78: 3D Plots zur Visualisierung des Einflusses der Kulturzeit auf die Sauerstoffverteilung in U373 Sphäroiden unterschiedlicher Aussaatdichte (**A**: 6k Zellen/Well, **B**: 10k Zellen/Well, **C**: 20k Zellen/Well und **D**: 30k Zellen/Well). Infolge der *2D-achsensymmetrischen* Natur des Modells können die Ergebnisse durch einen *Rotations-Datensatz* in 3D in der (yz)-Perspektive dargestellt werden. In der Farbcodierung des Plots spiegeln dunkelrote Bereiche hohe pO_2 Werte wider, während niedrige blau codiert sind.

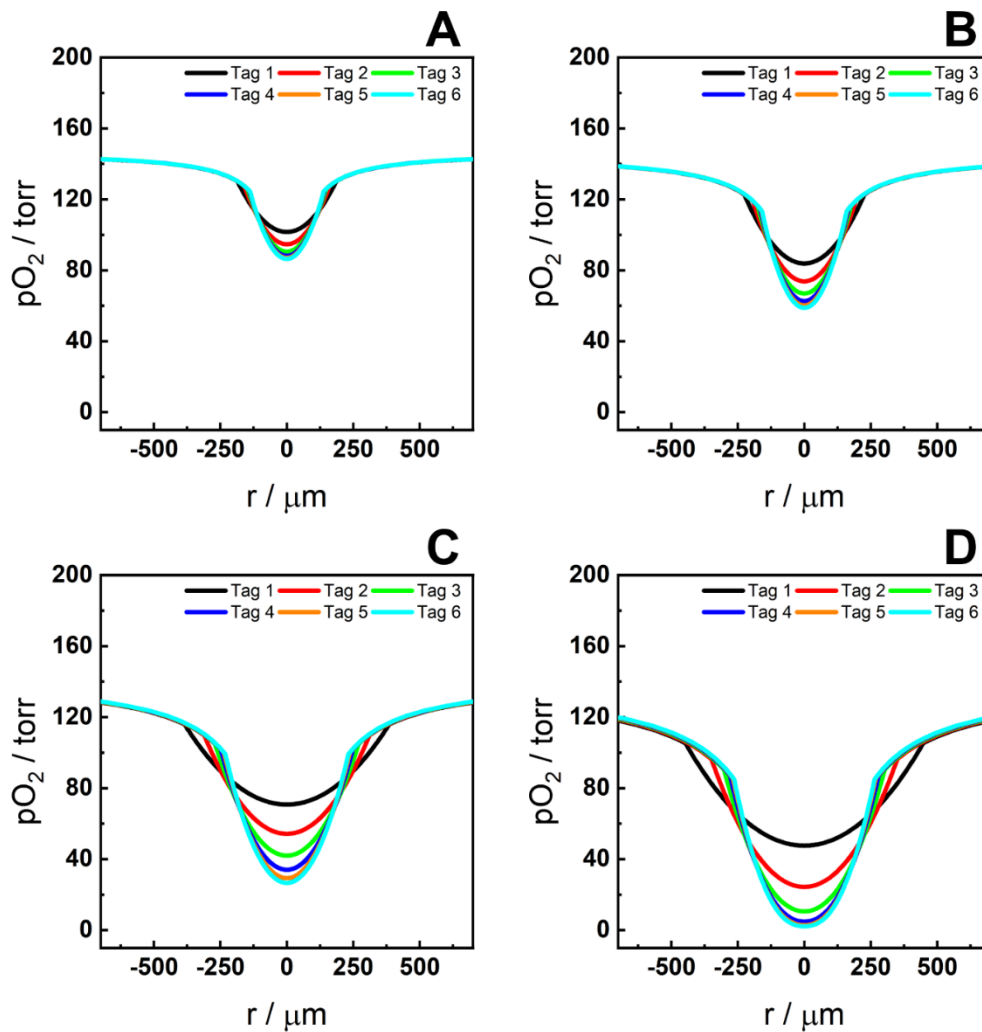


Abbildung 79: Laterale pO_2 Gradienten aus dem Querschnitt durch das umgebende Medium und den suspendierten U373 Sphäroid unterschiedlicher Aussaatdichte (**A**: 6k Zellen/Well, **B**: 10k Zellen/Well, **C**: 20k Zellen/Well und **D**: 30k Zellen/Well) während einer Kulturzeit von sechs Tagen. Auf der x-Achse ist die radiale Distanz vom Zentrum des Sphäroids ($r = 0 \mu m$) und auf der y-Achse der Sauerstoffpartialdruck pO_2 aufgetragen. $T = 37^\circ C$.

Als Besonderheit der FEM-Analyse können zusätzlich zu den lateralen pO_2 Gradienten die lokalen Sauerstoffverbrauchsrate in Abhängigkeit von der radialen Distanz visualisiert werden (siehe **Abbildung 80**). Am ersten Tag (**A**) sind nahezu uniforme Sauerstoffverbrauchsrate innerhalb der Zellaggregate mit Werten zwischen $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$ (—) und $7 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$ (—) zu beobachten. Nach einer Kulturzeit von sechs Tagen (**B**) erhöhen sich diese auf $1,2 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$ (—) bis maximal $1,8 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$ (—) an der Oberfläche der Sphäroide. Dies liegt in der Relation der Parameter R_{\max} , R_{global} und V aus **Gleichung (35)** begründet. Demzufolge

steigen die Werte für R_{\max} mit abnehmendem Radius. Nach sechs Tagen haben sich laterale R_{O_2} Gradienten ausgebildet, welche bei hohen Aussaatdichten stärker sind.

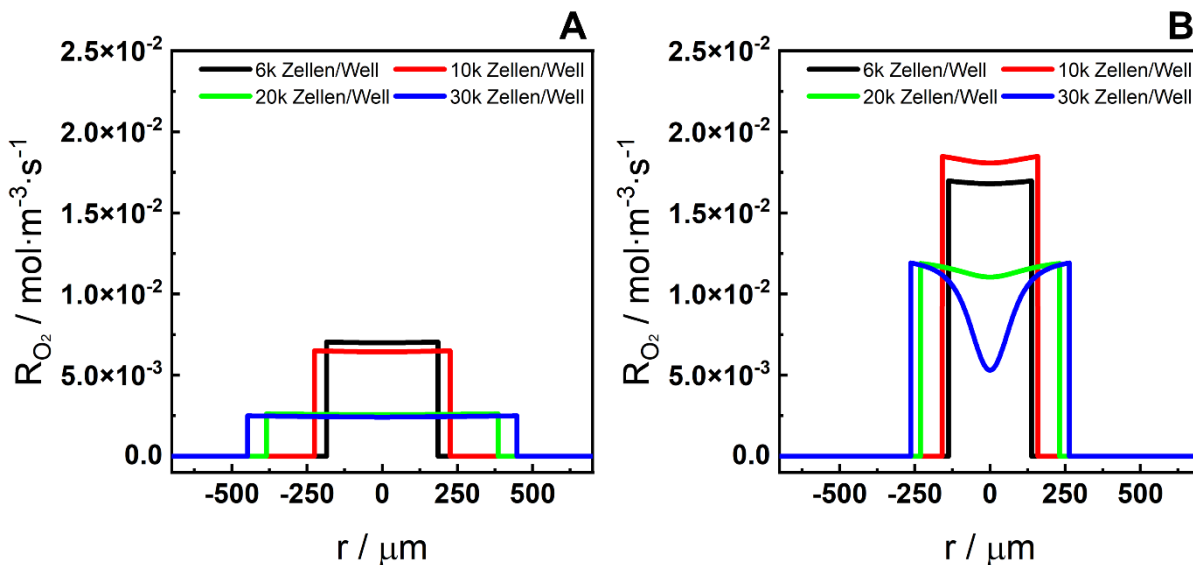


Abbildung 80: Darstellung der lokalen Sauerstoffverbrauchsrate R_{O_2} in Abhängigkeit von der radialen Distanz vom Zentrum der suspendierten U373 Sphäroide unterschiedlicher Aussaatdichte. In (A) sind die lateralen Gradienten am ersten Tag und in (B) am sechsten Tag der untersuchten Wachstumsstudie gezeigt. $T = 37^\circ\text{C}$.

Zusammenfassung

Anhand der durchgeführten FEM-Analysen konnte der Einfluss der fortwährenden Respiration während der Kulturzeit auf die Sauerstoffverteilung in Sphäroiden der Zelllinien MCF-7 und U373 aufgezeigt werden. Die dafür nötigen Daten stammen aus den *in silico* Modellen der **Kapitel 6.2.1 – 6.2.4** sowie den zugrundeliegenden mikroskopischen Studien. Um den anfänglich formulierten Modellierungsprozess (siehe **Abbildung 52**) sowie dessen sukzessiven Aufbau abschließend validieren zu können, wurden die Sauerstoffprofile vom letzten Tag der Wachstumsstudie denjenigen von Sphäroiden in Suspension vor dem Adhäsionsprozess aus **Kapitel 6.2.3** gegenübergestellt. **Abbildung 81** zeigt das Ergebnis für MCF-7 Sphäroide (A) und U373 Sphäroide (B) unterschiedlicher Aussaatdichte. Für jede untersuchte Zelllinie und Aussaatdichte stimmen die lateralen pO_2 Gradienten nahezu perfekt überein. Lediglich bei U373 Zellaggregaten mit 20k Zellen/Well (—) sind größere Diskrepanzen im zentralen pO_2 erkennbar. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass für diese Aussaatdichte die Fehlerbehaftung der Parameter

in der exponentiellen Fitfunktion zur Beschreibung des Wachstumsverhaltens am größten war. Nichtsdestotrotz legitimieren die dargestellten Graphen alle getroffenen Annahmen und beweisen zuletzt, dass die gebildeten Gradienten zum Zeitpunkt der ratiometrischen Sauerstoffmessung im Wesentlichen auf die Respiration während der Kulturzeit zurückzuführen sind.

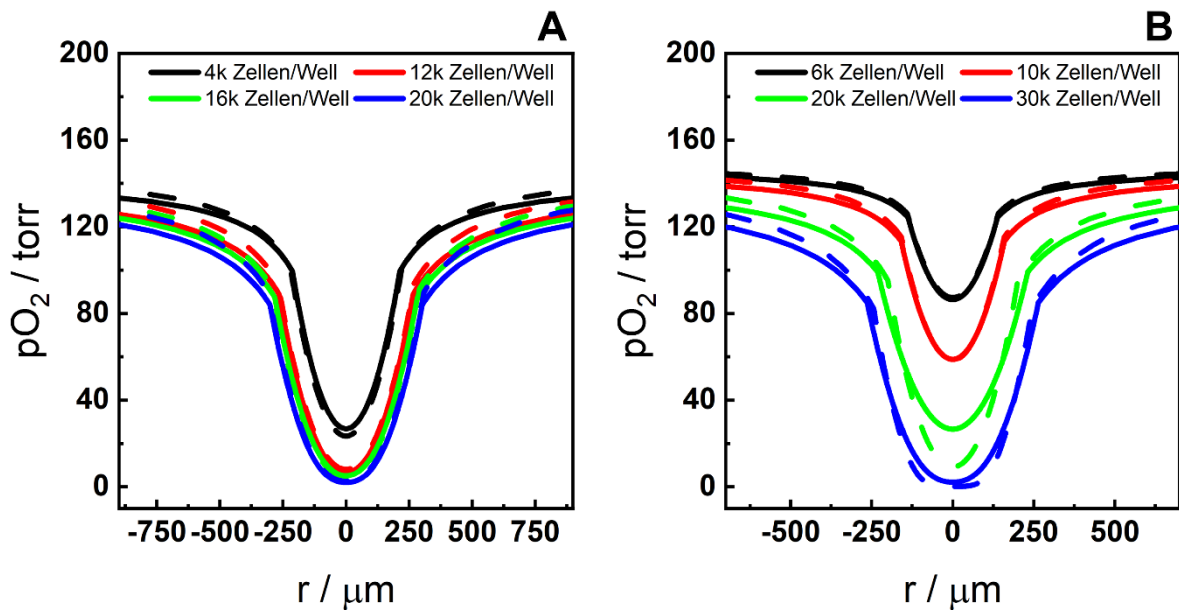


Abbildung 81: Laterale pO_2 Gradienten aus dem Querschnitt durch das umgebende Medium und den Sphäroid aus (A) MCF-7 Zellen und (B) U373 Zellen mit unterschiedlichen Aussaatdichten. Die gestrichelten Profile zeigen die Ergebnisse der Sphäroide in Suspension aus Kapitel 6.2.3 und die durchgezogenen Kurven stellen die der Sphäroide am letzten Tag der Wachstumsstudie dar. Auf der x-Achse ist die radiale Distanz vom Zentrum des Sphäroids ($r = 0 \mu m$) und auf der y-Achse der Sauerstoffpartialdruck pO_2 aufgetragen. $T = 37^\circ C$.

6.2.6 Diskussion

Der Einfluss der Kulturzeit auf die Morphologie von 3D Gewebemodellen wurde in Kapitel 6.1.1 auf Basis von phasenkontrastmikroskopischen Aufnahmen analysiert. Dabei wurde deutlich, dass sich die Wachstumscharakteristika je nach Zelltyp und Aussaatdichte unterscheiden. Sphäroide der Zelllinie MCF-7 zeigen nach einer kurzen Phase der Kontraktion (circa 24 h), und damit der Kompaktierung, ein lineares Wachstumsverhalten. U373 Zellaggregate schrumpfen hingegen während der gesamten Kulturzeit von sechs Tagen. Die positive/negative Wachstumsrate hängt dabei maßgeblich von der Aussaatdichte und demnach der initialen Größe des Sphäroids ab. Der Einfluss der Kulturzeit auf die Nährstoffkonzentrationen wurden

darauhin in **Kapitel 6.2.5** mit dem Fokus auf Sauerstoff untersucht, um den Zusammenhang zwischen der Größenveränderung und der Atmungsaktivität herstellen zu können. Sämtliche pO_2 Profile für MCF-7 sowie U373 Sphäroide besitzen zu jedem Zeitpunkt der Kulturzeit eine ähnliche Form. Sie sind durch einen leichten pO_2 Abfall im umgebenden Medium, steilen Sauerstoffgradienten innerhalb des Sphäroids und minimalen pO_2 Werten im Zentrum charakterisiert. Diese räumliche Verteilung von Sauerstoff innerhalb von 3D Zellaggregaten stimmt mit einer Vielzahl von dargestellten Profilen in der Literatur überein, welche aus mathematischen Modellierungen sowie *in vitro* Untersuchungen mit Mikroelektroden resultieren (Casciari et al., 1992a; Leedale et al., 2019; Mueller-Klieser et al., 1985; Mueller-Klieser et al., 1986). Zudem zeigen die Ergebnisse deutlich, dass die Oxygenierung innerhalb der Sphäroide vom Zelltyp und der Größe abhängt. MCF-7 Sphäroide mit einer Aussaatdichte von 4k Zellen/Well besitzen am ersten Tag der *in silico* Analyse einen Durchmesser von 335 μm und einen pO_2 Wert im Zentrum von 72,4 torr, während U373 Sphäroide ähnlicher Größe ($d = 370,9 \mu m$) höhere zentrale pO_2 Level ($pO_2 = 101,6$ torr) aufweisen. Ähnliche Unterschiede in den Sauerstoffprofilen zwischen Sphäroiden unterschiedlicher Zelllinien (EMT6/Ro vs. V-79-171B) mit ähnlichen Durchmessern (416 μm vs. 425 μm) haben Mueller-Klieser und Sutherland (1982) unter Verwendung von Mikroelektroden festgestellt. So waren bei Letzteren die Gradienten innerhalb der Zellaggregate steiler und die zentralen pO_2 Werte niedriger. Die Varianz in den Profilen liegt im Wesentlichen in den unterschiedlichen Sauerstoffverbrauchsrate begründet. Während MCF-7 Sphäroide Sauerstoff mit $1,44 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$ veratmen, verbrauchen die 3D Aggregate mit U373 Zellen nur $0,7 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$. Die quantifizierten Atmungsaktivitäten sind dabei in einer ähnlichen Größenordnung wie für andere Zelllinien in weiteren Studien. So bestimmten Leedale et al. (2019) R_{\max} in Hepatozyten mit Werten zwischen $1,54 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$ und $4,40 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$ mit der Seahorse Technologie. Grimes et al. (2016) leiteten Sauerstoffverbrauchsrate zwischen $(11,21 \pm 4,63) \text{ mmHg} \cdot \text{s}^{-1}$ ($\approx (1,6 \pm 0,7) \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$) für SCC-25 Sphäroide und $(27,92 \pm 6,05) \text{ mmHg} \cdot \text{s}^{-1}$ ($\approx (3,9 \pm 0,9) \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$) für HCT116 Sphäroide durch die Anpassung eines mathematischen Modell an experimentelle Wachstumskurven ab. Der Zusammenhang zwischen R_{\max} und dem Durchmesser wurde in den FEM-Analysen

bereits mit den validierten Werten für R_{\max} bei den adhärennten Zellaggregaten in **Kapitel 6.2.2** ersichtlich und infolge des sukzessiven Modellierungsprozesses zuletzt auch während der Kulturzeit. So besitzen kleine Sphäroide beider Zelllinien größere Werte für R_{\max} als solche mit großen Durchmessern und höheren initialen Aussaatdichten. Der beobachtete Einfluss der Größe auf die Atmungsaktivität ist konsistent mit weiteren Studien von Mueller-Klieser und Sutherland (1983) sowie Mueller-Klieser (1984). Im Rahmen dieser stellten sie fest, dass mit steigendem Durchmesser von Zellaggregaten der gleichen Zelllinie sowohl der pO_2 als auch die volumenbezogene OCR sinkt. So nahm die stationäre volumenbezogene Sauerstoffverbrauchsrate von EMT6/Ro Sphäroiden mit steigendem Durchmesser von $6,44 \cdot 10^{-4} \text{ mlO}_2 \cdot \text{cm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$ ($\varnothing = 386 \mu\text{m}$) auf $3,53 \cdot 10^{-4} \text{ mlO}_2 \cdot \text{cm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$ ($\varnothing = 534 \mu\text{m}$) ab. Freyer und Sutherland (1985) stellten einen Rückgang der volumenbezogenen Sauerstoffverbrauchsrate von 60 % pro 100 μm Sphäroidwachstum fest. Die mathematische Modellierung der Sauerstoffverteilung in Modellsphäroiden bestätigte die experimentellen Beobachtungen (Groebe & Mueller-Klieser, 1991). Die zeitabhängige Veränderung der lateralen pO_2 Gradienten ist für die Zellaggregate beider Zelllinien sehr unterschiedlich, wenngleich die beobachteten Trends im Grunde beibehalten bleiben. Dies liegt in den unterschiedlichen Wachstumscharakteristika begründet. Dadurch, dass MCF-7 Sphäroide ein lineares Wachstumsverhalten aufweisen, sinkt der zentrale pO_2 mit zunehmender Größe. Zudem hängen die pO_2 Level von der Stärke der jeweiligen Wachstumsrate ab. Je größer die Wachstumsrate ist, desto stärker sind die zeitabhängigen Varianzen in den pO_2 Gradienten sowie diejenigen in der lokalen Sauerstoffverbrauchsrate innerhalb der Sphäroide. Dies resultiert aus dem Anstieg der globalen Sauerstoffverbrauchsrate um 103,4 % bei 4k Zellen/Well und um 0,1 % bei 20k Zellen/Well, trotz der Annahme, dass R_{\max} für jede Aussaatdichte über die Zeit konstant ist. Ähnliche Veränderungen des Sauerstoffverbrauchs pro Sphäroid berichteten Mukomoto et al. (2020) unter Verwendung von SECM (*scanning electrochemical microscopy*). So nahm R_{global} für MCF-7 Sphäroide mit 1250 Zellen/Well und 10k Zellen/Well während des Wachstums von $t = 1 - 7 \text{ d}$ zu. Die Kombination mit numerischen Simulationen bewies, dass die Ergebnisse der *in silico* Analysen auch unter Annahme konstanter Werte für R_{\max} konsistent mit den *in vitro* Resultaten waren. Wegen der Kompaktierung der U373

Sphäroide sowie der damit einhergehenden mathematischen Modellierung differieren die Beobachtungen während der Kulturzeit gegenüber denjenigen bei MCF-7 Zellen. Trotz einer Kompaktierung und damit einer Verkleinerung der Diffusionsstrecke für Sauerstoff besitzen diese am letzten Tag niedrigere pO_2 Level als am ersten Tag. Zudem steigt der maximale volumenbezogene Sauerstoffverbrauch R_{max} für jede Aussaatdichte an und die Gradienten in den lokalen Sauerstoffverbrauchsraten verstärken sich. Carrasco-Mantis, Randelovic et al. (2023) untersuchten die laterale Nährstoffkonzentration bei kompaktierenden U251 Sphäroiden in einem Zeitraum von $t = 3 - 14$ d und stellten fest, dass die Konzentration am dritten Tag am höchsten ist. Im weiteren Zeitverlauf sinkt diese auf niedrigere Werte. Allerdings bildeten sich zu keinem Zeitpunkt Konzentrationsgradienten aus. Dies könnte darin begründet liegen, dass die Zellaggregate mit 1k Zellen/Well sehr klein sind und demnach die Diffusion genauso schnell wie der Verbrauch ist, was in konstanten Konzentrationen resultieren würde. Die zeitabhängige Atmungsaktivität in 3D Geweben hängt zusammenfassend vom Zelltyp, der Größe und der OCR ab. Die beobachteten Ergebnisse könnten durch Veränderungen in der Mikroumgebung sowie im Status der Zellen selbst erklärt werden (Freyer & Sutherland, 1985; Mueller-Klieser et al., 1986). Kleinere Zellaggregate besitzen kürzere Diffusionsdistanzen und es herrscht ein Gleichgewicht zwischen Sauerstoffdiffusion und Sauerstoffverbrauch. Die Zunahme in der Größe ist mit einer Vergrößerung der Diffusionslänge für Sauerstoff und der Bildung von Konzentrationsgradienten in den Sphäroiden beider Zelllinien verbunden. Um die laterale Diffusionsgeschwindigkeit von Sauerstoff innerhalb der 3D Gewebemodelle besser einschätzen zu können, wurde das *random walk* Modell bei $t = 1$ d angewandt. So beträgt die Diffusionszeit von Sauerstoff in MCF7 Sphäroiden zwischen 4,7 s (4k Zellen/Well) und 15,2 s (20k Zellen/Well) bis zum Zentrum. Bei dem 3D Gewebe mit U373 Zellen hingegen 4,2 s (6k Zellen/Well) bis 33,4 s (30k Zellen/Well). Um die Penetrationstiefe von Sauerstoff in das Zentrum des Sphäroids zu erhöhen und damit die O_2 Level aufrechtzuerhalten, erfolgt eine Anpassung des Metabolismus durch eine Abnahme in R_{max} . Die im Zuge des Größenzuwachses gebildeten Konzentrationsgradienten können damit allerdings nicht ausgeglichen werden, zumal das Medium nicht gewechselt wurde. Außerdem sind bereits am ersten Tag nach Bildung der MCF-7 Aggregate ($t = 1$ d) lokale Variationen in R_{O_2} mit zunehmender

Größe der Sphäroide zu beobachten, welche sich mit steigender Wachstumsrate weiter verstärken. Diese Veränderung der Atmungsaktivität lässt auf die Bildung biologischer Zonen mit ruhenden Zellen schließen. Die Vermutung ist konsistent mit den Beobachtungen von Braun und Beatty (2007). Sie untersuchten den Sauerstoffverbrauch in humanen OCM-1 Sphäroiden unter Verwendung polarographischer Methoden und zeigten durch einen Fit der Sauerstoffprofile an verschiedene Sauerstoffdiffusionsmodelle, dass der beste Fit unter Annahme eines Modells mit drei verschiedenen Regionen erreicht werden konnte. Dabei verringerten die Zellen ihre Atmungsaktivität mit zunehmender Entfernung von der Oberfläche des Sphäroids. Der Zusammenhang zwischen der Lokalisierung der Zellen und dem Sauerstoffverbrauch wurde ebenso mittels polarographischer Methoden bei MCF-7 Sphäroiden (Mandujano-Tinoco et al., 2013) sowie bei EMT6/Ro Sphäroiden beobachtet (Freyer & Sutherland, 1985). Unter Verwendung zweier verschiedener Färbemethoden (R123 und NAO) in EMT6/Ro sowie 9L Sphäroiden schlussfolgerten Freyer und Sutherland zudem (1980), dass die Veränderungen in der Atmungsrate mit der Herabregelung der mitochondrialen Aktivität ruhender Zellen einherging und weniger mit einem Abbau von Mitochondrien verbunden war. Infolgedessen hängen metabolische Veränderungen mit den konzentrischen Zonen zusammen. Trotz größerer Durchmesser und demnach längerer Diffusionsstrecken für Sauerstoff sind bei U373 Sphäroiden jeder Aussaatdichte hingegen uniforme lokale Sauerstoffverbrauchsraten bei $t = 1$ d zu beobachten. Dieses Phänomen könnte auf eine gleichmäßige Verteilung der Mitochondrien zurückgeführt werden. Mit eben dieser Begründung rechtfertigten Bredel-Geissler et al. (1992) den einheitlichen volumenbezogenen Sauerstoffverbrauch in EMT6/Ro Sphäroiden trotz niedriger pO_2 Werte im Inneren. Jedoch müssen die Ergebnisse stets unter Berücksichtigung der mathematischen Modellierung analysiert werden. Unter der Annahme, dass während der Kompaktierung keine Proliferation stattfindet, besitzen die Zellaggregate für jede Aussaatdichte zu jedem Zeitpunkt identische Gesamtsauerstoffverbrauchsraten, während R_{max} steigt. Die Bildung von Gradienten in den lokalen Sauerstoffverbrauchsraten während der Kulturzeit könnte demnach auf Basis der bisherigen Diskussionsaspekte insofern erklärt werden, dass sich, trotz einer Kontraktion des Volumens, ebenfalls biologische Zonen gebildet haben, welche die

Atmungsaktivität beeinflussen. Viel eher könnten die Zellen jedoch ihren Metabolismus in Abhängigkeit von der Kontraktion und dem damit einhergehenden Kompaktieren verändert haben. So berichtete Mueller-Klieser (2000), dass auch Zell-Zell und Zell-Matrix Kontakte Einfluss auf den Stoffwechsel nehmen. Ebenfalls unter der Annahme, dass keine Zellproliferation stattfindet, modellierten Leung et al. (2015) die Sauerstoffkonzentration innerhalb von zwei Modellsphäroiden mit der gleichen Zellzahl und einer identischen globalen Sauerstoffverbrauchsrate pro Sphäroid. Sie konnten zeigen, dass der kompakte Sphäroid, trotz einer Verringerung des Volumens um $1/8$, niedrigere pO_2 Level besitzt. Diese Tatsache wiederum ging mit einer gleichzeitigen Erhöhung der volumenbezogenen Sauerstoffverbrauchsrate um nahezu das Achtfache einher, um den Volumenverlust auszugleichen. Eine tiefergehende Analyse ist jedoch aufgrund mangelnder Literaturdaten, welche sich mit der anfänglichen Phase der Aggregatbildung beschäftigen, schwierig. Folglich müssten weitere *in vitro* Messungen durchgeführt werden, mit welchen die Zellaggregate hinsichtlich weiterer Parameter, wie dem Zellzyklus oder interzellulären Kräften, charakterisiert werden können.

Neben dem Zusammenhang zwischen dem Metabolismus und der Größe der Zellaggregate wurde zudem die Beziehung zwischen Hypoxie und Nekrose untersucht. In den Profildiagrammen und 3D Plots der Sphäroide beider Zelllinien sind während der Kulturzeit allein auf Basis des vorhandenen Restsauerstoffs keine nekrotischen Bereiche erkennbar. Gemäß der mathematischen Modellierung haben sich demnach keine Regionen gebildet, in welchen die Konzentration unterhalb der definierten kritischen Sauerstoffkonzentration von 0,07 torr liegt (Anundi & de Groot, 1989; Avgoustiniatos & Colton, 2006; Papas et al., 2005). Hupf (2017) beobachtete ebenfalls keine nekrotischen Bereiche in transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen (TEM) von MCF-7 Sphäroiden während einer Kulturzeit von neun Tagen. Allerdings zeigen die phasenkontrastmikroskopischen Aufnahmen von MCF-7 Sphäroiden ab einem Schwellenwert von circa $r = (253 \pm 1) \mu m$ dunkle, zentrosymmetrische Areale. Laut Literatur sind Durchmesser ab circa 500 μm kritisch für die Bildung von Nekrose (Hirschhaeuser et al., 2010). Mukomoto et al. (2020) identifizierten ebenfalls ab $r = 260 \mu m$ solch dunkle, zentrosymmetrische Areale für

MCF-7 Sphäroide unterschiedlicher Aussaatdichten und definierten diese als nekrotische Kerne. Sie stellten mittels histologischer Untersuchungen fest, dass diese Regionen Merkmale einer Pyknose (Zellkernschrumpfung) aufweisen, welche als Indikation für Apoptose gilt. Beispielsweise waren die Zellkerne kleiner als am Rand des Sphäroids und die Konzentration bedeutend geringer. Den prozentualen Anteil von lebenden, apoptotischen und nekrotischen Zellen untersuchten Gong et al. (2015) für MCF-7 Sphäroide mit den Aussaatdichten 2k, 4k und 8k Zellen/Well. Dazu wurden die 8 – 12 d alten Zellaggregate dissoziiert und mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung eines Annexin V-FITC Apoptose-Detektionskit analysiert. Sowohl mit zunehmender Zellzahl als auch fortschreitender Zeit nahm der Anteil lebender Zellen ab, während derjenige von apoptotischen/nekrotischen Zellen zunahm. Zusammen mit den Studien von Mueller-Klieser et al. (1986) sowie Freyer und Sutherland (1986) wird ersichtlich, dass auch andere Faktoren, wie metabolische Abfallprodukte, der pH-Wert oder die Konzentration von Glukose, die Entwicklung einer Nekrose beeinflussen können. So berichteten erstgenannte Autoren von nekrotischen Bereichen trotz einer ausreichenden Versorgung von EMT6/Ro Sphäroiden mit Sauerstoff. Die zweitgenannten Autoren zeigten zudem, dass eine Verringerung der Glukosekonzentration mit einer Abnahme des lebensfähigen Randes einherging. Diese Beobachtungen führen zu der Annahme, dass Sauerstoff zwar einen limitierenden Faktor darstellt, die alleinige Modellierung von Sauerstoff jedoch nicht ausreicht, um das Phänomen der Nekrose ausreichend zu beschreiben. Dies wird unterstützt durch den Vergleich der Sauerstoffprofile bei MCF-7 Sphäroiden mit denjenigen der ratiometrischen Messung in **Abbildung 62**. Mit Ausnahme der Zellaggregate mit 4k Zellen/Well besitzen die lateralen pO_2 Gradienten *in vitro* zentrale Plateauregionen, welche ein Indiz für eine fehlende Atmungsaktivität und möglicherweise für Nekrose sind. Mit zunehmendem Durchmesser der Sphäroide werden die Plateauregionen immer breiter. Einen ähnlichen Trend in der Zunahme der Tumorgroße bei gleichzeitigem Anstieg des nekrotischen Anteils beobachteten Khalil et al. (1995) für Zellaggregate mit C3H Zellen. Zudem entstehen die zentralen Plateauregionen bei unterschiedlichen Level der Oxygenierung (12k Zellen/Well: 20 torr; 20k Zellen/Well: 5,7 torr). Ebenso zeigten EMT6/Ro und V-79-171B Sphäroide bereits bei variierenden Sauerstoffkonzentrationen von 42 – 57 mmHg eine zentrale

Nekrose (Mueller-Klieser & Sutherland, 1982). Dies unterstützt die Vermutung, dass kein monokausaler Zusammenhang zwischen Hypoxie und Nekrose besteht und das Phänomen, wie bereits erwähnt, aus dem Zusammenspiel mehrerer Faktoren resultiert.

Mit den FEM-Analysen von der Bildung der Zellaggregate bis zu deren morphologischen Veränderung im Zuge des Adhäsionsprozesses wurde des Weiteren deutlich, dass die ratiometrisch gemessene Atmungsaktivität von adhärenen Sphäroiden der Zelllinien MCF-7 und U373 im Wesentlichen auf die Respiration während der Kulturzeit zurückzuführen ist. Die Ergebnisse in **Abbildung 81** validieren diese Tatsache und sämtliche im Modellierungsprozess getroffenen Annahmen. Demnach stimmen die lateralen pO_2 Gradienten am letzten Tag der Kulturzeit für die Sphäroide beider Zelllinien mit denjenigen vor dem Adhäsionsprozess überein. Diese wiederum sind weitestgehend konsistent mit der Atmungsaktivität der gebildeten Halbsphären nach der Adhäsion in Abhängigkeit von der geometrischen 3D Struktur. Dabei sind unter Annahme einer sphärischen Geometrie für die Sphäroide in Suspension Diskrepanzen in den Sauerstoffprofilen verglichen mit hemi-ellipsoiden Strukturen zu beobachten (siehe **Abbildung 67**). Unter der Annahme einer ellipsoiden 3D Struktur für suspendierte Zellaggregate stimmen die Sauerstoffprofile vor und nach dem Adhäsionsprozess überein (siehe **Abbildung 70**). Solche Differenzen mit zunehmender Exzentrizität stellten ebenso Grimes und Currell (2018) fest, welche die Sauerstoffverteilung in ellipsoiden und sphärischen Tumorsphäroiden in Suspension mit mathematischen Modellierungen untersuchten. Demnach beeinflusst die Geometrie die Transportgradienten. Außerdem besitzen sphärische MCF-7 Aggregate in Suspension mit einer Aussaatdichte von 20k Zellen/Well nekrotische Bereiche im Zentrum, was konsistent ist mit den Simulationen von Leung et al. (2015). Unter Annahme identischer volumenbezogener Sauerstoffverbrauchsrate beobachteten sie hypoxische Regionen in idealen Sphäroiden, nicht jedoch in ellipsoiden Zellaggregaten. Nach der Adhäsion der Zellaggregate am Boden des Wells und wegen dem verringerten Diffusionskoeffizienten von Sauerstoff in der Sensorfolie ist die Diffusion zudem eingeschränkt. Folglich sinkt der Sauerstoffverbrauch pro Sphäroid um nahezu die Hälfte. Bei einer vergleichenden Analyse der Sauerstoffprofile von

EMT6/Ro Sphäroiden vor und nach einer achtstündigen Adhäsion auf einer sauerstoffpermeablen Membran kamen Mueller-Klieser und Sutherland (1982) zu ähnlichen Resultaten. Sie erklärten dies ebenfalls mit einem verringerten Sauerstoffverbrauch der Zellaggregate nach der Adhäsion als Folge der eingeschränkten Nährstoffversorgung. Zusammenfassend liegen die Gründe für die Abweichungen weniger im Adhäsionsprozess und der damit einhergehenden Veränderung der Atmungsaktivität begründet. Vielmehr sind die geometrischen Unterschiede (Ellipsoid/Sphäre) die Ursache für die Differenzen in den lateralen pO_2 Gradienten.

6.3 Chemische Modulation der oxidativen Phosphorylierung

Multizelluläre Sphäroide stellen im Vergleich zu 2D Gewebemodellen verbesserte *in vitro* Modelle zur Untersuchung des Stoffwechsels und der Toxizität sowie präklinischer Wirkstoffscreenings dar. Die 3D Anordnung der Zellen führen zur Entstehung von verschiedenen Zonen und zu Konzentrationsgradienten. Dies wiederum beeinflusst die Behandlung mit diversen Therapeutika durch limitierte Zugänglichkeit sowie Veränderungen in der RNA- und Proteinexpression (Mehta et al., 2012). Bei den meisten Analysemethoden, welche ein vertieftes Verständnis für die Prozesse in der Mikroumgebung ermöglichen, handelt es sich um invasive Endpunktassays. Beispiele hierfür sind Assays zur Analyse des Protein/DNA Gehalts (Campioni et al., 2022; Riffle et al., 2017), immunhistochemische Verfahren mittels histologischer Schnitte (Mandujano-Tinoco et al., 2013) oder Färbemethoden zur phänotypischen Charakterisierung von Sphäroiden (Bell et al., 2001). Das vorgestellte Messsystem VisiSens TD stellt eine Alternative dar, die chemische Modulation der oxidativen Phosphorylierung nicht-invasiv zu überwachen. Die Ergebnisse von Schmittlein (2017) haben gezeigt, dass der Wechsel des L-15 Mediums nach $t = 8$ h (Kontrollbedingung) wenig Einfluss auf die Oxygenierung adhärenter MCF-7 Sphäroide hat. Durch Zugabe von $2 \mu\text{M}$ Antimycin A (Ant A), einem Hemmstoff des Komplexes III der Elektronentransportkette (Harmjanz, 2021), wurde eine sofortige Blockierung der Atmungsaktivität verursacht. Die beobachteten Effekte wurden in dieser Arbeit gemäß dem experimentellen Setup mit FEM-Analysen validiert. Dazu wurden adhärente MCF-7 Sphäroide mit einer Aussaatdichte von 4k Zellen/Well und den Eingangsvariablen aus **Tabelle 19** und **Tabelle 20** modelliert. Die Ergebnisse in **Abbildung 82** zeigen die zeitlichen (**A**) und räumlichen Veränderungen (**B**) des pO_2 unter den Kontrollbedingungen über einen Modellierungszeitraum von 12 h. Der pO_2 im Zentrum des Zellaggregats (**A** —) fällt innerhalb von 4 h von 149 torr ($t = 0$ h) auf nahezu konstante Werte von ungefähr 24 torr. Nach der simulierten Zugabe von frischem Medium ($t = 8$ h) steigt der pO_2 um 39,7 % und sinkt anschließend wieder auf den beobachteten Wert vor der Zugabe. Im überstehenden L-15 Medium (—) ist ein initialer Abfall des pO_2 von knapp 7 % zu beobachten. Die Variation in den lateralen Sauerstoffgradienten im Querschnitt des adhärenen Sphäroids und dem umgebenden

Medium vor (—) und 30 min nach Medienwechsel (—) sind in (B) sichtbar. Es wird deutlich, dass der Wechsel des Mediums den Sauerstoffverbrauch kaum beeinflusst. Die Sauerstoffprofile sind einander ähnlich mit dem einzigen Unterschied, dass die Level der Oxygenierung sowohl im überstehenden Medium als auch im Zentrum zum Zeitpunkt $t = 8,5$ h höher sind.

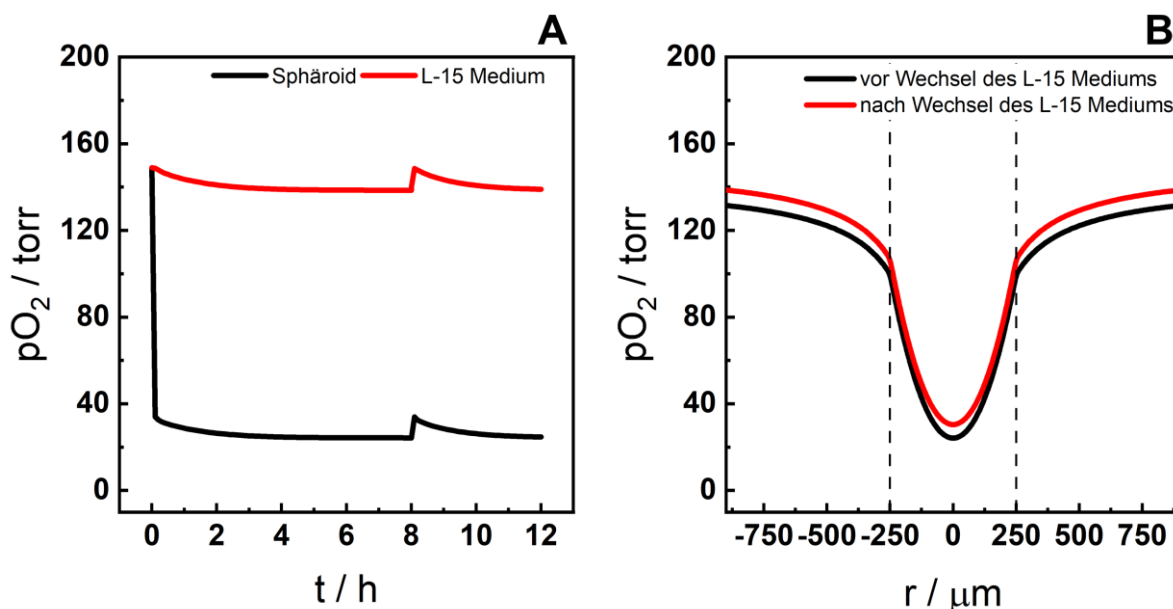


Abbildung 82: Einfluss der Zugabe von frischem L-15 Medium zum Zeitpunkt $t = 8$ h auf die *in silico* Atmungsaktivität adhärenter MCF-7 Sphäroide mit einer Aussaatdichte von 4k Zellen/Well. (A) Veränderung des pO₂ im überstehenden L-15 Medium (—) und im Zentrum des Zellaggregats (—) in Abhängigkeit von der Zeit. (B) Laterale pO₂ Gradienten aus dem Querschnitt durch das umgebende Medium und den Sphäroid bei $t = 8$ h (—) und bei $t = 8,5$ h (—). $T = 37$ °C.

In **Abbildung 83** ist der Stopp der Veratmung, wie es durch Atmungsketten-Blocker wie Antimycin A (Ant A) erzielt wird, visualisiert. Vor dem Stopp der Veratmung sind sowohl die zeitabhängigen Veränderungen im pO₂ (A) als auch die lateralen pO₂ Gradienten im umgebenden Medium und im Sphäroid (B) analog zu den Ergebnissen in **Abbildung 82**. Die Blockierung der zellulären Veratmung und die damit einhergehende Reoxygenierung wird dadurch deutlich, dass die pO₂ Werte im überstehenden Medium (—) und im Zentrum des Zellaggregats (—) innerhalb von 6 min nach dem Stopp der Veratmung auf 138,6 torr und 134,3 torr ansteigen. Nach zwölf Stunden wird schließlich ein einheitliches Sauerstofflevel von 149 torr erreicht, welches dem initialen Sauerstoffpartialdruck entspricht. Demzufolge unterscheidet sich der pO₂ im Zentrum des Sphäroids nicht mehr von demjenigen im überstehenden

Medium. Der simulierte Effekt der irreversiblen Hemmung der oxidativen Phosphorylierung, wie es durch Ant A verursacht werden kann, wird noch deutlicher bei der Betrachtung der Profillinien in **Abbildung 83 B**. Innerhalb von 30 min nach Atmungsstopp (—) sind keine lateralen pO_2 Gradienten mehr zu beobachten. Der Sauerstoffpartialdruck erreicht über den gesamten Querschnitt von 2 mm einen konstanten Wert von 141,3 torr.

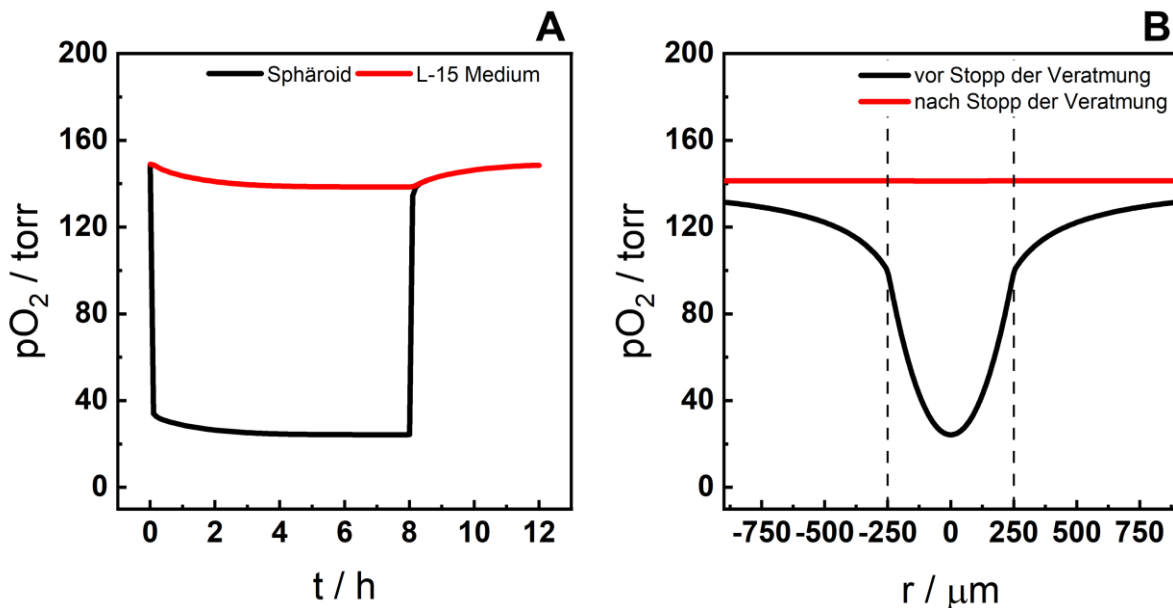


Abbildung 83: Einfluss eines Stopps der Veratmung zum Zeitpunkt $t = 8$ h auf die *in silico* Atmungsaktivität adhärenter MCF-7 Sphäroide mit einer Aussaatdichte von 4k Zellen/Well. (A) Veränderung des pO_2 im überstehenden Medium (—) und im Zentrum des Zellaggregats (—) in Abhängigkeit von der Zeit. (B) Laterale pO_2 Gradienten aus dem Querschnitt durch das umgebende Medium und den Sphäroid bei $t = 8$ h (—) und bei $t = 8,5$ h (—). $T = 37$ °C.

Die *in silico* Analysen unterstützen die von Schmittlein (2017) berichteten Daten. So zeigen diese, dass die Sauerstoffverteilung in adhärennten MCF-7 Sphäroiden kaum durch den Austausch des Mediums beeinflusst wurde. Die Blockierung der Atmung, wie beispielsweise durch Antimycin A erzielt wird, und die darauffolgende Reoxygenierung auf nahezu atmosphärische pO_2 Level wurde zudem im Rahmen anderer Forschungsarbeiten beobachtet. So untersuchten Campioni et al. (2022) die mitochondrialen Funktionen von MCF-7 Sphäroiden der Zelldichten 7k – 10k Zellen/Well und 11k – 15k Zellen/Well mit dem Seahorse XF Mito Stress Test. Durch die sequenzielle Injektion von Modulatoren der oxidativen Phosphorylierung, unter anderem einem Gemisch (0,5 μM) aus Antimycin A und

Rotenon, konnten diese eine Abnahme im Sauerstoffverbrauch bis nahezu $0 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1}$ erkennen und schlussfolgerten, dass eine Umstellung auf den anaeroben Stoffwechsel stattfand. Pilatus et al. (2001) nutzten das Phänomen der magnetischen Resonanz zur Sauerstoffmessung in MCF-7 Zellen im *Monolayer* und stellten ebenfalls fest, dass nach Zugabe von Ant A ($0,2 \text{ } \mu\text{M}$) nur noch ein geringer Sauerstoffverbrauch messbar war. Die vollständige Reoxygenierung nach der Behandlung mit Antimycin A (200 nM) berichteten auch Klutzny et al. (2017) für mit Pimonidazol gefärbte Kryoschnitte von HCT116 Sphäroiden. Die Beobachtung, dass die Reoxygenierung im gesamten Sphäroid innerhalb weniger Minuten nach der Zugabe von Ant A ($10 \text{ } \mu\text{M}$) stattfindet, ist einerseits konsistent mit den Ergebnissen für Neurosphären von Dmitriev et al. (2015). Andererseits wird diese durch die Berechnung der statistischen Diffusionszeit von einem Molekül Sauerstoff von der Oberfläche des Sphäroids ins Zentrum mit dem *random walk model* (siehe **Gleichung (28)** und **(29)**) bestätigt. Demnach dauert es nur $10,4 \text{ s}$ bis Sauerstoff ins Zentrum diffundiert ist.

6.4 Sauerstoffverteilung in adhärenenten U373 Sphäroiden auf permeablen Kultursubstraten

Die Verwendung permeabler Kultursubstrate stellt eine weitere Möglichkeit dar, die Atmungsaktivität von Sphäroiden *in vitro* untersuchen. Außerdem ermöglichen diese multiple Messmethoden, wie die zusätzliche Analyse des pH-Wertes. Der Unterschied zu dem bisherigen experimentellen Setup, welcher in **Abbildung 84 A** dargestellt ist, liegt darin, dass die Sphäroide nicht mehr direkt auf der Sauerstoff-sensitiven Sensorfolie adhären, sondern auf der Membran eines permeablen Kultursubstrates (**B**). Die Sensorfolie ist dabei direkt unterhalb des Einsatzes am Boden des Wells einer 12- oder 24-Well Platte angebracht. Bei den hier untersuchten permeablen Kultursubstraten handelt es sich stets um solche für eine 24-Well Platte.

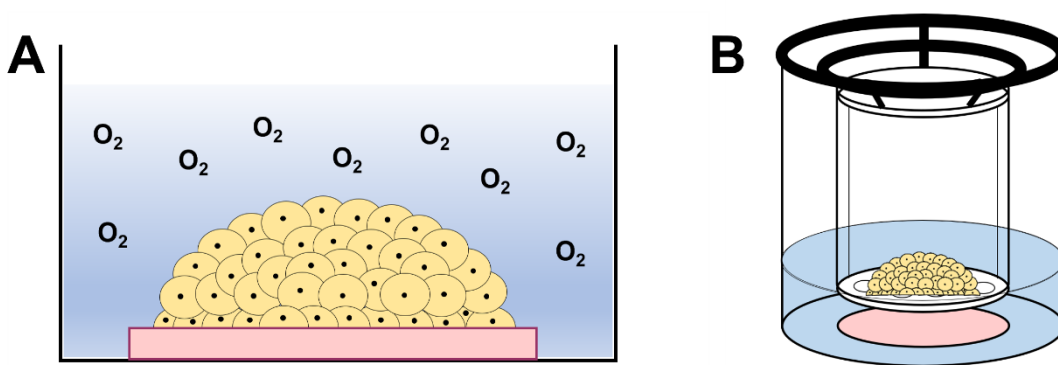


Abbildung 84: Darstellung von zwei *in vitro* Assays zur Untersuchung der Atmungsaktivität adhärenenten Sphäroide. Die Zellaggregate adhären in (**A**) direkt auf der Sauerstoff-sensitiven Sensorfolie und in (**B**) auf der Membran eines permeablen Kultursubstrates. Die Sensorfolie ist dabei direkt unterhalb des Einsatzes am Boden des Wells fixiert.

Mittels verschiedener FEM-Modelle soll der Einfluss permeabler Kultursubstrate auf die Sauerstoffprofile adhärenenten U373 Sphäroide mit Aussaatdichten von 6k Zellen/Well und 30k Zellen/Well hinsichtlich verschiedener Aspekte analysiert werden. Analog zu den Simulationen in **Kapitel 5.2** sind diese konkret die Membraneigenschaften von permeablen Membraneinsätzen der Hersteller Corning und Sabeu sowie die Distanzen zwischen den Zellaggregaten auf dem Kultursubstrat und der Sensorfolie. In jeder *in silico* Analyse wurden Sauerstoffprofile durch je eine

2D Schnittlinie in der Sauerstoff-sensitiven Sensorfolie sowie im Gewebe selbst generiert. Die modellierte Geometrie eines Wells einer 24-Well/12-Well Platte inklusive der Abmessungen des permeablen Membraneinsatzes, ist **Kapitel 4.3.1** zu entnehmen. Das modellierte Volumen für die Analyse war 200 μL im apikalen Kompartiment. Es wurde angenommen, dass die Morphologie sowie die Atmungsaktivität unabhängig davon ist auf welchem Substrat die Zellaggregate adhären. Diese Präsomption erfolgte aufgrund der Tatsache, dass alleinig das System und die damit einhergehenden Faktoren, wie beispielsweise die Porosität der verwendeten Membran, untersucht werden sollte. Demnach entsprechen die Initialwerte für den Radius r und die Höhe h den morphometrisch ermittelten Daten aus **Kapitel 6.1.2**. Darüber hinaus erfolgte die mathematische Modellierung analog zu **Kapitel 6.2.2** mit den *Input*werten für R_{max} aus **Tabelle 18**.

6.4.1 Einfluss unterschiedlicher Membranen

Zunächst wurde der Einfluss der Membraneinsätze unterschiedlicher Hersteller (Corning und Sabeu) auf die Sauerstoffprofile simuliert. Diese unterscheiden sich hinsichtlich der Porosität und dem effektiven Diffusionskoeffizienten von Sauerstoff (siehe **Tabelle 10**). Dabei wurde für die 24-Well Systeme der Fall modelliert, dass die Membraneinsätze direkt auf der Sauerstoff-sensitiven Sensorfolie stehen und somit kein Spalt zwischen dem adhären Sphäroid auf dem permeablen Kultursubstrat und der Sensorfolie ist. Dies resultiert einerseits aus den Ergebnissen in **Kapitel 5.2.1**, welche zeigen, dass das strukturelle Design der Membraneinsätze einen wesentlichen Einfluss auf die Gradienten hat. Andererseits soll untersucht werden, ob sich die Sauerstoffprofile in den experimentellen Setups aus **Abbildung 84** für diesen Fall unterscheiden.

In **Abbildung 85** und **Abbildung 86** sind die Unterschiede zwischen den lateralen pO_2 Gradienten aus dem Querschnitt der adhären Sphäroide mit den Aussaatdichten 6k Zellen/Well und 30k Zellen/Well sowie im Sensor dargestellt. Die erste Reihe in beiden Abbildungen zeigt die Ergebnisse für die Transwell®-Membraneinsätze von Corning mit der größten (**A**: 0,141) und kleinsten Porosität (**B**: 0,005). Analog dazu sind in der zweiten Reihe diejenigen für die cellQART®-Membraneinsätze von Sabeu dargestellt (**C**: größte Porosität 0,141; **D**: kleinste Porosität 0,003). Die Einflüsse aller

kommerziell erwerbbarer Membraneinsätze von Corning und Sabeu aus **Tabelle 10** auf die Sauerstoffprofile adhärenter Sphäroide beider Aussaatdichten zeigen die **Abbildung 93 – Abbildung 96** in **Kapitel 10.1**.

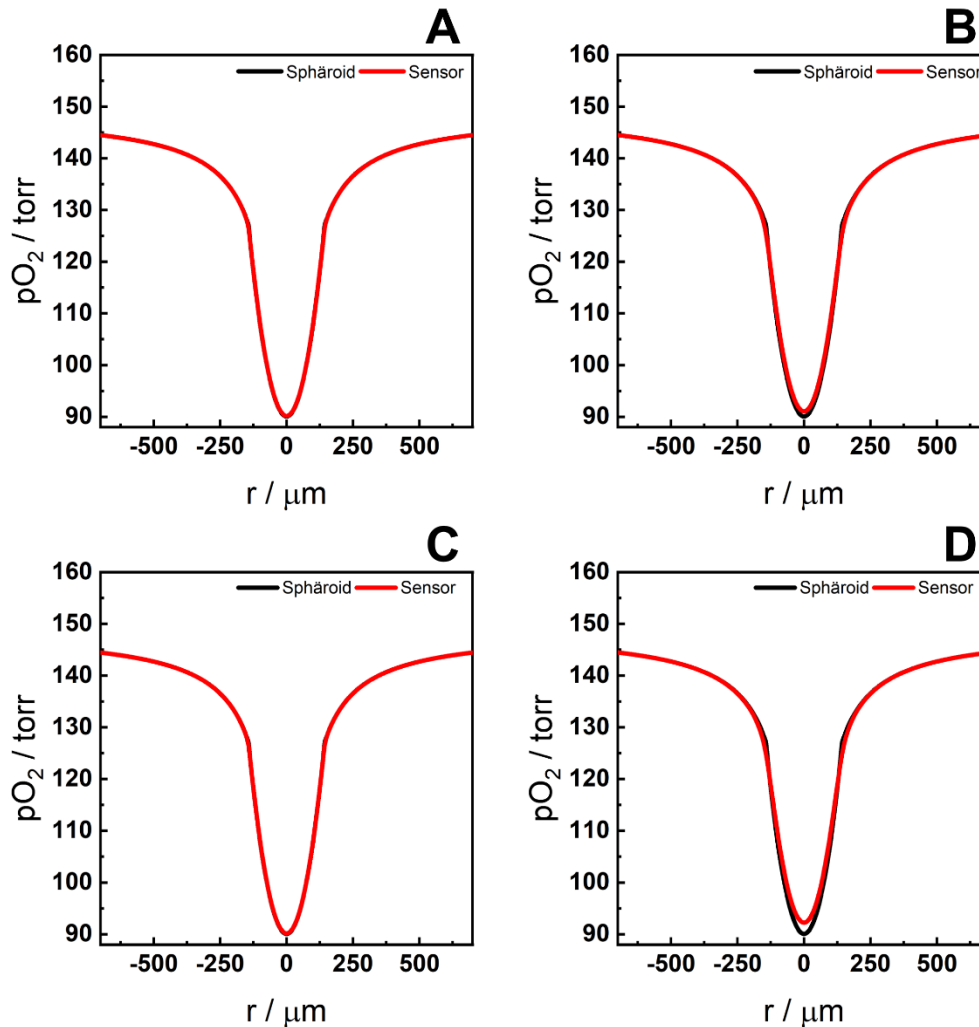


Abbildung 85: Darstellung der lateralen pO_2 Gradienten aus dem Querschnitt eines adhärenen U373 Sphäroids mit einer Aussaatdichte von 6k Zellen/Well (—) sowie in der Sauerstoff-sensitiven Sensorfolie (—). Die erste Reihe zeigt die Ergebnisse für die Transwell®-Membraneinsätze von Corning mit der größten (A: 0,141) und kleinsten Porosität (B: 0,005). Analog dazu sind in der zweiten Reihe die cellQART®-Membraneinsätze von Sabeu mit der größten (A: 0,141) und kleinsten Porosität (B: 0,003) dargestellt (siehe **Tabelle 10**). Die Generierung der Daten erfolgt über eine 1D-Plotgruppe mit zwei 2D Schnittlinien. Eine der Schnittlinien wurde hierbei im Gewebe lokalisiert, während sich die andere im Sensor befindet. $T = 37\text{ °C}$.

Die Sauerstoffprofile, welche einerseits aus der Sensorantwort (—) resultieren und andererseits im Gewebe (—) selbst generiert wurden, sind völlig identisch für die Membraneinsätze (A) und (C) in **Abbildung 85**. In beiden Fällen nimmt der pO_2

zunächst um circa 12 % im umgebenden Medium ab. Innerhalb des Sphäroids mit 6k Zellen/Well (t_0) ist ein steiler Rückgang des pO_2 bis zu zentralen Werten von knapp 90,1 torr zu beobachten. Dies liegt darin begründet, dass sowohl das System 1D (Corning) als auch das System 2E (Sabeu) aus **Tabelle 10** gleiche Werte in der Porosität sowie im effektiven Diffusionskoeffizienten besitzen.

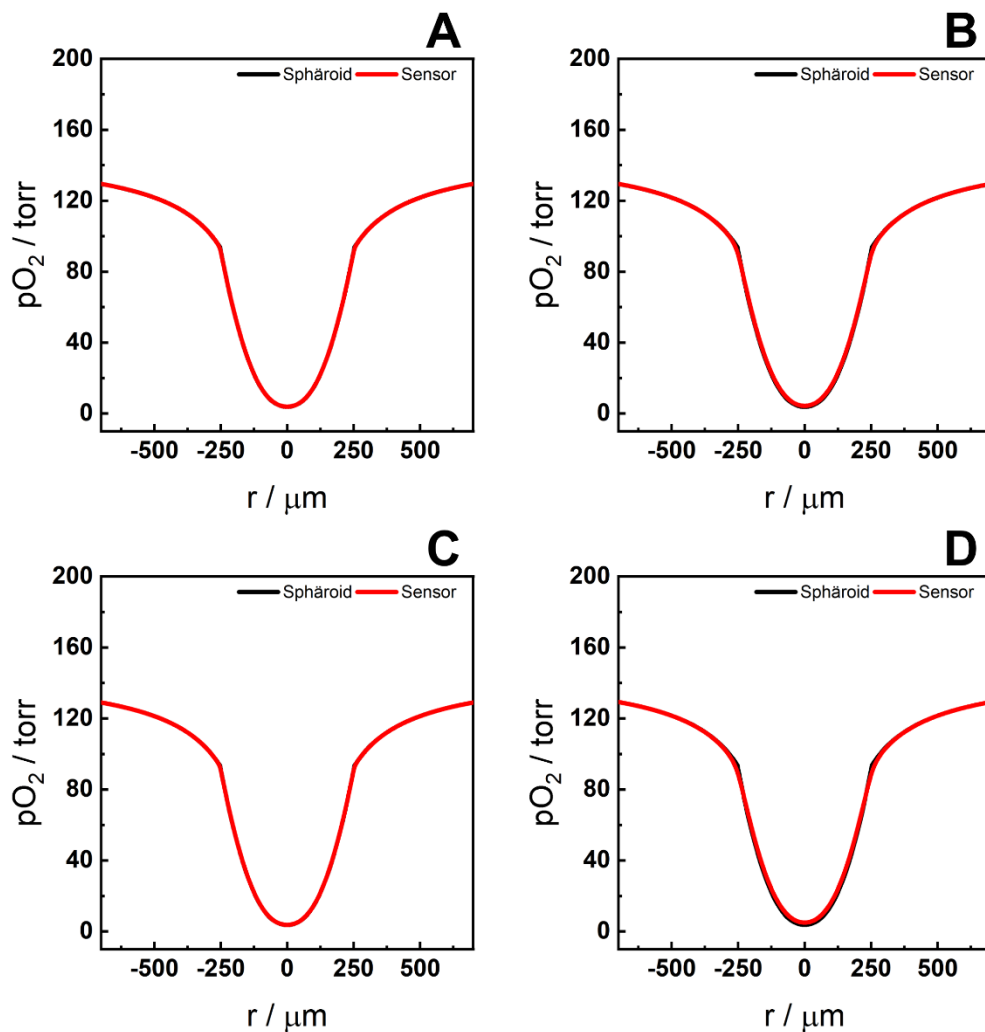


Abbildung 86: Darstellung der lateralen pO_2 Gradienten aus dem Querschnitt eines adhärenen U373 Sphäroids mit einer Aussaatdichte von 30k Zellen/Well (—) sowie in der Sauerstoff-sensitiven Sensorfolie (—). Die erste Reihe zeigt die Ergebnisse für die Transwell®-Membraneinsätze von Corning mit der größten (A) und kleinsten Porosität (B). Analog dazu sind in der zweiten Reihe die cellQART®-Membraneinsätze von Sabeu dargestellt (siehe **Tabelle 10**). Die Generierung der Daten erfolgt über eine 1D-Plotgruppe mit zwei 2D Schnittlinien. Eine der Schnittlinien wurde hierbei im Gewebe lokalisiert, während sich die andere im Sensor befindet. $T = 37\text{ °C}$.

Ähnliches ist für adhärenente Sphäroide mit der Aussaatdichte von 30k Zellen/Well in **Abbildung 86 A** und **C** erkennbar, wenngleich die Sauerstoffprofile im Allgemeinen breiter sind, was mit dem größeren Radius des Zellaggregats zusammenhängt. Zudem ist der Sauerstoffpartialdruck im Zentrum ($r = 0 \mu\text{m}$) mit Werten von knapp 3,9 torr geringer im Vergleich zur kleineren Aussaatdichte.

Beim Transwell®-Membraneinsatz 1B von Corning mit der geringsten Porosität von 0,005 weicht der $p\text{O}_2$ im Zentrum des Sphäroids mit 6k Zellen/Well (t_0) um 1,1 % von dem Wert im Sensor ab (**Abbildung 85 B**). Die Diskrepanz erhöht sich auf 13,1 % bei einer Aussaatdichte von 30k Zellen/Well (**Abbildung 86 B**). Die Unterschiede sind mit 2,4 % (**Abbildung 85 D**) und 31,1 % (**Abbildung 86 D**) noch ausgeprägter beim cellQART®-Membraneinsatz 2B von Sabeu mit einer Porosität von 0,003.

Ausgehend von identischen Werten für R_{max} für die jeweiligen Zellaggregate wurden die experimentellen Setups aus **Abbildung 84** miteinander verglichen.

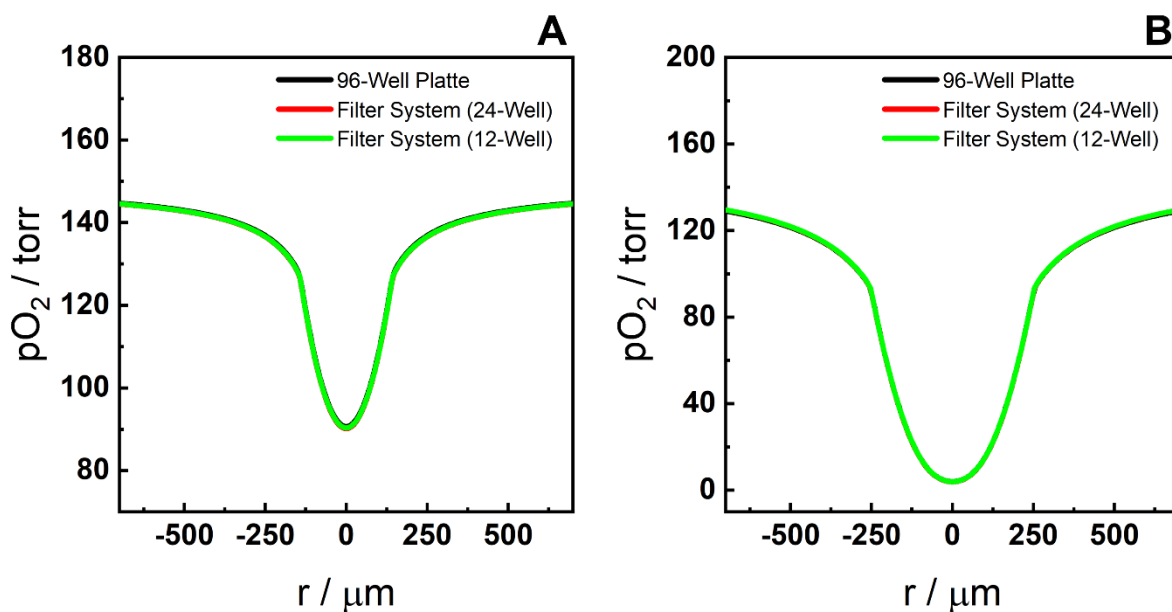


Abbildung 87: Sauerstoffprofile adhärenente U373 Sphäroide mit Aussaatdichten von 6k Zellen/Well (**A**) und 30k Zellen/Well (**B**) unter Berücksichtigung verschiedener Multiwellformate (96-Well, 24-Well Filtersystem und 12-Well Filtersystem) mit gleichen Volumina ($200 \mu\text{L}$) im apikalen Kompartiment. Während die Zellen in der Messanordnung mit 96-Well direkt auf dem Sensor adhären, erfolgt die Adhäsion bei den Systemen mit den permeablen Kultursubstraten auf der Membran. $T = 37^\circ\text{C}$.

Trotz dem wesentlichen Unterschied, dass die Zellen in der 96-Well Platte direkt auf dem Sensor adhären, während die Adhäsion bei den Systemen mit permeablen

Kultursubstraten auf der Membran (Porosität: 0,141; effektiver Diffusionskoeffizient (O_2): $4,67 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) erfolgt, stimmen die lateralen pO_2 Gradienten in **Abbildung 87** für jede Aussaatdichte (**A**: 6k Zellen/Well; **B**: 30k Zellen/Well) und jedes der Systeme überein. Somit wird die Sauerstoffverteilung maßgeblich durch die Porosität der Filtermembran beeinflusst, nicht aber durch die verwendeten Systeme.

6.4.2 Einfluss der Distanz zwischen Sphäroid und Sensorfolie

Die Ergebnisse in **Kapitel 5.2.1** und **5.2.2** zeigen, dass bei einer traditionellen Anwendung der Membraneinsätze der Abstand zwischen dem Sensor und den auf der Membran kultivierten Zellen variiert. Dies liegt im strukturellen Design begründet. So besitzen permeable Kultursubstrate von Corning eine Distanz von 300 μm , während diejenige von cellQART®-Membraneinsätzen (Sabeu) bei 1000 μm liegt. Im Folgenden werden die Einflüsse der Distanz zwischen dem Sphäroid und dem Sensor exemplarisch unter Annahme eines Transwell®-Membraneinsatzes mit der höchsten Porosität (Porosität: 0,141; effektiver Diffusionskoeffizient (O_2): $4,7 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) modelliert. Die Ergebnisse für adhärenente Sphäroide mit einer Aussaatdichte von 6k Zellen/Well sind in **Abbildung 88** gezeigt und die für 30k Zellen/Well (t_0) in **Abbildung 89**. Unabhängig von der Größe des Sphäroids unterscheiden sich die Sauerstoffprofile im Gewebe (—) und im Sensor (—) mit zunehmender Distanz voneinander. Für den Fall, dass kein Abstand (**A**) zwischen dem Gewebe auf dem Kultursubstrat und der Sauerstoff-sensitiven Sensorfolie besteht, stimmen die lateralen pO_2 Gradienten überein. Bei adhärenenten Sphäroiden mit 6k Zellen/Well (t_0) (siehe **Abbildung 88**) entsteht bei 300 μm (**B**) jedoch eine Differenz zwischen den zentralen pO_2 Werten beider Profile von 16,3 % (—: 120,9 torr; —: 140,6 torr) und bei 500 μm (**C**) von 17,9 % (—: 122 torr; —: 143,8 torr). Falls das Gewebe und die Sensorfolie 1000 μm voneinander entfernt sind (**D**), differieren die zentralen Sauerstoffpartialdrücke um 19,2 % (—: 122,8 torr; —: 146,4 torr). Der pO_2 im gesamten Querschnitt des Sensors nimmt hierbei konstante Werte von ungefähr 146,9 torr an und es sind keinerlei Gradienten mehr im Sensor zu erkennen. Weiterhin wird bei einem Vergleich der Sauerstoffprofile innerhalb des Zellaggregats deutlich, dass der Sauerstoffpartialdruck im Zentrum des Sphäroids mit zunehmender Distanz von 90,1 torr (**A**) auf 122,8 torr (**D**) steigt.

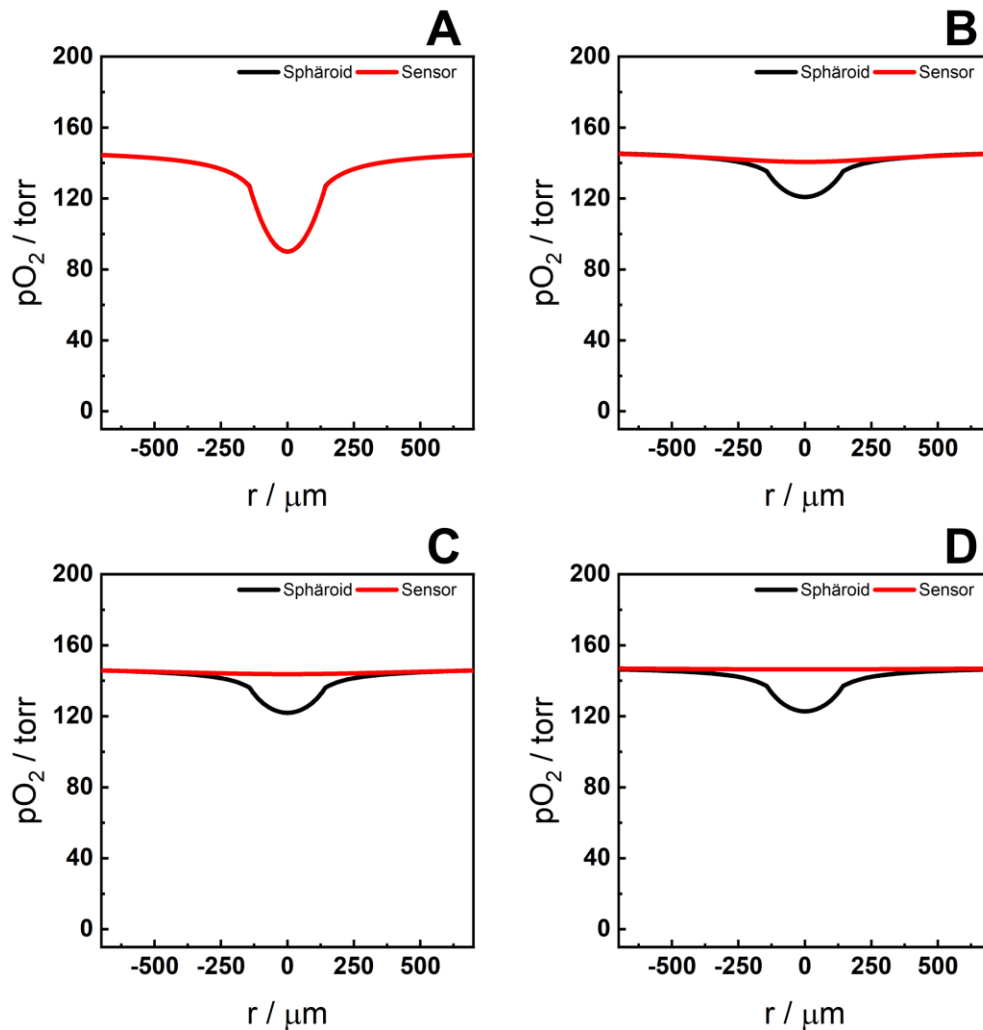


Abbildung 88: Laterale pO_2 Gradienten im Querschnitt eines adhärenen Sphäroids mit 6k Zellen/Well (—) und der Sauerstoff-sensitiven Sensorfolie (—) für variierende Abstände zwischen Sphäroid und Sensor. In (A) wurde der Transwell®-Membraneinsatz (Porosität: 0,141; effektiver Diffusionskoeffizient (O_2): $4,7 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) direkt auf der Sensoroberfläche modelliert. Die Distanzen wurden zudem systematisch von 300 μm (B) über 500 μm (C) bis hin zu 1000 μm (D) verändert. $T = 37^\circ \text{C}$.

Für Sphäroide mit einer Zellzahl von 30k Zellen/Well (t_0) wird in **Abbildung 89** ersichtlich, dass einerseits die Differenz zwischen dem pO_2 im Zentrum des Gewebes und des Sensors mit zunehmendem Abstand mit bis zu 64,2 % ausgeprägter ist. Andererseits sind die Level der Oxygenierung niedriger als bei Zellaggregaten mit kleinerer Aussaatdichte. Nichtsdestotrotz ist ein ähnlicher Trend im Anstieg der zentralen pO_2 Werte im Gewebe und im Sensor zu erkennen. Im Sphäroid nimmt der Sauerstoffpartialdruck von 75,7 torr bei 300 μm (B) über 79,9 torr bei 500 μm (C) bis hin zu 83,8 torr bei 1000 μm (D) zu. Im Sensor steigt der Sauerstoffpartialdruck

hingegen bei einer Erhöhung der Distanz von 300 μm ($p\text{O}_2 = 114,4$ torr) auf 1000 μm ($p\text{O}_2 = 137,6$ torr) um 20,2 %.

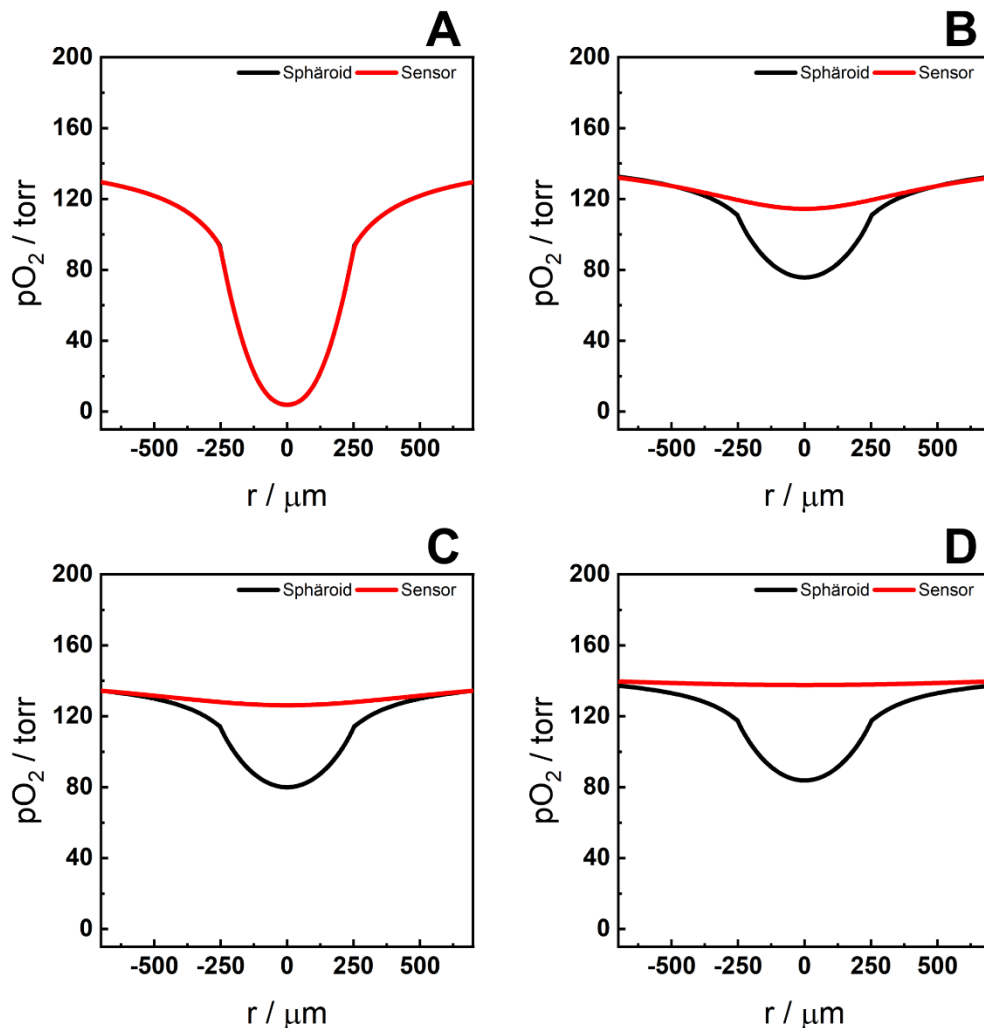


Abbildung 89: Laterale $p\text{O}_2$ Gradienten im Querschnitt eines adhärenen Sphäroids mit 30k Zellen/Well (—) und der Sauerstoff-sensitiven Sensorfolie (—) für variierende Abstände zwischen Sphäroid und Sensor. In (A) wurde der Transwell®-Membraneinsatz (Porosität: 0,141; effektiver Diffusionskoeffizient (O_2): $4,7 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) direkt auf der Sensoroberfläche modelliert. Die Distanzen wurden zudem systematisch von 300 μm (B) über 500 μm (C) bis hin zu 1000 μm (D) verändert. $T = 37^\circ \text{C}$.

Die Analysen zeigen, dass sich für die Untersuchung der Atmungsaktivität in adhärenen Sphäroiden permeable Kultursubstrate nur dahingehend eignen, wenn diese direkt auf der Sauerstoff-sensitiven Sensorfolie platziert werden. Bei deren handelsüblicher Verwendung und den damit einhergehenden Abständen zwischen dem Gewebe und dem Sensor sind die Diskrepanzen enorm. Dieses Hintergrundwissen ist essenziell für die Interpretation von *in vitro* Experimenten, bei

welchen ausgehend von der Antwort des Sensors Rückschlüsse auf die Atmungsaktivität des Zellaggregats gezogen werden.

6.4.3 Diskussion

Der Einfluss permeabler Kultursubstrate auf die Sauerstoffdiffusion und den Sauerstoffverbrauch in adhären U373 Sphäroiden ist ähnlich zu den Beobachtungen bei auf Filtern Kultivierten U373 Zellen im *Monolayer* in **Kapitel 5.2**. Infolgedessen sei auf die Diskussionspunkte in **Kapitel 5.2.5** verwiesen. Obwohl die Ergebnisse für den Sauerstoffpartialdruck bei den Sphäroiden als Funktion der Entfernung vom Zentrum des Zellaggregats dargestellt wurden und bei den Monolagen als Funktion der Zeit, wird ersichtlich, dass mit zunehmender Porosität der Membran die Unterschiede zwischen der Sensorantwort und der Sauerstoffverteilung im Gewebe kleiner werden. Die einzige Diskrepanz in den Analysenergebnissen besteht darin, dass planare Sensorfolien für 2D Zellkulturen selbst bei einem Abstand von 300 µm zwischen Gewebe und Sensor Ergebnisse liefern, welche das Gewebe noch richtig beschreiben. Bei 3D Zellkulturen ist dies allerdings, unabhängig von der Aussaatdichte, nur für den Fall gegeben, dass der Membraneinsatz direkt auf der Sensorfolie steht. Dies könnte dahingehend begründet werden, dass Letztere nur einen gewissen Flächenanteil der Membran belegen, während bei Ersterem die komplette Membran mit sauerstoffverbrauchenden Zellen bedeckt ist. Somit ist für die Sphäroide auch die Diffusion von Sauerstoff von der Seite gewährleistet, was die Oxygenierung beeinflusst. Außerdem ist die Gesamtverbrauchsrate im *Monolayer* bei einem Abstand von 300 µm mit $1,16 \text{ pmol} \cdot \text{s}^{-1}$ bedeutend größer als für die Sphäroide mit 6k Zellen/Well ($0,09 \text{ pmol} \cdot \text{s}^{-1}$) und 30k Zellen/Well ($0,4 \text{ pmol} \cdot \text{s}^{-1}$). Dies wiederum könnte, neben der Nettoanzahl an Zellen im System, im Wesentlichen durch die Bildung biologischer Zonen begründet werden und der damit einhergehenden Gradienten in der lokalen Sauerstoffverbrauchsrate, was in **Kapitel 6.2.6** eingehend diskutiert wurde.

6.5 Gesamtdiskussion

Die Kombination aus *in vitro* und *in silico* Methoden ermöglicht es, multizelluläre Sphäroide hinsichtlich verschiedener Aspekte der Oxygenierung und der Sauerstoffverbrauchsrate zu analysieren. So haben die Ergebnisse in den **Kapiteln 6.1 – 6.4** zu neuen Erkenntnissen über die Atmungsaktivität von 3D Gewebemodellen der Zelllinien MCF-7 und U373 während der Kulturzeit geführt. Es wurde ersichtlich, dass die Wachstumskinetik sowie die Sauerstoffverteilung in Tumorsphäroiden im Wesentlichen vom Zelltyp abhängig sind. Zudem werden die Prozesse durch ein komplexes Zusammenspiel folgender Faktoren beeinflusst:

- Größe
- interzelluläre Kräfte / Packungsdichte
- Bildung konzentrischer Zonen
- Konzentrationsgradienten

Die Bildung von Sphäroiden erfolgt in drei Phasen, welche je nach Zelllinie variieren: Zellaggregation, Kompaktieren und Wachstum (Amereh et al., 2021; Smyrek et al., 2019). Die initialen losen Zellaggregate werden in der ersten Phase durch Integrine vermittelt, wobei die Aggregatgröße im Wesentlichen durch die Aussaatdichte kontrolliert wird. Anschließend kompaktieren die losen Zellaggregate durch Expression von E-Cadherinen (Swami, 2014), worauf eine Wachstumsphase folgt. Während MCF-7 Sphäroide während des Untersuchungszeitraumes von sechs Tagen ein lineares Wachstumsverhalten zeigen, befinden sich diejenigen aus U373 Zellen noch in der Phase des Kompaktierens. Infolgedessen sind die Beobachtungen hinsichtlich der zeitabhängigen Atmungsaktivität unterschiedlich. Bei MCF-7 Zellen nehmen sowohl die pO_2 Level als auch die maximale volumenbezogene Sauerstoffverbrauchsrate R_{max} mit zunehmender Größe der Sphäroide ab. Dies könnte durch die Bildung biologischer Zonen sowie mit einer Zunahme der Diffusionslänge für Sauerstoff erklärt werden. Die langsamen Verdopplungszeiten des initialen Volumens der Zellaggregate mit 4k Zellen/Well und 12k Zellen/Well liefern ein erstes Indiz für Ersteres. Zudem besitzen die Sphäroide mit größeren Aussaatdichten kleine Wachstumsraten und haben nahezu einen finalen Durchmesser erreicht. Verstärkt

wird die Vermutung dadurch, dass bereits am ersten Tag der Wachstumsstudie Gradienten in der lokalen Sauerstoffverbrauchsrate vom Rand zum Zentrum hin sichtbar werden, welche sich mit fortschreitender Kulturzeit verstärken. Dies ist konsistent mit Studien in der Literatur. So korreliert der finale Durchmesser mit der Schichtdicke der proliferativen Zone (Freyer, 1988). Zudem besitzen ruhende Zellen niedrigere Sauerstoffverbrauchsraten als proliferative Zellen am Rand (Freyer & Sutherland, 1985). Die Änderungen in der Atmungsaktivität könnten zudem durch die Zunahme in der Größe und damit einer Verlängerung der Diffusionsdistanz erklärt werden. Demnach verringern Zellen innerhalb des Sphäroids je nach deren Lokalisierung ihren Sauerstoffverbrauch, um die Penetrationstiefe von Sauerstoff zum Zentrum hin zu erhöhen (Mueller-Klieser et al., 1986; Mueller-Klieser & Sutherland, 1982). Somit ist die Größe entscheidend für die metabolische Variation in MCF-7 Sphäroiden, wobei sich die Bildung biologischer Zonen und die Verfügbarkeit von Sauerstoff gegenseitig nur bedingt implizieren. Mit den Ergebnissen wird ersichtlich, dass sich der Zellzyklus und die Atmungsaktivität gegenseitig beeinflussen (Mueller-Klieser, 2000). Allerdings werden die konzentrischen Zonen nicht durch Einschränkungen im Sauerstofftransport hervorgerufen, da für Aussaatdichten mit 4k Zellen/Well und 12k Zellen/Well bei $t = 1$ d trotz der Bildung von Proliferationsgradienten, die zentralen pO_2 Level noch nicht hypoxisch waren. Dies wird durch die Studie von Sauer et al. (1998) unterstützt, in welcher eine ruhende Zone auch in kleinen Sphäroiden beobachtet wurde. Zudem liefern die *in vitro* Studien adhärenter MCF-7 Sphäroide eine Bestätigung dafür. Ab einer Aussaatdichte von 12k Zellen/Well bilden sich bei unterschiedlichen pO_2 Werten zentrale Plateauregionen, welche mit dem Entstehen von Nekrose assoziiert werden. *In silico* wurden jedoch unter Berücksichtigung der getroffenen Annahmen, insbesondere von C_{krit} , keine nekrotischen Bereiche beobachtet. Infolgedessen könnte Hypoxie nicht der einzige Grund für deren Entstehen sein. Unter Verwendung von Mikroelektroden konnte Nekrose in EMT6/Ro Sphäroiden auch bei hohen pO_2 Level nachgewiesen werden (Mueller-Klieser & Sutherland, 1983; Walenta et al., 1990). Bei U373 Sphäroiden sind die Durchmesser bei $t = 1$ d am größten und verringern sich während des Beobachtungszeitraumes. Jedoch nehmen die pO_2 Level weiter ab, R_{max} steigt und es bilden sich Gradienten in der lokalen Sauerstoffverbrauchsrate. Dadurch, dass

keine Proliferation angenommen wurde, könnten diese Beobachtungen mit der bereits angeführten Phase des Kompaktierens und der damit einhergehenden Veränderung in der Zellpackungsdichte und somit in den Zell-Zell sowie Zell-Matrix Kontakten erklärt werden. (Leung et al., 2015; Mueller-Klieser, 2000; Mueller-Klieser et al., 1986). Verwunderlich ist, dass die lateralen Gradienten im R_{O_2} trotz der größten negativen Wachstumsrate bei 30k Zellen/Well am stärksten ausgeprägt sind. Aufgrund der Größe der Aggregate bei $t = 1$ d könnte dies durch die gegenseitige Beeinflussung von Diffusionsdistanzen, Etablierung isozentrischer Zonen und Metabolismus erklärt werden.

6.6 Ausblick

Das Messsystem VisiSens TD ermöglicht im Vergleich zu anderen Techniken eine detaillierte Darstellung der räumlichen Sauerstoffverteilung. Durch die Adhäsion von multizellulären Sphäroiden auf Polymer-basierten, Sauerstoff-sensitiven Sensorfolien können die Sauerstoffgradienten unterhalb des Gewebes untersucht werden. Die Kombination der resultierenden Ergebnisse mit FEM-Analysen erlaubt ein tieferes Verständnis für die Prozesse innerhalb der dreidimensionalen Zellaggregate. Außerdem können nach der erfolgreichen Validierung des *in silico* Modells weitere Daten hinsichtlich der Sauerstoffverteilung während der Kulturzeit generiert werden oder die Modulation der oxidativen Phosphorylierung im Hinblick auf die Oxygenierung des Gewebekonstrukts untersucht werden.

Die Simulationen könnten dahingehend erweitert werden, dass in der grundlegenden Annahme nicht mehr von einem 3D-Gewebemodell ausgegangen wird, welches lediglich aus einer Zelllinie besteht, sondern Organoide modelliert werden. Eben diese imitieren ein menschliches Organ unter anderem hinsichtlich der Struktur. Somit würden unterschiedliche Sauerstoffverbrauchsdaten berücksichtigt werden und deren Auswirkungen auf die gesamte Reaktionskinetik untersucht werden können.

Aufgrund der Tatsache, dass das Phänomen der Nekrose nicht nur durch einen Mangel in der Sauerstoffzufuhr verursacht wird, sondern auch andere Faktoren, wie die Versorgung mit Glukose sowie Zell-Zell- oder Zell-Matrix Interaktionen eine Rolle spielen, können die bestehenden Modelle auch diesbezüglich optimiert werden. Folglich könnte die Komplexität des biologischen Systems tiefergehender untersucht werden. Zusätzlich würde dies *in silico* simultan erfolgen und realisiert werden können, während *in vitro* nur ein sukzessiver Ansatz möglich wäre.

7 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Computersimulationen durchgeführt, um den Sauerstoffpartialdruck pO_2 in adhärenenten Zell-*Monolayern* (2D) und in multizellulären Sphäroiden (3D) zu analysieren sowie deren Atmungsaktivitäten zu quantifizieren. Sämtliche *in silico* Modelle wurden mit der kommerziellen Simulationssoftware COMSOL Multiphysics® entwickelt und basieren auf der Annahme, dass die Sauerstoffverteilung in Zellen sowie im Gewebe über das Gleichgewicht aus Sauerstoffdiffusion und Sauerstoffverbrauch bestimmt ist. Infolgedessen wurden Fick'sche Diffusionsprozesse und eine Reaktionskinetik nach Michaelis-Menten in dem Modell implementiert.

Sowohl bei der Untersuchung von 2D als auch von 3D Gewebemodellen wurde das zugrundeliegende *in silico* Modell zunächst mit empirischen Daten, bei welchen Sauerstoff-sensitive Sensorfolien als Kultursubstrat dienen, validiert. Davon ausgehend wurden verschiedene Einflussfaktoren untersucht, welche die Atmungsaktivität adhärenenten Zellen im *Monolayer* beeinflussen, wie die Zelldichte, der Zelltyp und die Höhe der Flüssigkeitssäule. Zudem war es möglich, die Sauerstoffverteilung in Sphäroiden unterschiedlicher Zelllinien und Aussaatdichten vor der Adhäsion auf Sauerstoff-sensitiven Sensorfolien und während der Kulturzeit zu analysieren. Die Rechnungen ergaben, dass die lateralen Sauerstoffgradienten aus der ratiometrischen Sauerstoffmessung im Wesentlichen durch die Respiration der Zellen während der Kulturzeit verursacht werden und weniger durch den Adhäsionsprozess an ein wenig O_2 -permeables Substrat. Außerdem wurde deutlich, dass morphologische Veränderungen von einer perfekten Kugel zu hemi-ellipsoiden Strukturen wesentlich für die beobachteten Diskrepanzen zwischen den Sauerstoffprofilen adhärenenten Sphäroide und denjenigen in Suspension sind. Ein Vergleich des Wachstums von multizellulären Zellaggregaten der Zelllinie MCF-7 mit dem Proliferationsverhalten adhärenenten MCF-7 Zellen im *Monolayer* (2D) lieferte ein Indiz für die Bildung biologischer Zonen in Sphäroiden, da die Verdopplungszeiten beider Gewebemodelle differierten. In weiteren Simulationen wurde die chemische Modulation der oxidativen Phosphorylierung in 3D Zellaggregaten erfolgreich

nachgestellt, indem ein Stopp der Veratmung, wie es durch Atmungsketten-Blocker erzielt wird, simuliert wurde.

Darüber hinaus konnten die Prozesse der Sauerstoffdiffusion und des Sauerstoffverbrauchs von Zellmonolagen und adhärenen Sphäroiden auf permeablen Kultursubstraten analysiert werden. Im Rahmen der Simulationen wurde nachgewiesen, dass sowohl die Porosität der Filtermembranen als auch die Distanz zwischen den Gewebemodellen auf dem permeablen Kultursubstrat und dem Sensor am Boden des Wells die Sauerstoffverteilung zusätzlich beeinflussen. Für vertrauenswürdige Messergebnisse bei Zellmonolagen sollte demnach stets eine Filtermembran mit hoher Porosität verwendet werden und der Zell-zu-Sensor Abstand sollte 300 µm nicht übersteigen. Bei 3D Gewebemodellen zeigten die Analysen, dass sich permeable Kultursubstrate nur dann eignen, wenn diese direkt auf der Sauerstoff-sensitiven Sensorfolie platziert werden. Bei größeren Abständen zwischen dem Sensor und dem 3D Gewebe weichen die Sauerstoffprofile im Sensor und im Zellaggregat signifikant voneinander ab.

8 Summary

In the present work, computer simulations were performed for analyzing the oxygen partial pressure pO_2 in adherent cell monolayers (2D) and in multicellular spheroids (3D) in order to quantify their respiratory activity. All *in silico* models were developed with the commercial simulation software COMSOL Multiphysics® and are based on the assumption that the oxygen distribution in cells as well as in tissues is determined by the equilibrium of oxygen diffusion and oxygen consumption. Consequently, Fick's diffusion processes and Michaelis-Menten reaction kinetics were the key components of the models.

For 2D and 3D tissue models the underlying *in silico* models were first validated with empirical data using oxygen-sensitive sensor foils, which served as culture substrate. For adherent cells grown in a monolayer (2D) various aspects that influence the respiratory activity of cells were investigated *in silico*, such as cell density, cell type and the height of the liquid column of the cell culture medium. Furthermore, the oxygen distribution in spheroids (3D) of different cell lines and seeding densities was analyzed in suspension and during the culture period of six days. It was demonstrated that the lateral oxygen gradients from the ratiometric oxygen measurements are mainly caused by the respiration of the cells along the culture period and less by the adhesion process to a less oxygen permeable culture substrate. Moreover, it became clear that morphological changes of the 3D tissue model from a perfect sphere to hemi-ellipsoidal structures are essential for the observed discrepancies between the oxygen profiles of adherent and suspended spheroids. A comparison of the growth of multicellular cell aggregates of the cell line MCF-7 with the proliferation behavior of adherent MCF-7 cells in 2D provided an indication for the formation of biological zones in spheroids, as the doubling times of both tissue models differed. Further simulations were conducted analyzing chemical modulation of oxidative phosphorylation in 3D cell aggregates by modelling a stop of respiration as achieved by respiratory chain blockers.

Additionally, the processes of oxygen diffusion and oxygen consumption by cell monolayers (2D) and adherent spheroids (3D) on permeable culture substrates were analyzed. These simulations demonstrated that the porosity of the filter membranes as

well as the distance between the tissue models on the permeable culture substrate and the sensor at the bottom of the well significantly influenced oxygen distribution. In order to achieve reliable measurement results in cell monolayers, a filter membrane with a high porosity and a cell-to-sensor distance of $\leq 300\text{ }\mu\text{m}$ should be used. For 3D tissue models, the analyses showed that permeable culture substrates are suitable if they are placed directly on top of the oxygen-sensitive sensor foil, since larger gaps between the sensor and the 3D tissue resulted in an insensitive sensor response.

9 Literaturverzeichnis

- Adejolu, M., Huo, L., Rohren, R., Santiago, L. & Yang, W. T. (2012). False-positive lesions mimicking breast cancer on FDG PET and PET/CT. *American Journal of Roentgenology*, 198(3), W303-314.
- Aghamiri, S., Jafarpour, A., Zandsalimi, F., Aghemiri, M. & Shoja, M. (2019). Effect of resveratrol on the radiosensitivity of 5-FU in human breast cancer MCF-7 cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(9), 15671–15677.
- Ahmed, T. (2023). Functional biomaterials for biomimetic 3D in vitro tumor microenvironment modeling. *In vitro models*.
- Al-Ani, A., Toms, D., Kondro, D., Thundathil, J., Yu, Y. & Ungrin, M. (2018). Oxygenation in cell culture: Critical parameters for reproducibility are routinely not reported. *PLoS ONE*, 13(10), e0204269.
- Alemaný-Ribes, M. & Semino, C. E. (2014). Bioengineering 3D environments for cancer models. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 79-80, 40–49.
- Alfarouk, K. O., Verduzco, D., Rauch, C., Muddathir, A. K., Adil, H. H., Elhassan, G. O., Ibrahim, M. E., David Polo Orozco, J., Cardone, R. A., Reshkin, S. J. & Harguindey, S. (2014). Glycolysis, tumor metabolism, cancer growth and dissemination. A new pH-based etiopathogenic perspective and therapeutic approach to an old cancer question. *Oncoscience*, 1(12), 777–802.
- Amereh, M., Edwards, R., Akbari, M. & Nadler, B. (2021). In-Silico Modeling of Tumor Spheroid Formation and Growth. *Micromachines (Basel)*, 12(7), 749.
- Anderson, C. D. (1932). The Apparent Existence of Easily deflectable Positives. *Science*, 76(1967), 238–239.
- Anundi, I. & de Groot, H. (1989). Hypoxic liver cell death: critical Po₂ and dependence of viability on glycolysis. *The American Journal of Physiology*, 257(1 Pt 1), G58-64.

- Anwer, S. & Szaszi, K. (2020). Measuring Cell Growth and Junction Development in Epithelial Cells Using Electric Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS). *bio-protocol*, 10(16), e3729. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3729>
- Asenbaum, S. (2011). Positronenemissionstomographie (PET) in der Neurologie. In J. Lehrner, G. Pusswald, E. Fertl, W. Strubreither & I. Kryspin-Exner (Hrsg.), *Klinische Neuropsychologie: Grundlagen-Diagnostik-Rehabilitation* (2. Aufl., S. 265–273). Springer-Verlag.
- Astolfi, M., Péant, B., Lateef, M. A., Rousset, N., Kendall-Dupont, J., Carmona, E., Monet, F., Saad, F., Provencher, D., Mes-Masson, A. M. & Gervais, T. (2016). Micro-dissected tumor tissues on chip: an ex vivo method for drug testing and personalized therapy. *Lab Chip*, 16(2), 312–325.
- Avgoustiniatos, E. S. & Colton, C. K. (2006). Effect of External Oxygen Mass Transfer Resistances on Viability of Immunoisolated Tissue. *Annals of the New York Academy of Science*, 831(1), 145–166.
- Azizgolshani, H., Coppeta, J. R., Vedula, E. M., Marr, E. E., Cain, B. P., Luu, R. J., Lech, M. P., Kann, S. H., Mulhern, T. J., Tandon, V., Tan, K., Haroutunian, N. J., Keegan, P., Rogers, M., Gard, A. L., Baldwin, K. B., de Souza, J. C., Hoefler, B. C., Bale, S. S., . . . Charest, J. L. (2021). High-throughput organ-on-chip platform with integrated programmable fluid flow and real-time sensing for complex tissue models in drug development workflows. *Royal Society of Chemistry*, 21(8), 1454–1474.
- Babilas, P., Liebsch, G., Schacht, V., Klimant, I., Wolfbeis, O. S., Szeimies, R. M. & Abels, C. (2005). In vivo phosphorescence imaging of pO₂ using planar oxygen sensors. *Microcirculation*, 12(6), 477–487.
- Bacevic, K., Noble, R., Soffar, A., Wael Ammar, O., Boszonyik, B., Prieto, S., Vincent, C., Hochberg, M. E., Krasinska, L. & Fisher, D. (2017). Spatial competition constrains resistance to targeted cancer therapy. *nature communications*, 8(1), 1995.

- Bagshaw, O. R. M., De Lange, M., Renda, M., Valente, A. J. F. & Stuart, J. (2019). Hypoxio: a simple solution to preventing pericellular hypoxia in cell monolayers growing at physiological oxygen levels. *Cytotechnology*, 71, 873–879.
- Ballangrud, A. M., Yang, W.-H., Dnistrian, A., Lampen, N. M. & Sgouros, G. (1999). Growth and Characterization of LNCaP Prostate Cancer Cell Spheroids. *Clinical Cancer Research*, 5(10), 3171s-3176s.
- Barnes, D. & Sato, G. (1979). Growth of a human mammary tumour cell line in a serum-free medium. *Nature*, 281(5730), 388–389.
- Bartolini, L., Malferrari, M., Lugli, F., Zerbetto, F., Paolucci, F., Pelicci, P. G., Albonetti, C. & Rapiano, S. (2018). Interaction of Single Cells with 2D Organic Monolayers: A Scanning Electrochemical Microscopy Study. *ChemElectroChem*, 5(20), 2975–2981.
- Bartrons, R. & Caro, J. (2007). Hypoxia, glucose metabolism and the Warburg's effect. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 39(3), 223–229.
- Bauser, M. & Lehmann, L. (2012). Positronen-Emissions-Tomographie. *Chemie in unserer Zeit*, 46(2), 80–99.
- Bell, H. S., Whittle, I. R., Walker, M., Leaver, H. A. & Wharton, S. B. (2001). The development of necrosis and apoptosis in glioma: experimental findings using spheroid culture systems. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 27, 291–304.
- Berg, H. C. (2018). *Random Walks in Biology*. Princeton University Press.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Gatto jr., G. J. & Styrrer, L. (2018). *Styrrer Biochemie* (8. Aufl.). Springer-Verlag GmbH.
- Bigner, D. D., Bigner, S. H., Pontén, J., Westermarck, B., Mahaley, M. S., Ruoslahti, E., Herschman, H., Eng, L. F. & Wikstrand, C. J. (1981). Heterogeneity of Genotypic and phenotypic characteristics of fifteen permanent cell lines derived from human gliomas. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 40(3), 201–229.

- Blache, U. & Ehrbar, M. (2020). Synthetische Hydrogele als 3D-Matrix für definierte Gewebemodelle. *Biospektrum*, 26, 398–401.
- Blanquer-Rosselló, M. M., Santandreu, F. M., Oliver, J., Roca, P. & Valle, A. (2015). Leptin Modulates Mitochondrial Function, Dynamics and Biogenesis in MCF-7 Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 116(9), 2039–2048.
- Boehm-Sturm, P., Mueller, S., Freitag, N., Borowski, S., Foddiss, M., Koch, S. P., Temme, S., Flögel, U. & Blois, S. M. (2021). Phenotyping placental oxygenation in Lgals1 deficient mice using 19F MRI. *Scientific Reports UK*, 11(1), 2126.
- Bommer, W. (1952). Das Phasenkontrastmikroskop in medizinischer Forschung und Diagnostik. *Klinische Wochenschrift*, 30(25/26), 577–583.
- Bösch, D. & Criée, C.-P. (2013). *Lungenfunktionsprüfung*. Springer-Verlag.
- Brahimi-Horn, M. C. & Pouysségur, J. (2007). Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Letters*, 581(19), 3582–3591.
- Braun, R. D. & Beatty, A. L. (2007). Modeling of oxygen transport across tumor multicellular layers. *Microvascular Research*, 73(2), 113–123.
- Bredel-Geissler, A., Karbach, U., Walenta, S., Vollrath, L. & Mueller-Klieser, W. (1992). Proliferation-Associated Oxygen Consumption and Morphology of Tumor Cells in Monolayer and Spheroid Culture. *Journal of Cellular Physiology*, 153(1), 44–52.
- Breslin, S. & O'Driscoll, L. (2013). Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 18(5-6), 240–249.
- Brischwein, M. & Wiest, J. (2018). Microphysiometry. In J. Wegener (Hrsg.), *Label-Free Monitoring of Cells in vitro* (S. 163–188). Springer International Publishing.
- Bull, J. A., Mech, F., Quaiser, T., Waters, S. L. & Byrne, H. M. (2020). Mathematical modelling reveals cellular dynamics within tumour spheroids. *PLOS Computational Biology*, 16(8), e1007961.
- Bundesinstitut für Risikobewertung. (2022). *Verwendung von Versuchstieren im Jahr 2021*. https://www.bf3r.de/de/verwendung_von_versuchstieren_im_jahr_2021-309160.html

- Byrne, H. & Drasdo, D. (2009). Individual-based and continuum models of growing cell populations: a comparison. *Journal of Mathematical Biology*, 58(4-5), 657–687.
- Calori, I. R., Alves, S. R., Bi, H. & Tedesco, A. C. (2022). Type-I Collagen/Collagenase Modulates the 3D Structure and Behavior of Glioblastoma Spheroid Models. *ACS Applied Bio Materials*, 5(2), 723–733.
- Campioni, G., Pasquale, V., Busti, S., Ducci, G., Sacco, E. & Vanoni, M. (2022). An Optimized Workflow for the Analysis of Metabolic Fluxes in Cancer Spheroids Using Seahorse Technology. *Cells*, 11(5), 866.
- Carlsson, J. (1977). A proliferation gradient in three-dimensional colonies of cultured human glioma cells. *International Journal of Cancer*, 20(1), 129–136.
- Carrasco-Mantis, A., Alarcón, T. & Sanz-Herrera, J. A. (2023). An in silico study on the influence of extracellular matrix mechanics on vasculogenesis. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 231(1), 107369.
- Carrasco-Mantis, A., Randelovic, T., Castro-Abril, H., Ochoa, I., Doblaré, M. & Sanz-Herrera, J. A. (2023). A mechanobiological model for tumor spheroid evolution with application to glioblastoma: A continuum multiphysics approach. *Computers in Biology and Medicine*, 159(1), 106897.
- Carreau, A., El Hafny-Rahbi, B., Matejuk, A., Grillon, C. & Kieda, C. (2011). Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15(6), 1239–1253.
- Casciari, J. J., Sotirchos, S. V. & Sutherland, R. M. (1992a). Mathematical modelling of microenvironment and growth in EMT6/Ro multicellular tumour spheroids. *Cell Proliferation*, 25(1), 1–22.
- Casciari, J. J., Sotirchos, S. V. & Sutherland, R. M. (1992b). Variations in Tumor Cell Growth Rates and Metabolism With Oxygen Concentration, Glucose Concentration, and Extracellular pH. *Journal of Cellular Physiology*, 151(2), 386–394.

- Chandel, N. S., Budinger, G. R. & Schumacker, P. T. (1996). Molecular Oxygen Modulates Cytochrome c Oxidase Function. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(31), 18672–18677.
- Chaouki, W., Leger, D. Y., Liagre, B., Beneytout, J.-L. & Hmamouchi, M. (2009). Citral inhibits cell proliferation and induces apoptosis and cell cycle arrest in MCF-7 cells. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 23(5), 549–556.
- Chen, N.-T., Barth, E. D., Lee, T.-H., Chen, C.-T., Epel, B., Halpern, H. J. & Lo, L.-W. (2019). Highly sensitive electron paramagnetic resonance nanoradicals for quantitative intracellular tumor oxymetric images. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 2963–2971.
- Chignola, R., Forini, R., Franceschi, A., Pasti, M., Candiani, C., Anselmi, C., Fracasso, F., Tridente, G. & Colombatti, M. (1995). Heterogeneous response of individual multicellular tumour spheroids to immunotoxins and ricin toxin. *British Journal of Cancer*, 72(3), 607–614.
- Chow, D. C., Wenning, L. A., Miller, W. M. & Papoutsakis, E. T. (2001). Modeling pO₂ Distributions in the Bone Marrow Hematopoietic Compartment. I. Krogh's Model. *Biophysical Journal*, 81(2), 675–684.
- Christen, P., Jaussi, R. & Benoit, R. (2016). *Biochemie und Molekularbiologie*. Springer Spektrum.
- Christen, T., Bolar, D. S. & Zaharchuk, G. (2013). Imaging brain oxygenation with MRI using blood oxygenation approaches: methods, validation, and clinical applications. *American Journal of Neuroradiology*, 34(6), 1113–1123.
- Clark, L. C., Wolf, R., Granger, D. & Taylor, Z. (1953). Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. *Journal of Applied Physiology*, 6(3), 189–193.
- Codling, E. A., Plank, M. J. & Benhamou, S. (2008). Random walk models in biology. *Journal of the Royal Society, Interface*, 5(25), 813–834.
- Comşa, Ş., Cîmpean, A. M. & Raica, M. (2015). The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Research*, 35(6), 3147–3154.

- COMSOL. (1998-2022). *Chemical Reaction Engineering Module: User's Guide*.
- Costa, E. C., Moreira, A. F., de Melo-Diogo, D., Gaspar, V. M., Carvalho, M. P. & Correia, I. J. (2016). 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnology Advances*, 34(8), 1427–1441.
- Costăchel, O., Fadei, L. & Badea, E. (1969). Tumor cell suspension culture on non adhesive substratum. *Zeitschrift für Krebsforschung*, 72, 24–31.
- Cui, X., Hartanto, Y. & Zhang, H. (2017). Advances in multicellular spheroid formation. *Journal of the Royal Society, Interface*, 14(127), 20160877.
- Curcio, E., Salerno, S., Barbieri, G., De Bartolo, L., Drioli, E. & Bader, A. (2007). Mass transfer and metabolic reactions in hepatocyte spheroids cultured in rotating wall gas-permeable membrane system. *Biomaterials*, 28(36), 5487–5497.
- de Langen, A. J., Lubberink, M., Boellaard, R., Spreeuwenberg, M. D., Smit, E. F., Hoekstra, O. S. & Lammertsma, A. A. (2008). Reproducibility of tumor perfusion measurements using ¹⁵O-labeled water and PET. *Journal Of Nuclear Medicine*, 49(11), 1763–1768.
- Deisboeck, T. S., Wang, Z., Macklin, P. & Cristini, V. (2011). Multiscale cancer modeling. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 13, 127–155.
- Deng, M., Qiao, Y., Liu, C., Wang, Z., Shi, J., Pan, T., Mao, Y., Mei, Z., Huang, F. & Tian, Y. (2019). Tricolor core/shell polymeric ratiometric nanosensors for intracellular glucose and oxygen dual sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 286(2), 437–444.
- Dewhirst, M. W., Klitzman, B., Braun, R. D., Brizel, D. M., Haroon, Z. A. & Secomb, T. W. (2000). Review of methods used to study oxygen transport at the microcirculatory level. *International Journal of Cancer*, 90(5), 237–255.
- Dirheimer, L., Pons, T., Marchal, F. & Bezdetnaya, L. (2022). Quantum Dots Mediated Imaging and Phototherapy in Cancer Spheroid Models: State of the Art and Perspectives. *Pharmaceutics*, 14(10), 2136.

- Dmitriev, R. I., Borisov, S. M., Kondrashina, A. V., Pakan, J. M., Anilkumar, U., Prehn, J. H., Zhdanov, A. V., McDermott, K. W., Klimant, I. & Papkovsky, D. B. (2015). Imaging oxygen in neural cell and tissue models by means of anionic cell-permeable phosphorescent nanoparticles. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(2), 367–381.
- Dmitriev, R. I., Kondrashina, A. V., Koren, K., Klimant, I., Zhdanov, A. V., Pakan, J. M. P., McDermott, K. W. & Papkovsky, D. B. (2014). Small molecule phosphorescent probes for O₂ imaging in 3D tissue models. *Biomaterials Science*, 2(6), 853–866.
- Dmitriev, R. I. & Papkovsky, D. B. (2012). Optical probes and techniques for O₂ measurement in live cells and tissue. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69, 2025–2039.
- Dokos, S. (2017). *Modelling Organs, Tissues, Cells and Devices: Using MATLAB and COMSOL Multiphysics*. Springer-Verlag GmbH.
- Droop, R., Ehrmanntraut, D., Otte, E. & Denz, C. (2022). Licht in Form gebracht: Strukturiertes Licht – von Kaustiken zu Lichtknoten. *Physik in unserer Zeit*, 53(6), 281–288.
- Dunn, J. F., O'Hara, J. A., Zaim-Wadghiri, Y., Lei, H., Meyerand, M. E., Grinberg, O. Y., Hou, H., Hoopes, P. J., Demidenko, E. & Swartz, H. M. (2002). Changes in oxygenation of intracranial tumors with carbogen: a BOLD MRI and EPR oximetry study. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 16(5), 511–521.
- Elas, M., Magwood, J. M., Butler, B., Li, C., Wardak, R., DeVries, R., Barth, E. D., Epel, B., Rubinstein, S., Pelizzari, C. A., Weichselbaum, R. R. & Halpern, H. J. (2014). EPR Oxygen Images Predict Tumor Control by a 50% Tumor Control Radiation Dose. *Cancer Research*, 74(6), 1881.
- Ende, D. & Mangold, K. M. (1993). Impedanzspektroskopie. *Chemie in unserer Zeit*, 27(3), 134–140.
- Erecińska, M. & Silver, I. A. (2001). Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia. *Respiration Physiology*, 128(3), 263–276.

- Fahrmeir, L., Künstler, R., Pigeot, I. & Tutz, G. (2016). *Statistik: Der Weg zur Datenanalyse* (8. Aufl.). Springer.
- Falcucci, T., Presley, K. F., Choi, J., Fitzpatrick, V., Barry, J., Sahoo, J. K., Ly, J. T., Grusenmeyer, T. A., Dalton, M. J. & Kalpan, D. (2022). Degradable Silk-Based Subcutaneous Oxygen Sensors. *Advanced Functional Materials*, 32(27).
- Fang, G., Chen, Y.-C., Lu, H. & Jin, D. (2023). Advances in Spheroids and Organoids on a Chip. *Advanced Functional Materials*.
- Fatehullah, A., Tan, S. H. & Barker, N. (2016). Organoids as an in vitro model of human development and disease. *Nature Cell Biology*, 18(3), 246–254.
- Fleischaker, R. J. & Sinskey, A. J. (1981). Oxygen Demand and Supply in Cell Culture. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 12, 193–197.
- Foty, R. (2011). A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids. *Journal of Visualized Experiments*, 51, 2720.
- Franssen, L. C., Lorenzi, T., Burgess, A. E. F. & Chaplain, M. A. (2019). Mathematical Framework for Modelling the Metastatic Spread of Cancer. *Bullet of Mathematical Biology*, 81(6), 1965–2010.
- Freyer, J. P. (1988). Role of necrosis in regulating the growth saturation of multicellular spheroids. *Cancer Research*, 48(9), 2432–2439.
- Freyer, J. P. & Sutherland, R. M. (1980). Selective Dissociation and Characterization of Cells from Different Regions of Multicell Tumor Spheroids. *Cancer Research*, 40(11), 3956–3965.
- Freyer, J. P. & Sutherland, R. M. (1985). A reduction in the in situ rates of oxygen and glucose consumption of cells in EMT6/Ro spheroids during growth. *Journal of Cellular Physiology*, 124(3), 516–524.
- Freyer, J. P. & Sutherland, R. M. (1986). Regulation of growth saturation and development of necrosis in EMT6/Ro multicellular spheroids by the glucose and oxygen supply. *Cancer Research*, 46(7), 3504–3512.

- Gallez, B., Baudelet, C. & Jordan, B. F. (2004). Assessment of tumor oxygenation by electron paramagnetic resonance: principles and applications. *NMR Biomedicine*, 17(5), 240–262.
- Gao, Y. & Ogilby, P. R. (1995). Activation barriers for oxygen diffusion in polystyrene and polycarbonate glasses: effects of codissolved argon, helium, and nitrogen. *Canadian Journal of Chemistry*, 73(11), 1831–1840.
- Gatenby, R. A. & Gillies, R. J. (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature Reviews Cancer*, 4(11), 891–899.
- Gest, C., Joimel, U., Huang, L., Pritchard, L. L., Petit, A., Dulong, C., Buquet, C., Hu, C. Q., Mirshahi, P., Laurent M., M., Fauvel-Lafève, F., Cazin, L., Vannier, J., Lu, H., Soria, J., Li, H., Varin, R. & Soria, C. (2013). Rac3 induces a molecular pathway triggering breast cancer cell aggressiveness: differences in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines. *BMC Cancer*, 13(63), 1471–2407.
- Giaever, I. & Keese, C. R. (1984). Monitoring fibroblast behavior in tissue culture with an applied electric field. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(12), 3761–3764.
- Giaever, I. & Keese, C. R. (1991). Micromotion of mammalian cells measured electrically. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(17), 7896–7900.
- Goering, H., Roos, H. G. & Tobiska, L. (2010). *Die Finite-Elemente-Methode für Anfänger* (4. Aufl.). WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KG.
- Gong, X., Lin, C., Cheng, J., Su, J., Zhao, H., Liu, T., Wen, X. & Zhao, P. (2015). Generation of Multicellular Tumor Spheroids with Microwell-Based Agarose Scaffolds for Drug Testing. *PLoS ONE*, 10(6), e0130348. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130348>
- Greenspan, H. P. (1972). Models for the Growth of a Solid Tumor by Diffusion. *Studies in Applied Mathematics*, 51, 317–340.

- Grimes, D. R. & Currell, F. J. (2018). Oxygen diffusion in ellipsoidal tumour spheroids. *Journal of the Royal Society, Interface*, 15(145), 20180256.
- Grimes, D. R., Fletcher, A. G. & Partridge, M. (2014). Oxygen consumption dynamics in steady-state tumour models. *Royal Society open science*, 1(1), 140080.
- Grimes, D. R., Kannan, P., McIntyre, A., Kavanagh, A., Siddiky, A., Wigfield, S., Harris, A. L. & Partridge, M. (2016). The role of oxygen in avascular tumor growth. *PLoS ONE*, 11(4), e0153692. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153692>
- Grimes, D. R., Kelly, C., Block, K. & Partridge, M. (2014). A method for estimating the oxygen consumption rate in multicellular tumour spheroids. *Journal of the Royal Society, Interface*, 11(92), 20131124.
- Grimnes, S. & Martinsen, O. G. (2000). *Bioimpedance and bioelectricity basics*. Academic Press.
- Groebe, K. & Mueller-Klieser, W. (1991). Distributions of oxygen, nutrient, and metabolic waste concentrations in multicellular spheroids and their dependence on spheroid parameters. *European Biophysics Journal*, 19(4), 169–181.
- Grosh, D., Wulftange, W. J., Robey, R. W., Pohida, T. J., Morgan, N. Y. & Gottesman, M. M. (2020). Grosh, D., Wulftange, W.J., Robey, R.W., Pohida, T.J., Morgan, N.Y., & Gottesman, M.M. (2020). Understanding the impact of controlled oxygen delivery to 3D cancer cell culture. *Biomaterials for 3D Tumor Modeling*, 661–696.
- Grote, J., Süsskind, R. & Vaupel, P. (1977). Oxygen diffusivity in tumor tissue (DS-carcinosarcoma) under temperature conditions within the range of 20–40 degrees. *Pflügers Archiv*, 372(1), 37–42.
- Guarino, R. D., Dike, L. E., Haq, T. A., Rowley, J. A., Pitner, J. B. & Timmins, M. R. (2004). Method for determining oxygen consumption rates of static cultures from microplate measurements of pericellular dissolved oxygen concentration. *Biotechnology and Bioengineering*, 86(7), 775–787.

- Gunti, S., Hoke, A. T. K., Vu, K. P. & London, N. R. (2021). Organoid and Spheroid Tumor Models: Techniques and Applications. *Cancers (Basel)*, 13(4), 874.
- Haji-Karim, M. & Carlsson, J. (1978). Proliferation and viability in cellular spheroids of human origin. *Cancer Research*, 38(5), 1457–1464.
- Harmjanz, F. (2021). *Biochemie- Energiestoffwechsel* (1. Aufl.). Springer-Verlag GmbH.
- Hatherell, K., Couraud, P. O., Romero, I. A., Weksler, B. & Pilkington, G. J. (2011). Development of a three-dimensional, all-human in vitro model of the blood-brain barrier using mono-, co-, and tri-cultivation Transwell models. *Journal of neuroscience methods*, 199(2), 223–229.
- Henry-Vitrac, C., Desmoulière, A., Girard, D., Mérillon, J. M. & Krisa, S. (2006). Transport, deglycosylation, and metabolism of trans-piceid by small intestinal epithelial cells. *European Journal of Nutrition*, 45(7), 376–382.
- Hilgers, A. R., Conradi, R. A. & Burton, P. S. (1990). Caco-2 Cell Monolayers as a Model for Drug Transport Across the Intestinal Mucosa. *Pharmaceutical Research*, 7(9), 902–910.
- Hino, A., Imahori, Y., Tenjin, H., Mizukawa, N., Ueda, S., Hirakawa, K. & Nakahashi, H. (1990). Metabolic and hemodynamic aspects of peritumoral low-density areas in human brain tumor. *Neurosurgery*, 26(4), 615–621.
- Hirschhaeuser, F., Menne, H., Dittfeld, C., West, J., Mueller-Klieser, W. & Kunz-Schughart, L. A. (2010). Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *Journal of Biotechnology*, 148(1), 3–15.
- Hoarau-Véchet, J., Rafii, A., Touboul, C. & Pasquier, J. (2018). Halfway between 2D and Animal Models: Are 3D Cultures the Ideal Tool to Study Cancer-Microenvironment Interactions? *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 181.
- Hofer, T., Wenger, R. & Gassmann, M. (2002). Oxygen sensing, HIF-1 α stabilization and potential therapeutic strategies. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 443, 503-507.

- Hong, J., Kandasamy, K., Marimuthu, M., Choi, C. S. & Kim, S. (2011). Electrical cell-substrate impedance sensing as a non-invasive tool for cancer cell study. *Royal Society of Chemistry*, 136(2), 237–245.
- Hou, H., Grinberg, O. Y., Taie, S., Leichtweis, S., Miyake, M., Grinberg, S., Xie, H., Csete, M. & Swartz, H. M. (2003). Electron paramagnetic resonance assessment of brain tissue oxygen tension in anesthetized rats. *Anesthesia and Analgesia*, 96(5), 1467–1472.
- Hupf, C. (2017). *Impedance-based analysis of 3D tissue models: A novel measurement setup for novel measurement modes* [Dissertation]. Universität Regensburg, Regensburg.
- Jorjani, P. & Ozturk, S. S. (1999). Effects of cell density and temperature on oxygen consumption rate for different mammalian cell lines. *Biotechnology and Bioengineering*, 64(3), 349–356.
- Joseph, J. S., Malindisa, S. T. & Ntwasa, M. (2018). Two-Dimensional (2D) and Three-Dimensional (3D) Cell Culturing in Drug Discovery. In R. A. Mehanna (Hrsg.), *Cell Culture* (S. 21–42). IntechOpen.
- Kadayakkara, D. K., Janjic, J. M., Pusateri, L. K., Young, W. B. & Ahrens, E. T. (2010). In vivo observation of intracellular oximetry in perfluorocarbon-labeled glioma cells and chemotherapeutic response in the CNS using fluorine-19 MRI. *Magnetic Resonance in Medicine*, 64(5), 1252–1259.
- Kagawa, Y., Haraguchi, Y., Tsuneda, S. & Shimizu, T. (2017). Real-time quantitation of internal metabolic activity of three-dimensional engineered tissues using an oxygen microelectrode and optical coherence tomography. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.*, 105(4), 855–864.
- Kang, Y. B., Eso, J., Bulutoglu, B., Yarmush, M. L. & Usta, O. B. (2020). Progressive hypoxia-on-a-chip: An in vitro oxygen gradient model for capturing the effects of hypoxia on primary hepatocytes in health and disease. *Biotechnology and Bioengineering*, 117(3), 763–775.

- Kansal, A. R., Torquato, S., Harsh IV, G. R., Chiocca, E. A. & Deisboeck, T. S. (2000). Simulated brain tumor growth dynamics using a three-dimensional cellular automaton. *Journal of Theoretical Biology*, 203(4), 367–382.
- Kapałczyńska, M., Kolenda, P., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., Bliźniak, R., Łuczewski, Ł. & Lamperska, K. (2018). 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science*, 14(4), 910–919.
- Keese, C. R., Wegener, J., Walker, S. R. & Giaever, I. (2004). Electrical wound-healing assay for cells in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(6), 1554–1559.
- Kellner, K., Liebsch, G., Klimant, I., Wolfbeis, O. S., Blunk, T., Schulz, M. B. & Göpferich, A. (2002). Determination of oxygen gradients in engineered tissue using a fluorescent sensor. *Biotechnology and Bioengineering*, 80(1), 73–83.
- Khalil, A. A., Horsman, M. R. & Overgaard, J. (1995). The importance of determining necrotic fraction when studying the effect of tumour volume on tissue oxygenation. *Acta Oncologica*, 34(3), 297–300.
- Klotz, L.-O., Kröncke, K.-D. & Sies, H. (2003). Singlet oxygen-induced signaling effects in mammalian cells. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2(2), 88–94.
- Klutzny, S., Lesche, R., Keck, M., Kaulfuss, S., Schlicker, A., Christian, S., Sperl, C., Neuhaus, R., Mowat, J. S., Steckel, M., Riefke, B., Prechtel, S., Parczyk, K. & Steigemann, P. (2017). Klutzny, S., Lesche, R., Keck, M., Kaulfuss, S., Schlicker, A., Christian, S., Functional inhibition of acid sphingomyelinase by Fluphenazine triggers hypoxia-specific tumor cell death. *Cell Death & Disease*, 8(3), e2709.
- Koppenol, W. H., Bounds, P. L. & Dang, C. V. (2011). Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Natural Reviews Cancer*, 11(5), 325–337.

- Kouthouridis, S., Goepp, J., Martini, C., Matthes, E., Hanrahan, J. W. & Moraes, C. (2021). Oxygenation as a driving factor in epithelial differentiation at the air–liquid interface. *Integrative Biology*, 13(6), 61–72.
- Krzyszczczyk, P., Acevedo, A., Davidoff, E. J., Timmins, L. M., Marrero-Berrios, I., Patel, M., White, C., Lowe, C., Sherba, J. J., Hartmanshenn, C., O'Neill, K. M., Balter, M. L., Fritz, Z. R., Androulakis, I. P., Schloss, R. S. & Yarmush, M. L. (2018). The growing role of precision and personalized medicine for cancer treatment. *Technology (Singap World Sci)*, 6(3-4), 79–100.
- Lacroix, A. & Lippman, M. E. (1980). Lacroix, A., & Lippman, M.E. (1980). Binding of retinoids to human breast cancer cell lines and their effects on cell growth. *The Journal of Clinical Investigation*, 65(3), 586–591.
- Laird, A. K. (1964). Dynamics of Tumour Growth. *British Journal of Cancer*, 18, 490–502.
- Lall, N., Henley-Smith, C. J., De Canha, M., Oosthuizen, C. & Twilley, D. (2013). Viability Reagent, PrestoBlue, in Comparison with Other Available Reagents, Utilized in Cytotoxicity and Antimicrobial Assays. *International Journal of Microbiology*, 2013.
- Landry, J., Freyer, J. P. & Sutherland, R. M. (1982). A model for the growth of multicellular spheroids. *Cell Proliferation*, 15(6), 585–594.
- Langan, L. M., Dodd, N. J., Owen, S. F., Purcell, W. M., Jackson, S. K. & Jha, A. N. (2016). Direct Measurements of Oxygen Gradients in Spheroid Culture System Using Electron Parametric Resonance Oximetry. *PLoS ONE*, 11(2).
- Langhans, S. A. (2018). Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. *Frontiers in Pharmacology*, 9(6).
- Laverty, G. & Gilmore, B. (2014). Cationic Antimicrobial Peptide Cytotoxicity. *SOJ Microbiology & Infectious Diseases*, 2(1).
<https://doi.org/10.15226/sojmid.2013.00112>

- Lazzari, G., Couvreur, P. & Mura, S. (2017). Multicellular tumor spheroids: a relevant 3D model for the in vitro preclinical investigation of polymer nanomedicines. *Polymer Chemistry*, 8(34), 4947–4969.
- Lee, A. V., Oesterreich, S. & Davidson, N. E. (2015). MCF-7 cells--changing the course of breast cancer research and care for 45 years. *Journal of the National Cancer Institute*, 107(7).
- Lee, S. Y., Jeong, E., Jeon, H. M., Kim, C. H. & Kang, H. S. (2010). Implication of necrosis-linked p53 aggregation in acquired apoptotic resistance to 5-FU in MCF-7 multicellular tumour spheroids. *Oncology Reports*, 24(1), 73–79.
- Leedale, J. A., Colley, H. E., Gaskell, H., Williams, D. P., Bearon, R. N., Chadwick, A. E., Murdoch, C. & Webb, S. D. (2019). In silico-guided optimisation of oxygen gradients in hepatic spheroids. *Computational Toxicology*, 12.
- Leedale, J. A., Herrmann, A., Bagnall, J., Fercher, A., Papkovsky, D., Sée, V. & Bearon, R. N. (2014). Modeling the dynamics of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) within single cells and 3D cell culture systems. *Mathematical Biosciences*, 258, 33–43.
- Leedale, J. A., Lucendo-Villarin, B., Meseguer-Ripolles, J., Kasarinaite, A., Webb, S. D. & Hay, D. C. (2021). Mathematical modelling of oxygen gradients in stem cell-derived liver tissue. *PLoS ONE*, 16(2), e0244070.
- Leung, B. M., Leshner-Perez, S. C., Matsuoka, T., Moraes, C. & Takayama, S. (2015). Media additives to promote spheroid circularity and compactness in hanging drop platform. *Biomaterials Science*, 3(2), 336–344.
- Lichtenegger, K. (2015). *Von den Newton-Axiomen bis zur Hawking-Strahlung*. Springer-Verlag.
- Liebsch, G., Klimant, I., Frank, B., Holst, G. & Wolfbeis, O. S. (2000). Luminescence Lifetime Imaging of Oxygen, pH, and Carbon Dioxide Distribution Using Optical Sensors. *Applied Spectroscopy*, 54(4), 548–559.

- Lin, R.-Z., Chou, L.-F., Chien, C.-C. M. & Chang, H.-Y. (2006). Dynamic analysis of hepatoma spheroid formation: roles of E-cadherin and beta1-integrin. *Cell Tissue Research*, 324(3), 411–422.
- Liu, S., Shah, S. J., Wilmes, L. J., Feiner, J., Kodibagkar, V. D., Wendland, M. F., Mason, R. P., Hylton, N., Hopf, H. W. & Rollins, M. D. (2011). Quantitative tissue oxygen measurement in multiple organs using ¹⁹F MRI in a rat model. *Magnetic Resonance in Medicine*, 66(6), 1722–1730.
- Lo, C. M., Keese, C. R. & Giaever, J. (1995). Impedance analysis of MDCK cells measured by electric cell-substrate impedance sensing. *Biophysical Journal*, 69(6), 2800–2807.
- Loessner, D., Little, J. P., Pettet, G. J. & Hutmacher, D. W. (2013). A multiscale road map of cancer spheroids--incorporating experimental and mathematical modelling to understand cancer progression. *Journal of Cell Science*, 126(13), 2761–2771.
- Löffler, G. (2003). *Basiswissen Biochemie: mit Pathobiochemie* (5. Aufl.). Springer-Verlag.
- Longmuir, I. S., Martin, D. C., Gold, H. J. & Sun, S. (1971). Nonclassical respiratory activity of tissue slices. *Microvascular Research*, 3(2), 125–141.
- Lowengrub, J. S., Frieboes, H. B., Jin, F., Chuang, Y. L., Li, X., Macklin, P., Wise, S. M. & Cristini, V. (2010). Nonlinear modelling of cancer: bridging the gap between cells and tumours. *Nonlinearity*, 23(1), R1-R9.
- Lukic, S. & Wegener, J. (2015). *Impedimetric monitoring of cell-based assays*. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0025710>
- Lvovich, V. F. (2012). *Impedance Spectroscopy: Applications to Electrochemical and Dielectric Phenomena*. John Wiley & Sons, Inc.
- Magata, Y., Temma, T., Iida, H., Ogawa, M., Mukai, T., Iida, Y., Morimoto, T., Konishi, J. & Saji, H. (2003). Development of Injectable O-15 Oxygen and Estimation of Rat OEF. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 23(6), 671–676.

- Magliaro, C., Mattei, G., Iacoangeli, F., Corti, A., Piemonte, V. & Ahluwalia, A. (2019). Oxygen Consumption Characteristics in 3D Constructs Depend on Cell Density. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7(251).
- Malandrino, A., Kamm, R. D. & Moeendarbary, E. (2018). In Vitro Modeling of Mechanics in Cancer Metastasis. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 4(2), 294–301.
- Mamchaoui, K. & Saumon, G. (2000). A method for measuring the oxygen consumption of intact cell monolayers. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 278(4), L858-863.
- Mandujano-Tinoco, E. A., Gallardo-Pérez, J. C., Marín-Hernández, A., Moreno-Sánchez, R. & Rodríguez-Enríquez, S. (2013). Anti-mitochondrial therapy in human breast cancer multi-cellular spheroids. *Biochimica Biophysica Acta*, 1833(3), 541–551.
- Marland, J. R., Gray, M. E., Dunare, C., Blair, E. O., Tsiamis, A., Sullivan, P., González-Fernández, E., Greenhalgh, S. N., Gregson, R., Clutton, R. E., Parys, M. M., Dyson, A., Singer, M., Kunkler, I. H., Potter, M. A., Mitra, S., Terry, J. G., Smith, S., Mount, A. R., . . . Murray, A. F. (2020). Real-time measurement of tumour hypoxia using an implantable microfabricated oxygen sensor. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 30(100375), 1–12.
- Marusić, M., Bajzer, Z., Freyer, J. P. & Vuk-Pavlović, S. (1994). Analysis of growth of multicellular tumour spheroids by mathematical models. *Cell Proliferation*, 27(2), 73–94.
- Materi, W. & Wishart, D. S. (2007). Computational systems biology in cancer: modeling methods and applications. *Gene Regulation and Systems Biology*, 1, 91–110.
- Mattei, G., Magliaro, C., Giusti, S., Ramachandran, S. D., Heinz, S., Braspenning, J. & Ahluwalia, A. (2017). On the adhesion-cohesion balance and oxygen consumption characteristics of liver organoids. *PLoS ONE*, 12(3), e0173206.

- McKeown, S. R. (2014). Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours-implications for treatment response. *The British Journal of Radiology*, 87(1035), 20130676.
- Mehta, G., Hsiao, A. Y., Ingram, M., Luker, G. D. & Takayama, S. (2012). Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. *Journal of Controlled Release*, 164(2), 192–204.
- Meier, R. J., Schreml, S., Wang, X [X.-d.], Landthaler, M., Babilas, P. & Wolfbeis, O. S. (2011). Simultaneous photographing of oxygen and pH in vivo using sensor films. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(46), 10893–10896.
- Minsky, M. (1988). Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning*, 10(4), 128–138.
- Mueller-Klieser, W. (1984). Method for the determination of oxygen consumption rates and diffusion coefficients in multicellular spheroids. *Biophysical Journal*, 46(3), 343–348.
- Mueller-Klieser, W. (1987). Multicellular spheroids. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 113(2), 101–122.
- Mueller-Klieser, W. (2000). Tumor biology and experimental therapeutics. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 36(2-3), 123–139.
- Mueller-Klieser, W., Bourrat, B., Gabbert, H. & Sutherland, R. M. (1985). Changes in O₂ consumption of multicellular spheroids during development of necrosis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 191, 775–784.
- Mueller-Klieser, W., Freyer, J. P. & Sutherland, R. M. (1986). Influence of glucose and oxygen supply conditions on the oxygenation of multicellular spheroids. *British Journal of Cancer*, 53(3), 345–353.
- Mueller-Klieser, W. & Sutherland, R. M. (1982). Oxygen tensions in multicell spheroids of two cell lines. *British Journal of Cancer*, 45(2), 256–264.

- Mueller-Klieser, W. & Sutherland, R. (1983). Frequency distribution histograms of oxygen tensions in multicell spheroids. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 159, 497–508.
- Mukomoto, R., Nashimoto, Y., Terai, T., Imaizumi, T., Hiramoto, K., Ino, K., Yokokawa, R., Miura, T. & Shiku, H. (2020). Oxygen consumption rate of tumour spheroids during necrotic-like core formation. *The Analyst*, 145(19), 6342–6348.
- Nath, S. & Devi, G. R. (2016). Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacology & Therapeutics*, 163, 94–108.
- Nestle, U., Weber, W., Hentschel, M. & Grosu, A.-L. (2009). Biological imaging in radiation therapy: role of positron emission tomography. *Physics in medicine and biology*, 54(1), R1-25.
- Neumann, G., Schäfer, A. & Mendling, W. (2014). *Phasenkontrast-Mikroskopie in der Frauenarztpraxis*. Springer-Verlag.
- Ngoc Le, H. T., Kim, J. & Park, J. (2019). A Review of Electrical Impedance Characterization of Cells for Label-Free and Real-Time Assays. *BioChip Journal*, 13(4), 295–305.
- Nichols, A. J., Roussakis, E., Klein, O. J. & Evans, C. L. (2014). Click-Assembled, Oxygen-Sensing Nanoconjugates for Depth Resolved, Near-Infrared Imaging in a 3D Cancer Model. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(14), 3671–3674.
- Nowakowska, M., Najbar, J. & Waligóra, B. (1976). Fluorescence quenching of polystyrene by oxygen. *European Polymer Journal*, 12(6), 387–391.
- Nunes, A. S., Barros, A. S., Costa, E. C., Moreira, A. F. & Correia, I. J. (2019). 3D tumor spheroids as in vitro models to mimic in vivo human solid tumors resistance to therapeutic drugs. *Biotechnology and Bioengineering*, 116(1), 206–226.

- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T. & Pognan, F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, 267(17), 5421–5426.
- Olea, N., Villalobos, M., Ruiz de Almodóvar, J. M. & Pedraza, V. (1992). MCF-7 breast cancer cells grown as multicellular spheroids in vitro: effect of 17 beta-estradiol. *International Journal of Cancer*, 50(1), 112–117.
- Ostertag, H. (1992). Positronen-Emissions Tomographie (PET): Ein diagnostisches Verfahren zur in vivo-Stoffwechseluntersuchung mit Positronenstrahlern. *Physikalische Blätter*, 48(2), 77–83.
- Otto, A. M., Paddenberg, R., Schubert, S. & Mannherz, H. G. (1996). Cell-cycle arrest, micronucleus formation, and cell death in growth inhibition of MCF-7 breast cancer cells by tamoxifen and cisplatin. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 122(10), 603–612.
- Paddock, S. W. (1999). Confocal Laser Scanning Microscopy. *BioTechniques*, 27(5), 992–1004.
- Paddock, S. W. (2000). Principles and Practices of Laser Scanning Confocal Microscopy. *Molecular Biotechnology*, 16(2), 127–149.
- Papas, K. K., Hering, B. J., Guenther, L., Rappel, M. J., Colton, C. K. & Avgoustiniatos, E. S. (2005). Pancreas oxygenation is limited during preservation with the two-layer method. *Transplantation Proceedings*, 37(9), 3501–3504.
- Papkovsky, D. B. & Dmitriev, R. I. (2013). Biological detection by optical oxygen sensing. *Chemical Society Reviews*, 42(22), 8700–8732.
- Parak, W., Domke, J., George, M., Kardinal, A., Radmacher, M., Gaub, H., De Roos, A., Theuvenet, A., Wiegand, G., Sackmann, E. & Behrends, J. (1999). Electrically excitable normal rat kidney fibroblasts: A new model system for cell-semiconductor hybrids. *Biophysical Journal*, 76(3), 1659–1667.

- Park, J. S., Chang, J.-H., Choi, M., Park, J. J., Lee, D.-Y. & Pak, Y. K. (2007). Microfabirated Clark-type Sensor for Measuing Dissolved Oxygen. *sensors*, 1412–1415.
- Park, J. S., Choi, C. K. & Kihm, K. D. (2004). Optically sliced micro-PIV using confocal laser scanning microscopy (CLSM). *Experiments in Fluids*, 37(1), 105–119.
- Peniche Silva, C. J., Liebsch, G., Meier, R. J., Gutbrod, M. S., Balmayor, E. R. & van Griensven, M. (2020). A New Non-invasive Technique for Measuring 3D-Oxygen Gradients in Wells During Mammalian Cell Culture. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 595.
- Pettersen, E. O., Larsen, L. H., Ramsing, N. B. & Ebbesen, P. (2005). Pericellular oxygen depletion during ordinary tissue culturing, measured with oxygen microsensors. *Cell Proliferation*, 38(4), 257–267.
- Pilatus, U., Aboagye, E., Artemov, D., Mori, N., Ackerstaff, E. & Bhujwala, Z. M. (2001). Real-Time Measurements of Cellular Oxygen Consumption, pH, and Energy Metabolism Using Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Magnetic Resonance in Medicine*, 45, 749–755.
- Place, T. L., Domann, F. E. & Case, A. J. (2017). Limitations of oxygen delivery to cells in culture: An underappreciated problem in basic and translational research. *Free Radical Biology & Medicine*, 113, 311–322.
- Plitzko, B. & Loesgen, S. (2018). Measurement of Oxygen Consumption Rate (OCR) and Extracellular Acidification Rate (ECAR) in Culture Cells for Assessment of the Energy Metabolism. *bio-protocol*, 8(10), e2850.
- Poulsen, L., Zebger, I., Tofte, P., Klinger, M., Hassager, O. & Ogilby, P. R. (2003). Oxygen Diffusion in Bilayer Polymer Films. *Journal of Physical Chemistry B*, 107(50), 13885–13891.
- Präbst, K., Engelhardt, H., Ringgeler, S. & Hübner, H. (2017). Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. In *Gilbert, D.; Friedrich, O. (Hrsg.) Cell Viability Assays. Methods in Molecular Biology* (Bd. 1601, S. 1–17). Humana Press.

- Prendecka, M., Frankowski, J., Sobieszek, G., Kapka-Skrzypczak, L., Skwarek-Dziekanowska, A. & Małecka-Massalska, T. (2018). Electric Cell Substrate Impedance Sensing (ECIS) as a unique technique in cancer metastasis research. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*, 12(4), 142–144.
- Pütz, L. (2021). *Imaging Microphysiometry of 2D and 3D Tissue Models: Method Development and Application* [Dissertation]. Universität Regensburg, Regensburg.
- Quaranta, M., Borisov, S. M. & Klimant, I. (2012). Indicators for optical oxygen sensors. *Bioanalytical Reviews*, 4(2-4), 115–157.
- Reddel, R., Murphy, L., Hall, R. E. & Sutherland, R. L. (1985). Differential sensitivity of human breast cancer cell lines to the growth-inhibitory effects of tamoxifen. *Cancer Research*, 45(4), 1525–1531.
- Rejniak, K. A. & McCawley, L. J. (2010). Current trends in mathematical modeling of tumor-microenvironment interactions: a survey of tools and applications. *Experimental Biology and Medicine*, 235(4), 411–423.
- Renz, M. (2013). Fluorescence microscopy-a historical and technical perspective. *Cytometrie A*, 83(9), 767–779.
- Ricci, C., Morono, L. & Danti, S. (2013). Cancer tissue engineering - new perspectives in understanding the biology of solid tumours - a critical review. *OA tissue engineering*, 1(1), 4–10.
- Rickard, A. G., Zhuang, M., DeRosa, C. A., Zhang, X., Dewhirst, M. W., Fraser, C. L. & Palmer, G. M. (2020). Dual-emissive, oxygen-sensing boron nanoparticles quantify oxygen consumption rate in breast cancer cells. *Journal of Biomedical Optics*, 25(11), 116504.
- Riffle, S., Pandey, R. N., Albert, M. & Hedge, R. S. (2017). Linking hypoxia, DNA damage and proliferation in multicellular tumor spheroids. *BMC Cancer*, 17(1), 338.
- Ritgen, U. (2020). *Analytische Chemie II*. Springer Spektrum.

- Rosic, T., Petrina, N., Baysari, M., Ritchie, A. & Poon, S. K. (2022). Patient and clinician use characteristics and perceptions of pulse oximeter use: A scoping review. *International Journal of Medical Informatics*, 162(104735), 1–9.
- Roussakis, E., Li, Z., Nichols, A. J. & Evans, C. L. (2015). Oxygen-Sensing Methods in Biomedicine from the Macroscale to the Microscale. *Angewandte Chemie International Edition*, 54(29), 8340–8362.
- Russel, W. M. S. & Burch, R. L. (1959). *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen Publishing.
- Sadhukhan, S. & Mishra, P. K. (2022). A multi-layered hybrid model for cancer cell invasion. *Medical & Biological Engineering & Computing*, 60(4), 1075–1098.
- Sand, T., Condie, R. & Rosenberg, A. (1977). Metabolic crowding effect in suspension of cultured lymphocytes. *Blood*, 50(2), 337–346.
- Sander, R. (2014). Compilation of Henry's law constants. *Atmospheric Chemistry and Physics Discussion*, 14, 29615–30521.
- Sauer, H., Ritgen, J., Hescheler, J. & Wartenberg, M. (1998). Hypotonic Ca^{2+} signaling and volume regulation in proliferating and quiescent cells from multicellular spheroids. *Journal of Cellular Physiology*, 175(2), 129–140.
- Schaller, G. & Meyer-Hermann, M. (2006). Continuum versus discrete model: a comparison for multicellular tumour spheroids. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*, 364(1843), 1443–1464.
- Schmittlein, C. (2017). *Sensors and Actuators for 2D and 3D Cell Culture Models based on Oxygen Sensitive Culture Substrates* [Dissertation]. Universität Regensburg, Regensburg.
- Schmittlein, C., Meier, R. J., Sauer, L., Liebsch, G. & Wegener, J. (2019). Monitoring Oxygenation in Microfluidic Cell Culture Using 2D Sensor Foils as Growth Substrate Oxygen Imaging with VisiSens™. *Technical Report, PreSens*.

- Sefidgar, M., Soltani, M., Raahemifar, K., Bazmara, H., Nayinian, S. M. & Bazargan, M. (2014). Effect of tumor shape, size, and tissue transport properties on drug delivery to solid tumors. *Journal of Biological Engineering*, 8, 12. <https://doi.org/10.1186/1754-1611-8-12>
- Sette, G., Baron, J., Mazoyer, B., Levasseur, M., Pappatà, S. & Crouzel, C. (1989). Local brain haemodynamics and oxygen metabolism in cerebrovascular disease. Positron emission tomography. *A Journal of Neurology*, 112(4), 931–951.
- Shourabi, A. Y., Salajeghe, R., Barisam, M. & Kashaninejad, N. (2021). A Proof-of-Concept Study Using Numerical Simulations of an Acoustic Spheroid-on-a-Chip Platform for Improving 3D Cell Culture. *sensors*, 21(16), 5529.
- Shyam, R., Reddy, L. V. K. & Palaniappan, A. (2023). Fabrication and Characterization Techniques of In Vitro 3D Tissue Models. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 1912.
- Sivakumar, H., Devarasetty, M., Kram, D. E., Strowd, R. E. & Skardal, A. (2020). Multi-Cell Type Glioblastoma Tumor Spheroids for Evaluating Sub-Population-Specific Drug Response. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8.
- Smyrek, I., Mathew, B., Fischer, S. C., Lissek, S. M., Becker, S. & Stelzer, E. H. K. (2019). E-cadherin, actin, microtubules and FAK dominate different spheroid formation phases and important elements of tissue integrity. *Biology Open*, 8(1), bio037051. <https://doi.org/10.1242/bio.037051>
- Solaini, G., Baracca, A., Lenaz, G. & Sgarbi, G. (2010). Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Bioenergetics*, 1797(6-7), 1171–1177.
- Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. & Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 51(5), 1409–1416.
- Stéphanou, A. & Volpert, V. (2016). Hybrid Modelling in Biology: a Classification Review. *Mathematical Modelling of Natural Phenomena*, 11(1), 37–48.

- Stephens, D. J. & Allan, V. J. (2003). Light Microscopy Techniques for Live Cell Imaging. *Science*, 300(5616), 82–86.
- Stolwijk, J. A., Michaelis, S. & Wegener, J. (2012). Cell Growth and Cell Death Studied by Electric Cell-Substrate Impedance Sensing. In W. G. Jiang (Hrsg.), *Electric Cell-Substrate Impedance Sensing and Cancer Metastasis* (17 Aufl., S. 85–119). Springer Science & Business Media.
- Sutherland, R. M. (1988). Cell and Environment Interactions in Tumor Microregions: The Multicell Spheroid Model. *Science*, 240(4849), 177–184.
- Sutherland, R. M., Hall, R. E. & Taylor, I. W. (1983). Cell proliferation kinetics of MCF-7 human mammary carcinoma cells in culture and effects of tamoxifen on exponentially growing and plateau-phase cells. *Cancer Research*, 43(9), 3998–4006.
- Sutherland, R. M., Inch, W. R., McCredie, J. A. & Kruuv, J. (1970). A Multi-component Radiation Survival Curve Using an in Vitro Tumour Model. *International Journal of Radiation and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, 18(5), 491–495.
- Sutherland, R. M. & McCredie, W. R. (1971). Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute*, 46(1), 113–120.
- Swami, A. (2014). 3D tumor models: history, advances and future perspectives. *Future Oncology*, 10(7), 1311–1327.
- Tannock, I. F. & Kopelyan, I. (1986). Variation of pO₂ in the growth medium of spheroids: interaction with glucose to influence spheroid growth and necrosis. *British Journal of Cancer*, 53(6), 823–827.

- Tatum, J. L., Kelloff, G. J., Gillies, R. J., Arbeit, J. M., Brown, J. M., Chao, K. S., Chapman, J. D., Eckelman, W. C., Fyles, A. W., Giaccia, A. J., Hill, R. P., Koch, C. J., Krishna, M. C., Krohn, K. A., Lewis, J. S., Mason, R. P., Melillo, G., Padhani, A. R., Powis, G., . . . Sullivan, D. (2006). Hypoxia: importance in tumor biology, noninvasive measurement by imaging, and value of its measurement in the management of cancer therapy. *International Journal of Radiation Biology*, 82(10), 699–757.
- Thalheim, T., Aust, G. & Galle, J. (2022). Organoid Cultures In Silico: Tools or Toys? *Bioengineering (Basel)*, 10(1), 50.
- Tibbitt, M. W. & Anseth, K. S. (2009). Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 103(4), 655–663.
- Tse, H. M., Gardner, G., Dominguez-Bendala, J. & Fraker, C. A. (2021). The Importance of Proper Oxygenation in 3D Culture. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 634403.
- Tutz, G. (2012). *Regression for Categorical Data*. Cambridge University Press.
- Uggeri, J., Gatti, R., Belletti, S., Scandroglio, R., Corradini, R., Rotoli, B. M. & Orlandini, G. (2000). Calcein-AM is a detector of intracellular oxidative activity. *Histochemistry and Cell Biology*, 122(5), 499–505.
- Unnikrishnan, K., Thomas, L. V. & Ram Kumar, R. M. (2021). Advancement of Scaffold-Based 3D Cellular Models in Cancer Tissue Engineering: An Update. *frontiers in Oncology*, 11, 733652. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.733652>
- Urban, F. (2019). *Expanding the Scope of Impedance Analysis of Epithelial Barrier Function: Novel Assays and Devices* [Dissertation]. Universität Regensburg, Regensburg.
- van der Meer, A. D. & van der Berg, A. (2012). Organs-on-chips: breaking the in vitro impasse. *Integrative Biology*, 4(5), 461–470.
- Vanderkooi, J. M., Maniara, G., Green, T. J. & Wilson, D. F. (1987). An optical method for measurement of dioxygen concentration based upon quenching of phosphorescence. *Journal of Biological Chemistry*, 262(12), 5476–5482.

- Vaupel, P. & Mayer, A. (2005). Hypoxia and anemia: effects on tumor biology and treatment resistance. *Transfus Clin Biol*, 12(1), 5–10.
- Vinci, M., Gowan, S., Boxall, F., Patterson, L., Zimmermann, M., Court, W., Lomas, C., Mendiola, M., Hardisson, D. & Eccles, S. A. (2012). Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. *BMC biology*, 10(1), 29.
- von der Saal, K. (2020). *Biochemie*. Springer-Verlag GmbH.
- Wagner, B. A., Venkataraman, S. & Buettner, G. R. (2001). The rate of oxygen utilization by cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 51(3), 700–712.
- Wagner, P. D. (2008). The biology of oxygen. *European Respiratory Journal*, 31(4), 887–890.
- Walenta, S., Dötsch, J., Bourrat-Flöck, B. & Mueller-Klieser, W. (1990). Size-dependent oxygenation and energy status in multicellular tumor spheroids. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 277, 889–893.
- Wang, B. & Ogilby, P. R. (1995). Activation barriers for oxygen diffusion in polystyrene and polycarbonate glasses: effects of codissolved argon, helium, and nitrogen. *Canadian Journal of Chemistry*, 73(11), 1831–1840.
- Wang, X [X.-d.] & Wolfbeis, O. S. (2014). Optical methods for sensing and imaging oxygen: materials, spectroscopies and applications. *Chemical Society Reviews*, 43(10), 3666–3761.
- Ward, J. P. & King, J. R. (2003). Mathematical modelling of drug transport in tumour multicell spheroids and monolayer cultures. *Mathematical Biosciences*, 181(2), 177–207.
- Wegener, J., Keese, C. R. & Giaever, I. (2000). Electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) as a noninvasive means to monitor the kinetics of cell spreading to artificial surfaces. *Experimental Cell Research*, 259(1), 158–166.

- Wegener, J. & Seebach, J. (2014). Experimental tools to monitor the dynamics of endothelial barrier function: a survey of in vitro approaches. *Cell Tissue Research*, 355(3), 485–514.
- Wenger, R. H., Kurtcuoglu, V., Scholz, C. C., Marti, H. H. & Hoogewijs, D. (2015). Frequently asked questions in hypoxia research. *Hypoxia (Auckl)*, 3, 35–43.
- White, K., Chalaby, R., Lowe, G., Berlin, J., Glackin, C. & Olabisi, R. (2021). Calcein Binding to Assess Mineralization in Hydrogel Microspheres. *Polymers (Basel)*, 13(14).
- Wilson, D. F. (2008). Quantifying the role of oxygen pressure in tissue function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 294(1), H11-13.
- Wilson, D. F., Erecínska, M., Drown, C. & Silver, I. A. (1977). Effect of oxygen tension on cellular energetics. *The American Journal of Physiology*, 233(5), C135-140.
- Wilson, D. F., Gomi, S., Pastuszko, A. & Greenberg, J. H. (1992). Oxygenation of the cortex of the brain of cats during occlusion of the middle cerebral artery and reperfusion. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 317, 689–694.
- Wilson, D. F., Rumsey, W. L., Green, T. J. & Vanderkooi, J. M. (1988). The oxygen dependence of mitochondrial oxidative phosphorylation measured by a new optical method for measuring oxygen concentration. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(6), 2712–2718.
- Wohlpart, D., Kirwan, D. & Gainer, J. (1990). Effects of cell density and glucose and glutamine levels on the respiration rates of hybridoma cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 36(6), 630–635.
- Wolfbeis, O. S. (2015). Luminescent sensing and imaging of oxygen: Fierce competition to the Clark electrode. *Bioessays*, 37(8), 921–928.

- Wu, M., Neilson, A., Swift, A. L., Moran, R., Tamagnine, J., Parslow, D., Armistead, S., Lemire, K., Orrell, J., Teich, J., Chomicz, S. & Ferrick, D. A. (2007). Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 292(1), C125-136.
- Xia, M., Hu, M., Wang, J., Xu, Y., Chen, X., Ma, Y. & Su, L. (2010). Identification of the role of Smad interacting protein 1 (SIP1) in glioma. *Journal of Neuro-Oncology*, 97(2), 225–232.
- Xu, W., Janocha, A. J., Leahy, R. A., Klatte, R., Dudzinski, D., Mavrakis, L. A., Comhair, S. A., Lauer, M. E., Cotton, C. U. & Erzurum, S. C. (2014). A novel method for pulmonary research: assessment of bioenergetic function at the air-liquid interface. *Redox Biology*, 16(2), 513–519.
- Yamori, W. (2016). Photosynthesis and respiration. In T. Kozai, G. Niu & M. Takagaki (Hrsg.), *Plant Factory: An Indoor Vertical Farming System for Efficient Quality Food Production* (S. 141–150). Academic Press.
- Yilmaz, D., Tuzer, M. & Unlu, M. B. (2022). Assessing the therapeutic response of tumors to hypoxia-targeted prodrugs with an in silico approach. *Mathematical Bioscience and Engineering: MBE*, 19(11), 10941–10962.
- Yu, J.-X., Hallac, R. R., Chiguru, S. & Mason, R. P. (2013). New Frontiers and Developing Applications in ¹⁹F NMR. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc.*, 70, 25–49.
- Yuhas, J. M., Li, A. P., Martinez, A. O. & Ladman, A. J. (1977). A Simplified Method for Production and Growth of Multicellular Tumor Spheroids. *Cancer Research*, 37(10), 3639–3643.
- Zernike, F. (1935). Das Phasenkontrastverfahren bei der mikroskopischen Beobachtung. *Z. technische Physik*, 16, 454–457.
- Zernike, F. (1942). Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects. *Physica*, 9(7), 686–698.

- Zhao, F., Pathi, P., Grayson, W., Xing, Q., Locke, B. R. & Ma, T. (2005). Effects of oxygen transport on 3-d human mesenchymal stem cell metabolic activity in perfusion and static cultures: experiments and mathematical model. *Biotechnology Progress*, 21(4), 1269–1280.
- Zheng, X., Wang, X [X.], Mao, H., Wu, W., Liu, B. & Jiang, X. (2015). Hypoxia-specific ultrasensitive detection of tumours and cancer cells in vivo. *nature communications*, 6.
- Zhong, W., Urayama, P. & Mycek, M.-A. (2003). Imaging fluorescence lifetime modulation of a ruthenium-based dye in living cells: the potential for oxygen sensing. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 36(14), 1689–1695.
- Zirath, H., Rothbauer, M., Spitz, S., Bachmann, B., Jordan, C., Müller, B., Ehgartner, J., Priglinger, E., Mühleder, S., Redl, H., Holnthoner, W., Harasek, M., Mayr, T. & Ertl, P. (2018). Every Breath You Take: Non-invasive Real-Time Oxygen Biosensing in Two- and Three-Dimensional Microfluidic Cell Models. *Frontiers in Physiology*, 9, 815.

10 Anhang

10.1 Appendix

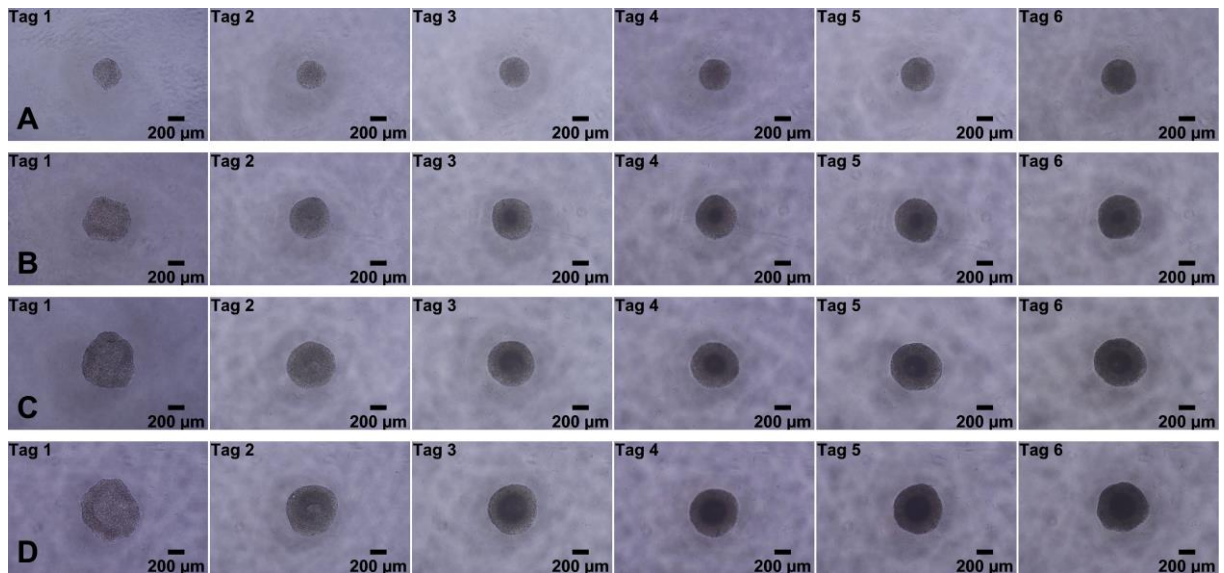


Abbildung 90: Phasenkontrastmikroskopische Bilder von MCF-7 Sphäroiden mit den Aussaatdichten 4k Zellen/Well (A), 12k Zellen/Well (B), 16k Zellen/Well (C) und 20k Zellen/Well (D) während der Kulturzeit von sechs Tagen.

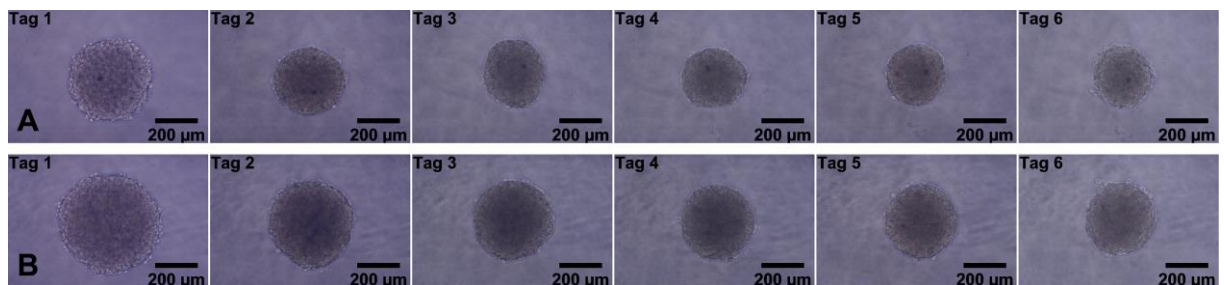


Abbildung 91: Phasenkontrastmikroskopische Bilder von U373 Sphäroiden mit den Aussaatdichten 6k Zellen/Well (A) und 10k Zellen/Well (B) während der Kulturzeit von sechs Tagen.

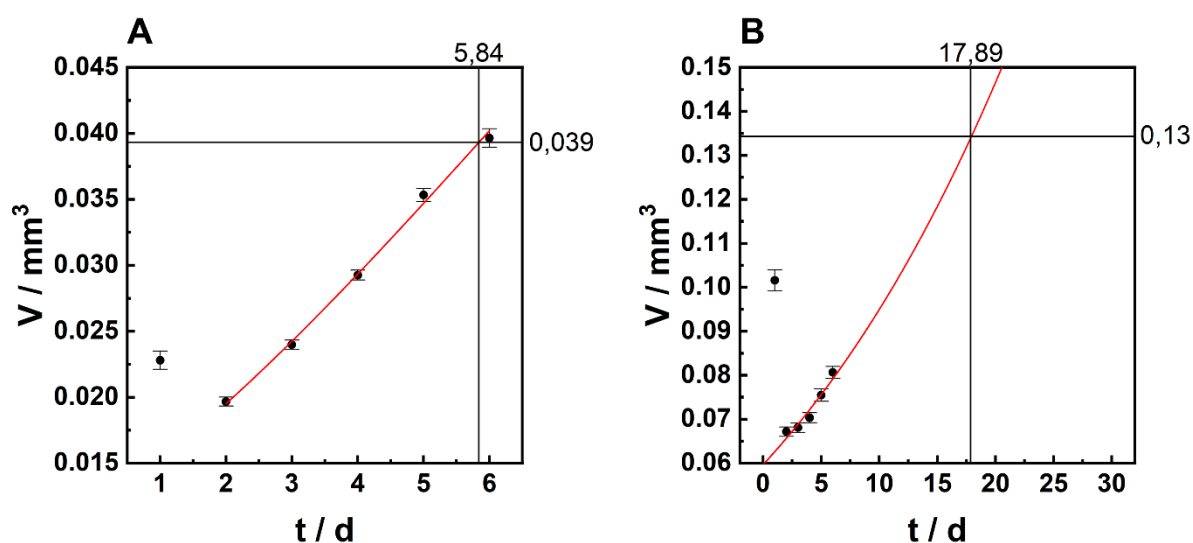


Abbildung 92: Graphische Ermittlung der Verdopplungszeit (TD) von suspendierten MCF-7 Sphäroiden unterschiedlicher Aussaatdichte (**A**: 4k Zellen/Well; **B**: 12k Zellen/Well) mit der Gompertz Fitfunktion. Hier muss berücksichtigt werden, dass das Wachstum beider Sphäroide erst ab dem zweiten Tag in Kultur einsetzt, sodass gilt: $TD = TD_{Fit} - 2$.

Tabelle 23: Darstellung der ermittelten Werte für die Parameter Radius $r_{suspendiert}$ (Mikroskopie) und globale Sauerstoffverbrauchsrate R_{global} (Mikroskopie) für MCF-7 Sphäroide unterschiedlicher Zellzahl (t_0) am Tag 6 der Kulturzeit. Die Werte wurden im Rahmen einer Interpolationsstudie mittels einer linearen Fitfunktion ($R_{global} = m r_{suspendiert} + b$) berechnet. Dabei sind die Parameter der Fitfunktion wie folgt definiert: m : Steigung [$(4,9e-3 \pm 4e-4) \mu m^{-1}$] und b : Ordinatenabschnitt [$(-0,47 \pm 0,14) \text{ pmol} \cdot s^{-1}$].

Zellzahl (t_0) / Zellen/Well	Radius $r_{suspendiert}$ / μm	R_{global} / $\text{pmol} \cdot s^{-1}$
4k	220,9	0,62
12k	269,8	0,86
16k	291,4	0,97
20k	308,3	1,05

Tabelle 24: Zusammenfassung der Parameter der linearen Fitfunktionen für MCF-7 Sphäroide unterschiedlicher Zellzahl (t_0) zur Beschreibung des Wachstumsverhalten über die Kulturzeit von fünf Tagen sowie die für die Modellierung nötigen Ausgangsparameter R_{\max} .

Zellzahl (t_0) / Zellen/Well	b / μm	m / $\mu\text{m}\cdot\text{d}^{-1}$	R_{\max} / $\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$
4k	312 ± 3	23 ± 1	$1,44\cdot 10^{-2}$
12k	492 ± 5	$7,9 \pm 1,4$	$1,12\cdot 10^{-2}$
16k	563 ± 7	$0,47 \pm 2,17$	$1,01\cdot 10^{-2}$
20k	$604,5 \pm 11,6$	$0,1 \pm 4$	$0,93\cdot 10^{-2}$

Tabelle 25: Zusammenfassung der Parameter der exponentiellen Fitfunktionen für U373 Sphäroide unterschiedlicher Zellzahl (t_0) zur Beschreibung der Kompaktierung über die Kulturzeit von sechs Tagen sowie die für die Modellierung nötigen Ausgangsparameter R_{global} .

Zellzahl (t_0) / Zellen/Well	y_0 / μm	A / μm	R_0 / (1/d)	R_{global} / $\text{pmol}\cdot\text{s}^{-1}$
6k	$273,9 \pm 0,5$	$198,9 \pm 2,6$	$-0,71666 \pm 0,01218$	0,19
10k	$312,1 \pm 0,9$	260 ± 5	$-0,622 \pm 0,014$	0,32
20k	400 ± 16	600 ± 50	$-0,6 \pm 0,1$	0,64
30k	500 ± 6	800 ± 24	$-0,73 \pm 0,04$	0,96

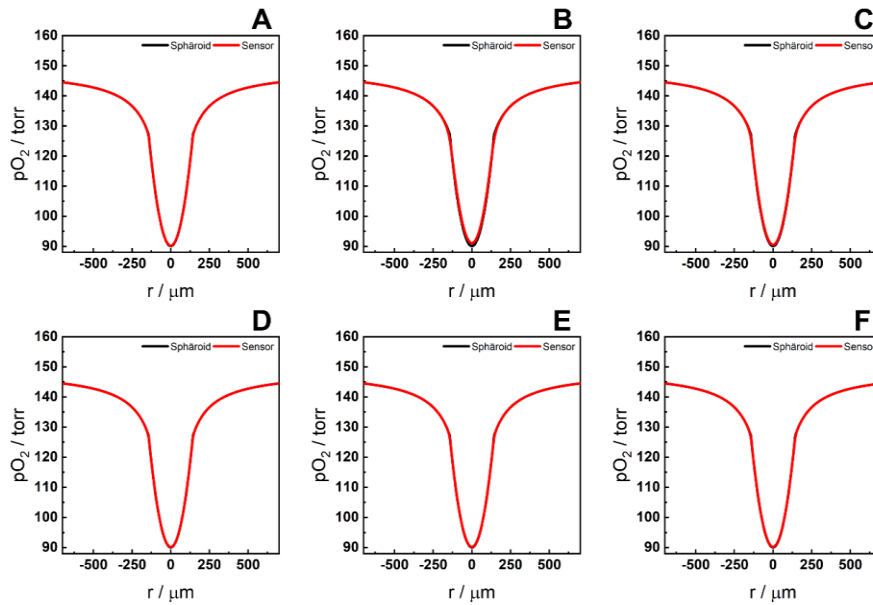


Abbildung 93: Darstellung der lateralen pO_2 Gradienten aus dem Querschnitt des adhärenen U373 Sphäroids mit einer Aussaatdichte von 6k Zellen/Well im Gewebe selbst (—) sowie in der Sauerstoffsensitiven Sensorfolie (—) für die jeweiligen Transwell®-Membraneinsätze **A – F** von Corning aus **Tabelle 10**. Die Generierung der Daten erfolgte über eine 1D-Plotgruppe mit zwei 2D Schnittlinien. Eine der Schnittlinien wird hierbei im Gewebe lokalisiert, während sich die andere im Sensor befindet. $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

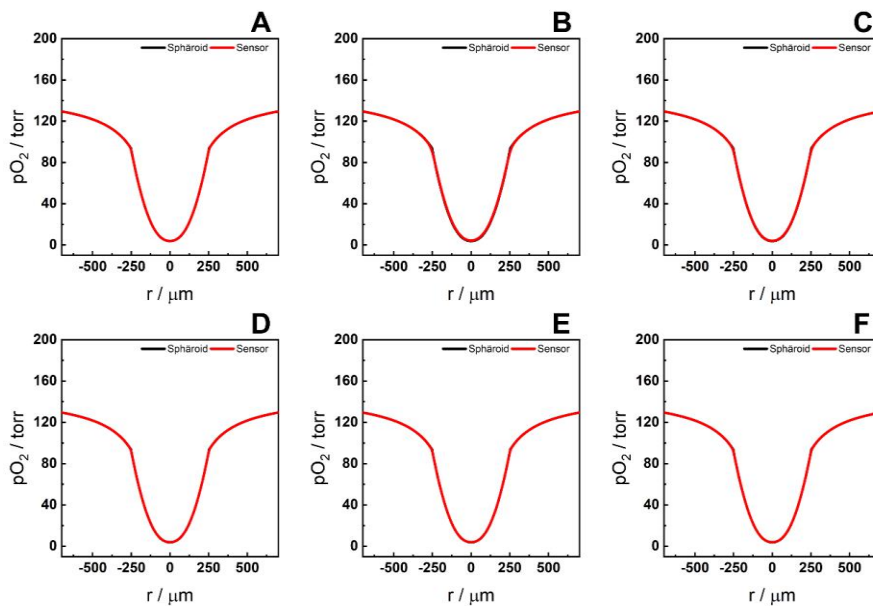


Abbildung 94: Darstellung der lateralen pO_2 Gradienten aus dem Querschnitt des adhärenen U373 Sphäroids mit einer Aussaatdichte von 30k Zellen/Well im Gewebe selbst (—) sowie in der Sauerstoffsensitiven Sensorfolie (—) für die jeweiligen Transwell®-Membraneinsätze **A – F** von Corning aus **Tabelle 10**. Die Generierung der Daten erfolgte über eine 1D-Plotgruppe mit zwei 2D Schnittlinien. Eine der Schnittlinien wird hierbei im Gewebe lokalisiert, während sich die andere im Sensor befindet. $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

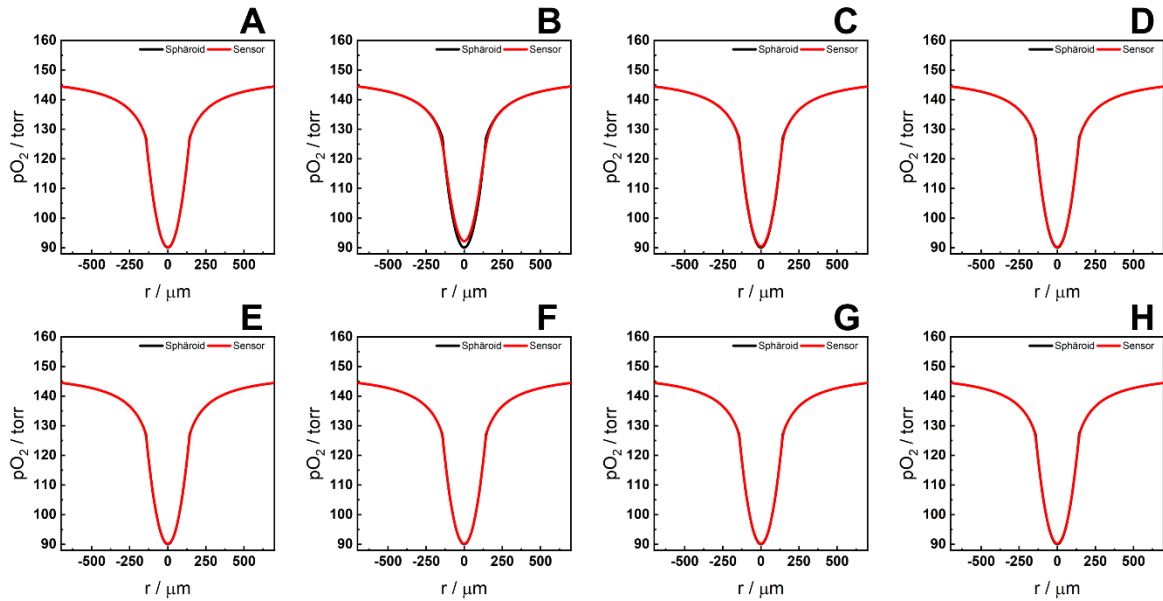


Abbildung 95: Darstellung der lateralen pO_2 Gradienten aus dem Querschnitt des adhärennten U373 Sphäroids mit einer Aussaatdichte von 6k Zellen/Well im Gewebe selbst (—) sowie in der Sauerstoffsensitiven Sensorfolie (—) für die jeweiligen cellQART®-Membraneinsätze **A – H** von Sabeu aus **Tabelle 10**. Die Generierung der Daten erfolgte über eine *1D-Plotgruppe* mit zwei *2D Schnittlinien*. Eine der *Schnittlinien* wird hierbei im Gewebe lokalisiert, während sich die andere im Sensor befindet. $T = 37^\circ C$.

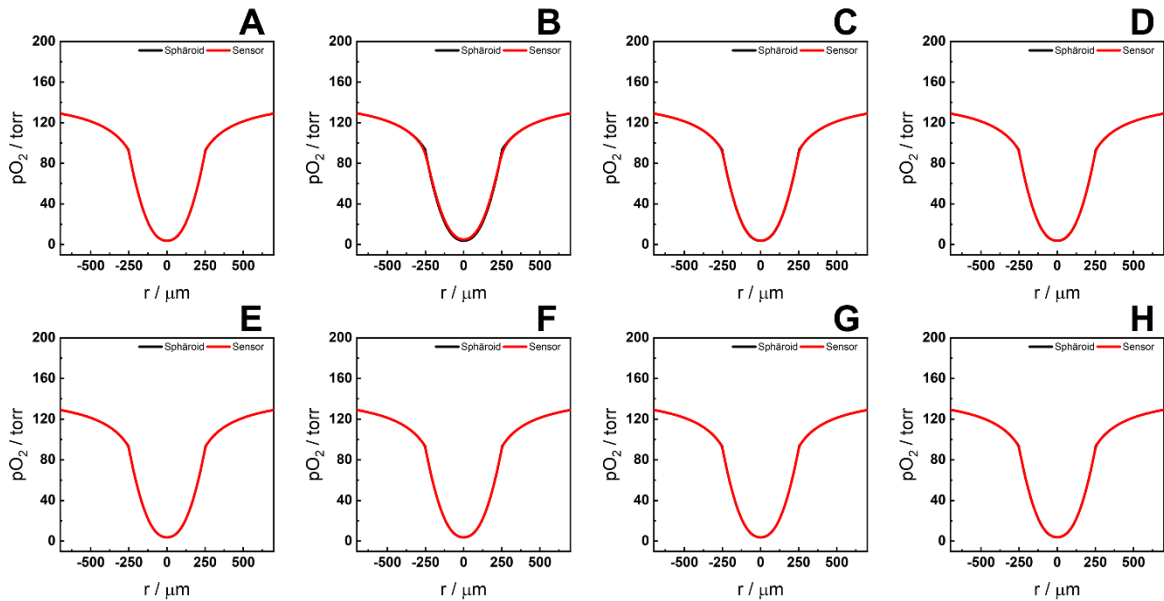


Abbildung 96: Darstellung der lateralen pO_2 Gradienten aus dem Querschnitt des adhärennten U373 Sphäroids mit einer Aussaatdichte von 30k Zellen/Well im Gewebe selbst (—) sowie in der Sauerstoffsensitiven Sensorfolie (—) für die jeweiligen cellQART®-Membraneinsätze **A – H** von Sabeu aus **Tabelle 10**. Die Generierung der Daten erfolgte über eine *1D-Plotgruppe* mit zwei *2D Schnittlinien*. Eine der *Schnittlinien* wird hierbei im Gewebe lokalisiert, während sich die andere im Sensor befindet. $T = 37^\circ C$.

10.2 Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

A	
α	Maximale potenzielle Wachstumsrate
ABM	<i>Agent-Based Model</i> , agentenbasierte Methode
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
AM	Acetoxymethylester
Ant A	Antimycin A
ATP	Adenosintriphosphat
B	
β	Rate, bei welcher sich das Sphäroidwachstum verlangsamt
BOLD	<i>Blood Oxygenation Level Dependent</i>
BNP	Bor-Nanopartikel
C	
C	Kapazität
c	Konzentration
C_{krit}	Kritische Konzentration
cm^2	Quadratzentimeter
CA	<i>Cellular Automata</i> , zellulärer Automat
CAOS	<i>Click-Assembled Oxygen Sensing</i>
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CBF	Zerebrale Perfusion
CBV	Zerebrales Blutvolumen

rCMRO ₂	Zerebrale Stoffwechselrate von Sauerstoff
CCD	<i>Charge-Coupled-Device</i>
CLSM	Konfokales Laser-Raster Mikroskop
cos	Kosinus
CPE	Konstantes Phasenelement
CT	Computertomographie
D	
D	Diffusionskoeffizient
d, Ø	Durchmesser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPA	Diphenylanthracen
E	
e ⁻	Elektronen
ε	Porosität
ECAR	<i>Extracellular Acidification Rate</i> , extrazelluläre Azidifizierungsrate
ECIS	<i>Electric Cell-Substrate Impedance Sensing</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPR	Elektronenspinresonanz
exp	Exponentialfunktion
F	
F	Ferrat

Anhang

FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCCP	Trifluoromethoxy Carbonylcyanide Phenylhydrazon
FCS	Fetales Kälberserum
FEM	Finite-Elemente-Methode
FDG	Fluordesoxyglukose
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FI	Fluoreszenzintensität
G	
GTP	Guanosintriphosphat
H	
h	Stunden, Höhe
H ⁺	Wasserstoffatom
H ¹	Menge aller quadratisch integrierbaren Funktionen mit einer quadratisch integrierbaren schwachen Ableitung
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfon Säure
HFB	Hexafluorbenzol
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
Hz	Hertz
I	
I	Stromstärke, Intensität

I_0	Amplitude der Stromstärke, ungequenchte Intensität
$I(t)$	Stromstärke zum Zeitpunkt t
Im	Imaginärteil
K	
k	Tausend
K_{H,O_2}	Henry-Löslichkeitskonstante von Sauerstoff in Wasser
K_{MM}	Michaelis-Menten Konstante
K_{SV}	Stern-Volmer Konstante
k_q	Löschungskonstante
KCl	Kaliumchlorid
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
L	
L	Liter, Spule
L-15	Leibovitz Medium
λ	Wellenlänge
LiPc	Lithium Phthalocyanin
M	
m	Meter
M	Molarität (mol/L)
MCF-7	<i>Michigan Cancer Foundation-7</i>
MEM	Minimum Essential Medium
MFT	<i>Multi-Frequency/Time</i>

Anhang

min	Minuten
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule, Maßeinheit für den Druck
MR	Magnetische Resonanz
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
N	
n	nach außen-gerichteter Normalenvektor mit Länge 1
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamadenindinukleotidphosphat
∇	Nabla-Operator
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
O	
O ₂	Molekularer Sauerstoff
OCR	<i>Oxygen Consumption Rate</i>
ODDD	<i>Oxygen-Dependent Degradation Domain</i>
ODE	Gewöhnliche Differentialgleichung
P	
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PBS ⁻	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺)
PC	Polycarbonat

PDE	Partielle Differentialgleichung
PDMS	Polydimethylsiloxan
PdBMAP	Pd(II)tetramethacryliertes Benzoporphyrin
PdTCPP	meso-tetra (4-carboxyphenyl)porphinylpalladium
PET	Positronen-Emissions-Tomographie, Polyethylenterephthalat
PFC	Perfluorierte Kohlenwasserstoffe
pH	Potential des Wasserstoffs
φ	Phasenverschiebung
Ψ	Basisfunktion
PKM	Phasenkontrastmikroskop
P/S	Penicillin/Streptomycin
PtTFPP	Pt(II)-tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin
Px	Pixel
R	
R	Widerstand, Sauerstoffverbrauchsrate
R_{O_2}	Lokale Sauerstoffverbrauchsrate
R_{max}	Maximale volumenbezogene Sauerstoffverbrauchsrate
r	Radius
Re	Realteil
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur

S	
s	Sekunden, Membrandicke
SECM	<i>scanning electrochemical microscopy</i>
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
sin	Sinus
step	Stufenfunktion
StO ₂	Sauerstoffsättigung
T	
t	Zeit
τ	Lebensdauer
T ₀	Ungequenchte Lebensdauer
TEER	<i>Transepithelial Electrical Resistance</i>
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TD	Verdopplungszeit
U	
U	Spannung, Umdrehungen
U ₀	Amplitude der Spannung
U(t)	Spannung zum Zeitpunkt t
U373-MG	Humane Glioblastomzellen
V	
V ₀	Anfangsvolumen
V(t)	Volumen des Sphäroids zum Zeitpunkt t
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor

W	
ω	Winkelfrequenz mit $\omega = 2\pi$
w	Testfunktion
X	
X	Reaktanz
Z	
Z	Komplexe Impedanz
Z	Betrag der Impedanz
Präfix-Abkürzungen	
k-, h-, c-, m-, μ -, n-, p-, f-, a-	kilo- (10^3), hekto- (10^2), centi- (10^{-2}), milli- (10^{-3}), micro- (10^{-6}), nano- (10^{-9}), pico- (10^{-12}), femto- (10^{-15}), atto- (10^{-18})
Sonstiges	
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
%	Prozent
° C	Grad Celsius
v/v	Volumenkonzentration
w/v	Massenkonzentration

10.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien

A	
Agarose	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Argon Plasma PDC 32G-2	Harrick Plasma, Ithaka, USA
Autoklav DX-45	Systemec GmbH & Co. KG, Linden, Deutschland
B	
Bunsenbrenner für die Zellkultur	IBS Tecnomara GmbH, Fernwald, Deutschland
C	
Calcein-AM	Invitrogen, Darmstadt Deutschland
COMSOL Multiphysics®	COMSOL Multiphysics GmbH, Göttingen, Deutschland
D	
DMSO	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Digitalkamera D5000	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
E	
ECIS® Z-Theta	Applied BioPhysics Inc., New York, USA
ECIS® Elektrodenarrays (8W10E+)	Applied BioPhysics Inc., New York, USA
EDTA	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
F	
FCS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Permeable Kultursubstrate	Transwell®-Membraneinsatz, Corning Inc., New York, USA cellQART®-Membraneinsatz, Sabeu GmbH & Co. KG, Northeim, Deutschland
G	
L-Glutamin	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Gefrierschrank (-80 °C) HERAfreeze HTC series	Thermo Fisher Scientific Inc., Marietta, USA
Gefrierschrank (-20 °C)	Constructa-Neff Vertriebs-GmbH, München, Deutschland
Glasringe	Glasbläserei Universität Regensburg, Regensburg, Deutschland
H	
Hämozytometer vom Buerker Typ	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
HEPES (20 mM)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
I	
Isopropanol Bad Mr. Frosty™	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
K	
Kryoröhrchen	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
L	
Laminar-Flow-Haube HERAsafe	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Leibovitz Medium L-15	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

M	
Mikroskop Nikon Diaphot (Phasenkontrast)	Nikon Instruments Europe, Amstelveen, Niederlande
Mikroskop Nikon Eclipse 90i (CLSM)	Nikon Instruments Europe, Amstelveen, Niederlande
O	
Orbitalschüttler KM-2-AKKU	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
P	
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging Inc., Chicago, USA
PBS ⁻	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Pipetten (2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL)	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Pipettenspitzen (10 µL, 200 µL, 1000 µL)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Poly-L-Lysin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PrestoBlue [™]	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Pyruvat (100 mM)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
S	
Sauerstoffsensorfolie SF-RPSu4	PreSens GmbH, Regensburg, Deutschland
Korasilon Silikonpaste	Kurt Obermeier GmbH & Co. KG, Bad Berleburg- Raumland, Deutschland
Stickstofftank German Cryo GC-BR2150 M	Jutta Ohst german-cryo GmbH, Jüchen, Deutschland

Spritze (10 mL)	Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Spritzenvorsatzfilter (Porendurchmesser 0,2 µm)	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
T	
Tecan GENios	Tecan GmbH, Crailsheim, Deutschland
Trypsin 0,05 % (w/v)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
W	
Wasserbad TW12	Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland
Z	
Zentrifuge Heraeus 1-SR	Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, USA
Zentrifugenröhrchen (15 mL, 50 mL)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturplatten (96-Well; 24-Well; 12-Well)	Greiner-Bio GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturmedium MEM	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Zellkulturinkubator Heraeus (37 °C, 5 % CO ₂)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Zellkulturinkubator Heraeus (37 °C, 0 % CO ₂)	MMM Medcenter Einrichtungen GmbH, Planegg / München, Deutschland
Zellkulturinkubator Heraeus (37 °C, 0 % CO ₂) (Sphäroide)	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Zellkultur Petrischalen (d = 3,5 cm)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

10.4 Curriculum Vitae



Persönliche Informationen

Name	Linda Frank
Geburtsdatum	02.04.1992
Geburtsort	München
Nationalität	Deutsch

Hochschulstudium und Schulbildung

10/2023 – laufend	Mitarbeiterin im wissenschaftlichen Außendienst Janssen-Cilag GmbH (Teil von Johnson & Johnson)
07/2020 – 08/2023	Promotionsstudentin zur Erlangung des Doktorgrades in den Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) Arbeitsgruppe Bioanalytik und Biosensorik, Prof. Dr. J. Wegener Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik Universität Regensburg
10/2017 – 03/2020	Wirtschaftschemie (B.Sc.) Universität Regensburg
04/2017 – 08/2017	Master of Education (M.Ed.) Chemie/Mathematik/Psychologie/Pädagogik Universität Regensburg
04/2016 – 08/2017	Bachelor of Education (B.Ed.), Chemie/Mathematik/Psychologie/Pädagogik Universität Regensburg
10/2011 – 09/2017	Lehramt Gymnasium, Chemie/Mathematik Universität Regensburg
09/2002 – 05/2011	Allgemeine Hochschulreife, Robert-Schuman-Gymnasium Cham

10.5 Danksagung

Diese Arbeit war nur durch die großartige Unterstützung einiger Personen in den letzten Jahren möglich.

In erster Linie möchte ich mich aus tiefstem Herzen bei meinen Eltern bedanken, die alle Höhen und Tiefen mit mir überwunden haben. Ihr wart stets meine erste Anlaufstelle und ich konnte mich zu jedem Zeitpunkt bedingungslos auf euch verlassen. Vor allem die mentale Unterstützung in den letzten Monaten werde ich euch nie vergessen. ♥

Größtmöglicher Dank richtet sich auch an Prof. Dr. Joachim Wegener für das interessante Promotionsthema. Auch wenn der Sprung in die Welt der finiten Elemente nicht immer einfach war, konnte ich dies doch, dank deiner Unterstützung, meistern.

Ebenfalls möchte ich mich bei Prof. Dr. Achim Göpferich bedanken für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie bei Apl. Prof. Dr. Rainer Müller für den Prüfungsvorsitz.

Bei Prof. Dr. Oliver Tepner möchte ich mich nicht nur für die Übernahme des Amtes des Drittprüfers bedanken, sondern auch für die schöne Zeit als Teammitglied in der Didaktik. Zudem hast du zu keiner Sekunde gezögert mich auch auf der letzten Etappe meines akademischen Weges zu unterstützen.

Besonders hervorheben möchte ich Dr. Stefanie Michaelis. Liebe Steffi, du warst nicht nur fachlich die letzten drei Jahre stets mit Rat und Tat an meiner Seite – zuletzt bei der Korrektur meiner Arbeit. Auch privat hattest du stets ein offenes Ohr für mich. Du bist mir in den letzten drei Jahren sehr ans Herz gewachsen und ich werde mich immer gern an unsere gemeinsamen Kaffeepausen oder kulinarischen Momente mit einem Gartenzwerg ☺ erinnern. Auf viele weitere schöne gemeinsame Erlebnisse in der Zukunft!

Bedanken möchte ich mich auch bei Sandra Gierlich, die im Rahmen ihrer Bachelorarbeit an einer Studie dieser Arbeit beteiligt war.

Danke auch an Dennis Trautwein für den Crashkurs in finiten Elementen sowie Ben Münch und Prof. Dr. Sven Hilbert für die Unterstützung bei statistischen Angelegenheiten.

Ein Dank richtet sich auch an die Arbeitsgruppe Wegener für die gemeinsame Zeit im Allgemeinen, die Kaffeepausen, Betriebsausflüge und sonstige außeruniversitären Events (Golfkurse, etc.).

Der letzte Dank geht an meine guten Freunde, die immer für mich da waren, für die nötige Abwechslung gesorgt haben und stets Interesse für meine Arbeit gezeigt haben, auch wenn es oft noch so nerdig war. 😊

10.6 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Vor Aufnahme der obigen Versicherung an Eides statt wurde ich über die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung belehrt.

Ort, Datum, Unterschrift