

**Charakterisierung und numerische  
Simulation an Hautmodellen in einem  
Multi-Organ-Chip**

**Von Promotionsausschuss der  
Technischen Universität Hamburg**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor-Ingenieur (Dr.-Ing.)

genehmigte Dissertation

von  
Hao-Hsiang Hsu

aus  
Berlin

2019

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr.-Ing. Hoc Khiem Trieu

Erstgutachter: Prof. Dr.-Ing. Ralf Pörtner

Zweitgutachter: Prof. Dr. habil. Michael Morlock

Tag der Mündlicher Prüfung: 29.08.2019

# Danksagung

Zuerst möchte ich mich sehr bei Herr Prof. Pörtner bedanken, der mir diese Doktorarbeit erst ermöglicht hat und als Doktorvater sowie Erstgutachter fungiert. Ohne seine Hilfe wäre dieses Projekt gar nicht zustande gekommen. Auch hat er mir immer mit gutem Rat und Tat zur Seite gestanden und Mut zu gesprochen.

Anschließend möchte ich mich bei Prof. Morlock als Zweitgutachter und Prof. Trieu für die Übernahme des Amtes als Prüfungsausschussvorsitzender bedanken.

Ein großer Dank geht an meine Arbeitskollegen Christiane Schaffer, Rebecca Faschian und Grit Blume, die immer für mich da waren und mir viel geholfen und mich unterstützt haben.

Auch möchte ich mich sehr bei meinen Studenten bedanken, die fleißig an dem Projekt mitgewirkt haben.

Vielen lieben Dank geht auch an Jörg Schlutter, Gabriella Mielke und Johannes Möller für deren große Unterstützung und Hilfe bei der Korrektur.

Zuletzt gebührt mein Dank meiner Familie, die mir überhaupt erst ermöglicht hat soweit zu kommen.



# Zusammenfassung

Die Substanztestung mit humanen Hautmodellen gewinnt mehr und mehr an Bedeutung, gerade im Bereich der Kosmetik, da hier in Europa Tierversuche mittlerweile verboten sind. Auch in der Pharmazie werden Wirksubstanzen über die Haut verabreicht, wodurch eine Substanztestung notwendig ist. Hier geht der Trend auch dahin, Alternativen für Tierversuche zu finden, wobei das Konzept „organ-on-a-chip“ einen interessanten Lösungsansatz verspricht.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung und numerischen Simulation von *in vitro* hergestellten Hautmodellen in einem „organ on a chip“-System. Für diesen Zweck wurde eine Methode zur Messung der Permeation von Substanzen durch Vollhautmodelle in einem kleinen 96 Well Membran-Einsatzsystem (MES) etabliert. Diese Methode wurde auf ein „organ on a chip“-System erweitert. Unterstützend wurde eine mathematische Simulation aufgebaut, welche die Diffusionsvorgänge beschreibt und die Diffusionsparameter ermittelt.

Zunächst wurde die etablierte Methode zur Bestimmung der Permeation überprüft. Es wurde untersucht, ob die Messungen reproduzierbar sind und welche Parameter die Messgröße beeinflussen. Hierbei wurde festgestellt, dass verschiedene Parameter wie Systemgröße, Molekülgröße und Membranbeschaffenheit der MES einen Einfluss auf die Permeation besitzen. Weiterhin wurde untersucht, ob die Messmethode geeignet ist, Hautmodelle zu charakterisieren. Anhand von 3D Zellmodellen wurden die Messempfindlichkeit geprüft. Zusätzlich wurde gezeigt, dass der Glukoseverbrauch und die Laktatproduktion als Indikatoren für die Nährstoffversorgung und die metabolische Aktivität der Zellen in einem 96 Well MES gut bestimmbar sind.

Des Weiteren beschäftigt sich die Arbeit mit der Permeationsmessung an Hautmodellen. Es wurden handelsübliche und vom Projektpartner (TU Berlin) entwickelte Modelle untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass ein handelsübliches Hautmodell mit einem Permeationskoeffizienten von  $6,87 \times 10^{-10} - 8,40 \times 10^{-10}$  m/s (Fluorescein Natrium als Substanz) die besten Barriereigenschaften besitzt. Die Permeationskoeffizienten der entwickelten Vollhautmodelle lagen im Wertebereich von  $0,88 \times 10^{-8} - 5,59 \times 10^{-8}$  m/s. Diese Messmethode ist des Weiteren geeignet, die Barriereigenschaften und somit die Qualität der Vollhautmodelle während der Kultivierung zu verfolgen. Es wurde im nächsten Schritt die Applikation von Nanopartikeln auf handelsübliche Hautmodelle analysiert. Hierzu wurden Kryoschnitte angefertigt, um die Partikel unter dem Mikroskop zu lokalisieren.

Abschließend wurde eine numerische Simulation zu den zwei vorangegangenen Untersuchungen erstellt. Die Simulation zeigte sehr gute Übereinstimmungen zu den ermittelten Daten bei Substanzen mit kleinen Partikelgrößen von bis zu 4 kD. Bei größeren Partikeln trat eine anormale Diffusion auf. Zusätzlich wurden Simulation an ein „*organ-on-a-chip*“ System adaptiert. Die experimentellen Werte lagen im Rahmen der Simulation. Ebenso konnten mit Hilfe der Optimierung die Diffusionskoeffizienten zu den jeweiligen Permeationsversuchen bestimmt werden. Der Glukoseverbrauch und die Laktatproduktion konnte mit Hilfe des Programmes sehr genau simuliert werden. Die Simulation kann helfen, Experimente zu unterstützen und den experimentellen Aufwand zu reduzieren.

# Abstract

Nowadays substance testing with human skin models is getting more important, especially in the field of cosmetic, where in Europe animal testing is forbidden. Even in pharmacy active substances can be applied on skins and substance testing is needed. Here the trend is also moving toward alternatives for animal testing. The concept “*organ-on-chip*” promises to be an interesting solution.

This work is focused on the characterization and numerical simulation of *in vitro* generated skin models in an “*organ-on-a-chip*” system. For this purpose, a method to measure the substance permeation of a full thickness skin equivalent in a small 96 well membrane insert system (MIS) was established. This method was enhanced and transferred to an “*organ-on-a-chip*” system. To support the measurement method additionally a simulation was established, which describes the diffusion process and determines diffusion parameters.

First, the established method to determine permeation was tested. It was examined which parameters influence the measuring method and whether the measurement is reproducible. It has been observed that parameters like the size of the system, molecular size of the substance and membrane structure of the MIS can influence the permeation. Furthermore, it was examined whether the measuring method is suitable to characterize skin models. The measurement sensitivity was tested using 3D cell models. Additionally, it is possible to determine the glucose consumption and lactate production in the 96 well MIS. These are important culture parameters and ensure the nutrition supply.

Next, this work is dealing with the permeation measurement of skin models. Commercially available skin models and full thickness skin equivalent developed from the project partner (TU Berlin) were investigated. It was found out that the permeation coefficients of the commercial skin models were in the range of  $6.87 \times 10^{-10}$  to  $8.40 \times 10^{-10}$  m/s (fluorescein sodium salt as substance). These are the highest detected coefficients. The permeation coefficients of the full thickness skins equivalent are in the range of  $0.88 \times 10^{-8}$  to  $5.59 \times 10^{-8}$  m/s. This method is further suitable to detect the barrier characteristic and the quality of the skin model during the cultivation. The next step was to investigate the application of nanoparticles to commercially available skin models. Cryosections were made to locate the particles under the microscope.

At last, different numerical simulations of the two investigations mentioned before were established. The simulations show a good coherence to the measured data for substances

with small molecular size up to 4 kD. For particles with a larger size anormal diffusion occurs. Furthermore, the simulation was adapted to the 2OC system. The results of the simulation are in the range of the experimental data. With the help of the simulation the diffusion coefficient can be calculated. Even the glucose consumption and lactate production can be well described by the simulation. The simulation supports the experiments and reduces the experimental effort.

# Aus dieser Arbeit hervorgegangene Publikationen

## Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Hao-Hsiang Hsu and Katharina Schimek, Moritz Boehme, Jacob Jan Kornet, Uwe Marx, Roland Lauster, Ralf Pörtner and Gerd Lindner; Bioengineering of a Full-Thickness Skin Equivalent in a 96-Well Insert Format for Substance Permeation Studies and Organ-On-A-Chip Applications; (2108) bioengineering; DOI: 10.3390/bioengineering5020043

Hao-Hsiang Hsu, Katharina Schimel, Uwe Marx and Ralf Pörtner; Measurement and Simulation of Permeation and Diffusion in Native and Cultivated Tissue Constructs; (2108) Biomaterial in Regenerative Medicine, Edited by Leszek A. Dobrzański, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.72904

Hao-Hsiang Hsu, John-Kevin Kracht, Laura Elisabeth Harder, Kerstin Rudnik, Gerd Lindner, Katharina Schimek, Uwe Marx and Ralf Pörtner; A Method for Determination and Simulation of Permeability and Diffusion in a 3D Tissue Model in a Membrane Insert System for Multi-well Plates; (2018) jove; DOI: 10.3791/56412

Hao-Hsiang Hsu, Laura Elisabeth Harder, Gerd Lindner, Uwe Marx and Ralf Pörtner; A method to determine and simulate the permeation through a gel matrix in a multi-organ-chip; (2015) BMC Proceeding; DOI: 10.1186/1753-6561-9-S9-P77

## Vorträge

FSP Seminar „Regeneration, Implantate, Medizintechnik“ 2017

Hao-Hsiang Hsu; Development of a method for the simulation and characterization of diffusion process in skin models in multi-organ-chips

COMSOL Conference 2018 in Lausanne

Hao-Hsiang Hsu, Katharina Schimek, Moritz Boehme, Jacob Jan Kornet, Uwe Marx, Ralf Pörtner; Characterization of chemical and physical parameter of a full thickness skin equivalent in a two-organ-chip.

## **Poster Präsentationen**

Dechema 3D Cell Culture 2014 – Advanced Model Systems, Applications & Enabling Technologies in Freiburg

Hao-Hsiang Hsu, Gerd Lindner, Frank Sonntag, Uwe Marx und Ralf Pörtner; Permeation of a fluorescent Substance through a Gel Matrix in a Multi-Organ-Chip and Simulation of this System with COMSOL Multiphysics

COMSOL Conference 2015 in Grenoble

Hao-Hsiang Hsu, Gerd Lindner, Uwe Marx und Ralf Pörtner; Simulation of Diffusion/Permeation through a Gel Matrix in a Multi-Organ-Chip

24<sup>th</sup> ESACT C2P2: Cell, Culture, Patient, Products in Barcelona 2015

Hao-Hsiang Hsu, Laura Elisabeth Harder, Gerd Lindner, Uwe Marx und Ralf Pörtner; A Method to Determine and Simulate the Permeation through a Gel Matrix in a Multi-Organ-Chip

Organ-On-A-Chip World Congress 2016 & 3D-Culture in Boston

Hao-Hsiang Hsu, Stephan Fallis, Jacob Kornet, Gerd Lindner, Uwe Marx und Ralf Pörtner; Simulation of Diffusion and Metabolic Activity within a Cell containing Collagen Gel in a Multi-Organ-Chip

Dechema 3D Cell Culture 2018 in Freiburg

Hao-Hsiang Hsu, Katharina Schimek, Uwe Marx und Ralf Pörtner; Permeation Measurement for 3D Skin Culture in a Membran Insert System

# Inhaltsverzeichnis

<b>Nomenklatur</b> .....	ix
<b>Physikalische Größen</b> .....	ix
<b>Verzeichnis der Abkürzungen</b> .....	xi
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	xiii
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	xvi
1 Einleitung und Zielsetzung .....	1
2 Grundlagen und Stand der Technik .....	5
2.1 Aufbau der Haut, Hautmodelle und deren Funktion als Barriere .....	5
2.2 Konzept des „organ-on-a-chip“ und Aufbau des 2OC .....	10
2.3 Diffusion/Permeation, Hydrogele und Nanopartikeln .....	13
2.4 Energiestoffwechsel der Zelle und in der Haut .....	22
2.5 Theorie und Hintergrund zur numerischen Simulation .....	23
3 Materialien und Methoden .....	28
3.1 Materialien und Software .....	28
3.2 Zellkultur und Hautmodelle .....	32
3.3 Methode und Charakterisierung der Permeationsmessung in 2OC und MES .....	36
3.4 Histologie .....	45
3.5 Auswertung und Messgeräte .....	47
3.6 Numerische Simulation .....	49
4 Charakterisierung der Messmethoden zur Bestimmung der Permeation .....	58
4.1 Ergebnisse der Messmethoden zur Bestimmung der Permeation .....	58
4.2 Diskussion der methodischen Entwicklung .....	69
5 Untersuchungen mit Hautmodellen .....	74
5.1 Ergebnisse der Permeationsuntersuchungen mit Hautmodellen .....	74
5.2 Permeationsmessung mit Nanopartikeln auf EpiDerm™ .....	85
5.3 Diskussion der Untersuchungen mit Vollhautmodellen .....	90
6 Numerische Simulation .....	96
6.1 Ergebnis der numerischen Simulation .....	96
6.2 Diskussion der Simulation .....	107
7 Fazit und Ausblick .....	112
8 Anhang .....	115

8.1	Bestimmung der Reynolds- und Machzahl .....	115
8.2	Beschichtung der Zellkulturflaschen mit Kollagen A .....	116
8.3	Methode zur Kultivierung der Zell- und Vollhautmodelle.....	116
9	Referenzen .....	121

# Nomenklatur

## Physikalische Größen

$c_A$ :	Akzeptorkonzentration $\left[\frac{mol}{m^3}\right]$
$V_A$ :	Akzeptorvolumen $[m^3]$
$r^2$ :	Anpassgüte $[/]$
$n$ :	Anzahl der Messpunkte $[/]$
$\bar{l}$ :	Charakteristische Länge $[m]$
$\rho$ :	Dichte $\left[\frac{kg}{m^3}\right]$
$A$ :	Diffusionsfläche $[m^2]$
$D$ :	Diffusionskoeffizient $\left[\frac{m^2}{s}\right]$
$h$ :	Diffusionsstrecke $[m]$
$c_D$ :	Donatorkonzentration $\left[\frac{mol}{m^3}\right]$
$p$ :	Druck $[Pa]$
$\eta$ :	Dynamische Viskosität $[Pa \cdot s]$
$y_i$ :	Experimenteller Wert $[/]$
$J$ :	Fluss $\left[\frac{mol}{m^2s}\right]$
$y_m$ :	Gemittelter Wert der experimentellen Daten $[/]$
$C$ :	Konzentration $\left[\frac{mol}{m^3}\right]$
$c_{MD}$ :	Konzentration an der Donator/Membran-Phasengrenze $\left[\frac{mol}{m^3}\right]$
$c_{MA}$ :	Konzentration an der Membran/Akzeptor-Phasengrenze $\left[\frac{mol}{m^3}\right]$
$Ma$ :	Machzahl $[/]$
$m_A$ :	Masse im Akzeptor $[kg]$
$\mu$ :	Mittelwert $[/]$
$P$ :	Permeationskoeffizient $\left[\frac{m}{s}\right]$

$R$ :	Reaktionsrate des Substrates $\left[\frac{\text{mol}^3}{\text{m}^3\text{s}}\right]$
$Re$ :	Reynoldszahl [/]
$a$ :	Schallgeschwindigkeit $\left[\frac{\text{m}}{\text{s}}\right]$
$y_s$ :	Simulierter Wert [/]
$\sigma$ :	Standardabweichung [/]
$x, y, z$ :	Strecke/Weg in x, y, z Richtung [m]
$z$ :	Strecke/Weg [m]
$c_v$ :	Variationskoeffizient [%]
$u$ :	Vektorgeschwindigkeit $\left[\frac{\text{m}}{\text{s}}\right]$
$K_A$ :	Verteilungskoeffizient zwischen Akzeptor und Membran [/]
$K_D$ :	Verteilungskoeffizient zwischen Donator und Membran [/]
$\nu$ :	Viskosität $\left[\frac{\text{m}^2}{\text{s}}\right]$
$t$ :	Zeit [s]

## Verzeichnis der Abkürzungen

2OC	2-Organ-Chip
ASAP (A)	L-Ascorbinsäure-2-Phosphat
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	Varianzanalyse
ATP	Adenosintri-phosphat
C525	CANdot® quantum dot (CdSe core/shell/shell) 525 nm
C600	CANdot® quantum dot (CdSe core/shell/shell) 600 nm
CAD	Computer Aided Design
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
CdT	Cadmium Tellurid
CFD	Computational Fluid Dynamics
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym A
CQD	Carbon Quantum Dot
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
D10	DMEM + 10 % FBS + P/S
D05	DMEM + 5 % FBS + P/S
D10A	DMEM 10 + 50 µg/ml ASAP
DL	Derma Life Medium
E1	Epi Life Medium + HKGS + P/S
E2	E1 + 1,5 mM CaCl <sub>2</sub>
E3	E2 + 50 µg/ml ASAP + 5 ng/ml KGF
FBS	Fetales Bovines Serum
FCS	Fluorescence Correlation Spectroscopy
FD	FITC-Dextran (Fluorescein Isothiocyanate-Dextran)
Fibro	Fibroblasten
FN	Fluorescein Natrium
FRAP	Fluorescence Recovery After Photobleaching
FTIR	Fourier Transform Infrared
H <sub>2</sub> O	Wasser (bidestiliert)
HaCaT	Human Adult Keratinocyte Low Calcium High Temperature
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HCL	Salzsäure
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HKGS	Human Keratinocyte Growth Supplement
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

KGF	Keratinocyte Growth Factor
MES	Membran-Einsatzsystem (für Multititerplatte)
MOC	Multi-Organ-Chip
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinucleotid
NADH	Mit H <sup>+</sup> reduziertem NAD <sup>+</sup>
NaOH	Natriumhydroxid
PC	Polykarbonat
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Polyethylen
PDE	Partial Differential Equation
PEEK	Polyetheretherketon
PDH	Pyruvat Dehydrogenase
PDMS	Polydimethylsiloxan
P/S	Penicilline/ Streptomycin
PTFE	Polytetrafluorethylen
Q525	Qtracker <sup>®</sup> 525 Cell Labeling Kit
SNOPT	Sparse Nonlinear Optimizer
STABW	Standardabweichung
TEER	Trans-Epithelial Electric Restistance
TGF	Transforming Growth Factor
TW	Transwell <sup>®</sup>
ULA	Ultra Low Attachment

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Aufbau der Haut .....	7
Abbildung 2.2: Aufbau der Epidermis .....	7
Abbildung 2.3: Aufbau der Dermis .....	8
Abbildung 2.4: Vereinfachte Ziegeldarstellung der Haut und die drei möglichen Penetrationswege einer Substanz .....	9
Abbildung 2.5: EpiDerm™ von MatTek, Kultivierungsgefäß und histologischer Schnitt. Phenion von Henkel, Probe und histologischer Schnitt.....	10
Abbildung 2.6: Schematischer Aufbau des 2OC der TissUse GmbH.....	12
Abbildung 2.7: Darstellung von Diffusion und Permeation von Teilchen in einem System.....	15
Abbildung 2.8: Schematische Darstellung einer Membran (mit der Dicke h und der Fläche A) mit Donator und Akzeptor. ....	15
Abbildung 2.9: Schematischer Aufbau einer Franz-Diffusionszelle.....	18
Abbildung 2.10: Schematische Darstellung der Konzentration über der Zeit zur Darstellung verschiedener Diffusionszustände .....	20
Abbildung 2.11: a) Schematische Darstellung der Glukose-Verstoffwechslung in der Zelle über die Atmungskette. b) Schematische Darstellung der Glukose-Verstoffwechslung direkt über eine Reduktion des Pyruvates in Laktat ...	23
Abbildung 3.1: Arbeitsschritte zu Generierung des Vollhautmodells.....	35
Abbildung 3.2: Darstellung und Benennung der Einzelteile für den 2OC .....	37
Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des Permeationsversuchs in einem MES. ....	38
Abbildung 3.4: Schematische Darstellung des Permeationsversuch im 2OC. ....	40
Abbildung 3.5: Schematische Darstellung der Permeationsbestimmung.....	41
Abbildung 3.6: Geometrie und Vernetzung der MES für die Simulation. ....	52
Abbildung 3.7: Geometrie der 2OC in der Simulation.....	56
Abbildung 3.8: Geometrie für die die Strömungssimulation des 2OCs. ....	57
Abbildung 4.1: Vergleich von Permeationsversuchen in verschieden großen MES.....	59
Abbildung 4.2: Permeationskoeffizient bei verschiedenen Membranen für MES .....	61
Abbildung 4.3: Die experimentell ermittelten Permeationskoeffizienten als Funktion über dem 1/Stokes Radius aufgetragen .....	62
Abbildung 4.4: Repräsentative HE Färbung des Zellmodells. ....	63
Abbildung 4.5: Permeationskoeffizienten zu den verschiedenen Zellmodellen als Balkendiagramm dargestellt .....	65
Abbildung 4.6: Peremationskoeffizienten zu verschiedenen Fibroblastenmengen im Gel als Balkendiagramm. ....	66
Abbildung 4.7: Permeationsversuch in 2OC. ....	67

Abbildung 4.8: Glukose- und Laktatkonzentration bei der Kultur eines Zellmodells bestehend aus Kollagengel, HaCaT und Fibroblasten .....	68
Abbildung 4.9: HE Färbung der Zellmodelle.....	69
Abbildung 5.1: Histologischer Schnitt von Vollhautmodell 1.....	75
Abbildung 5.2: Darstellung der Permeationskoeffizienten als Balkendiagramm aus den Permeationsversuchen in 2OC mit FN durch Vollhautmodell 2.....	77
Abbildung 5.3: Makroskopische Darstellung der Vollhautmodelle.....	77
Abbildung 5.4: Histologische Schnitte der Modellkonstrukte mit HE Färbung .....	78
Abbildung 5.5: Darstellung der Permeationskoeffizienten über der Zeit aus der Messung mit Vollhautmodell 3 .....	80
Abbildung 5.6: Histologische Schnitte des Vollhautmodells 3 nach den Permeationsuntersuchungen .....	80
Abbildung 5.7: Darstellung des Permeationskoeffizientenvon FN durch Vollhautmodell 3 in Transwell und 2OC nach 36 und 43 Tage Kultur.....	81
Abbildung 5.8: Histologische Schnitte mit HE Färbung des Vollhautmodell 3 zu unterschiedlichen Kultivierungszeitpunkten .....	82
Abbildung 5.9: Glukoseverbrauch und Laktatproduktion bei Vollhautmodell 3 während verschiedener Kultivierungszeitpunkten .....	84
Abbildung 5.10: Erste Permeationsmessung von Nanopartikeln auf EpiDerm™ .....	86
Abbildung 5.11: Zweite Permeationsmessung von Nanopartikeln auf EpiDerm™ .....	87
Abbildung 5.12: Fluoreszenzmikroskopische Bilder aus dem ersten Permeationsversuch mit Nanopartikeln auf EpiDerm™ Hautmodellen.....	88
Abbildung 5.13: Fluoreszenzmikroskopische Bilder aus den zweiten Permeationsversuch mit Nanopartikeln auf EpiDerm™ Hautmodellen.....	89
Abbildung 5.14: HE Färbung der EpiDerm™ Hautmodelle nach der Permeationsmessung. ....	90
Abbildung 5.15: Kontraktion der Vollhautmodelle in einen 96 Well MES.....	94
Abbildung 6.1: Vergleich der experimentellen Daten aus dem Permeationsversuch in einem 96 Well MES mit der Optimierungssimulation. ....	98
Abbildung 6.2: Simulation der Diffusion von Fluorescein Natrium (0,1 mg/ml) durch 2 % Agarosegel .....	99
Abbildung 6.3: Donator- und Akzeptorkonzentration über die Zeit bei einer Simulation von FN (0,1 mg/ml) durch 2 % Agarosegel in einem 96 TW System. ....	100
Abbildung 6.4: Simulation des Permeationsversuchs mit FN (0,1 mg/ml) durch 2 % Agarosegel in einem 12 und 96 Well MES .....	101
Abbildung 6.5: Konzentrationsverlauf über die Bodenlänge zu verschiedenen Zeitpunkten in einem a) 96 Well MES und b) 12 Well MES System .....	102
Abbildung 6.6: Simulation des Permeationsversuchs von FN durch Agarosegel in 2OC.	103

Abbildung 6.7: Simulation des Permeationsversuchs mit FN durch 2 % Agarosegel mit und ohne Fluidfluss .....	104
Abbildung 6.8: Vergleich der Simulation und Permeationsversuche.....	106
Abbildung 6.9: Simulation des Glukoseverbrauchs und Laktatproduktion eines Zellmodells in einem 96 Well MES.....	107
Abbildung 6.10: Simulation des Permeationsversuchs mit FD40.000 durch 2 % Agarosegel. ....	109
Abbildung 6.11: Indirekte Validierung der Diffusions- und Strömungssimulation im COMSOL Multiphysics.....	111
Abbildung 8.1: Herausgeschnittene 96 MES 2x8 Streifen in der Petrischale (mit Hautmodellen) und die Position der PDMS Abstandshalter.....	117
Abbildung 8.2: 96 Well MES in der Petrischale (ohne Hautmodelle) und die Benetzung der Membran mit Medium. ....	117
Abbildung 8.3: Darstellung der Transwell <sup>®</sup> Halterung aus Polykarbonat (links) und die Positionierung in der 48 Well-Platte (rechts).....	118

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Laborgeräte und -Equipment.....	28
Tabelle 3.2: Verbrauchsmaterialien. ....	29
Tabelle 3.3: Chemikalien, Puffer und Lösungen.....	30
Tabelle 3.4: Wachstumsmedium. ....	31
Tabelle 3.5: Pipettiervolumen für den Permeationsversuch in einem 12 und 96 MES. ....	38
Tabelle 3.6: Lister der verwendete Quantum Dots .....	42
Tabelle 3.7: Arbeitsprogramm zur Analyse der Methode.....	43
Tabelle 3.8: Arbeitsschritte zur Entwässerung. Die Proben wurden nacheinander in ein Gefäß mit aufsteigender Ethanolkonzentration eingelegt. ....	45
Tabelle 3.9: Geometrie-Parameter zur Erstellung der 96 und 12-Well MES für die Simulation.....	51
Tabelle 3.10: Auflistung der Elementargeößenparameter beim Vernetzen für die Geometrie des 96 Well MES. ....	53
Tabelle 3.11: Auflistung der Elementargeößenparameter beim Vernetzen für die Geometrie des 12 Well MES. ....	53
Tabelle 3.12: Verwendete Donatorkonzentration für die Simulation. ....	54
Tabelle 3.13: Elementargeößenparameter für das Vernetzen des 2OC Systems.....	56
Tabelle 4.1: Permeationskoeffizient von FN durch 2 % Agarosegel in einem 12- und 96 Well MES. ....	59
Tabelle 4.2: Permeationskoeffizient von FN durch 2 % Agarosegel in einem 96 MES mit unterschiedlichen Membranen. (N=6).....	60
Tabelle 4.3: Permeationskoeffizient der Substanzen mit verschiedenen molekularen Stokes Radien. Der Versuch erfolgte in einem 96er MES durch 2 % Agarosegel. (N=7).....	62
Tabelle 4.4: Permeationskoeffizienten aus dem Versuch mit FN durch Zellmodellein einem 12 MES. ....	64
Tabelle 4.5: Permeationskoeffizient aus dem Versuch mit FN durch Kol. + F. + H. Model mit verschiedener Fibroblastendichte in einem 96 Well MES.....	65
Tabelle 4.6: Glukoseverbrauch und Laktatproduktion von Zellmodellen bestehend aus Rattenschwanzkollagen und Matridem™. Die kurze Messung dauerte 6 bis 12 Stunden und die lange Messung dauert bis 71 Stunden. (Kol.=Rattenschwanzkollagen, H.=HaCaT, F.=Fibroblasten) .....	68
Tabelle 4.7: Variationskoeffizient der Permeationsversuche mit FN durch 2 % Agarosegel in einem 96 Well MES. ....	70
Tabelle 4.8: Porendichte für Transwells® aus Polykarbonat- und Polyestermembranen (Quelle: Hersteller Datenblatt) .....	71

Tabelle 5.1: Permeationskoeffizient von FN und FD4.000 für Vollhautmodel 1. ....	75
Tabelle 5.2: Permeationsmessung im 2OC mit FN durch EpiDerm <sup>TM</sup> . ....	76
Tabelle 5.3: Permeationskoeffizienten von Vollhautmodell 2 im 2OC. Untersucht wurde FN durch die Hautmodelle:.....	78
Tabelle 5.4: Ergebnis aus dem Permeationsversuch mit FN durch Vollhautmodel 3 in 2OC. Untersucht wurde die Permeation zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten. ....	83
Tabelle 5.5: Die ermittelte Glukoseverbrauchsrate und Laktatproduktionsrate bei Vollhautmodel 3 zur verschiedenen Kultiverungszeitpunkten. ....	83
Tabelle 6.1: Diffusionskoeffizient aus der Simulation mit Parameteroptimierung. Es wurden die Werte aus dem Permeationsversuch in Tabelle 4.3 verwendet. ....	97
Tabelle 6.2: Diffusionskoeffizient aus der Parameterioptimierung und die Anpassgüte. Es wurden die Werte aus dem Permeationsversuch mit Vollhautmodel 3 verwendet. ....	105
Tabelle 8.1: Vorbereitung für das Fibringel .....	118



# 1 Einleitung und Zielsetzung

Die Haut ist das größte Organ des Menschen und erfüllt wichtige Funktionen. Sie schützt den Körper vor mechanischen Einflüssen, ultraviolettem Licht, Temperaturschwankungen und Dehydrierung. Zusätzlich besitzt die Haut auch sensorische Funktionen, wie das Empfinden von Temperatur, Druck und Schmerz [1]. Genau diese Eigenschaft der Haut als Barriere und die von Substanzen hervorgerufene dermale Reaktion ist ein wichtiger Aspekt in Bereich der Forschung, Kosmetik und Pharmazie. Zum Beispiel wird in der Pharmazie die epidermale Applikation in Form von Pflastern, Salben, Schaum oder Spray durchgeführt und genutzt [2], um Wirkstoffe mit geringer chemischer Resistenz gegen die Magensäure einzusetzen [3]. In der Hormontherapie wird der Reservoireffekt der Haut genutzt [4]. Eine Herausforderung für die dermale Applikation von Substanzen ist die Barriereeigenschaft der Haut. Bevor Kosmetika und pharmazeutische Wirkstoffe zum Einsatz kommen, müssen diese zunächst getestet werden, um Risiken abschätzen zu können und um Gefahren auszuschließen. Für die Substanztestung an der Haut werden heutzutage immer noch überwiegend Tierversuche verwendet. Hier ist der Draize Hautirritationstest mit Kaninchen eine gängige Methode [5]. Die Vergangenheit bewies jedoch, dass Medikamententests an Tieren nicht immer aussagefähig sind und Effekte bei Menschen auftreten, die im Versuch nicht beobachtet wurden [6–8]. In Jahr 2013 trat eine neue Regulation (EU-Cosmetic Directive No.1223/2009) in Kraft, welche Tierversuche für kosmetische Produkte untersagt. Aus diesem Grunde steigt der Bedarf an alternativen Prüfmethode für Kosmetikprodukte, bevor diese an menschlichen Probanden angewendet werden. Eine Lösung ist es, *in vitro* hergestellte Hautmodelle aus humanen Zellen zu verwenden. Diese werden bereits für Substanz- und Wirkstoffuntersuchungen verwendet [9,6].

Gerade bei der dermalen Applikation von pharmazeutischen Wirkstoffen ist die Haut nicht das Zielorgan. Hierbei müssen die Interaktionen mit anderen Organen betrachtet werden. Ein vielversprechender Ansatz hierfür ist das „*organ-on-a-chip*“-System. Der Grundgedanke hierbei ist es, mehrere kleinste funktionelle Elemente menschlicher Organe auf einer kleinen Plattform (Chip) abzubilden. Hierfür müssen Bedingungen geschaffen werden, die der natürlichen Umgebung entsprechen. Die dreidimensionale Kultivierung spielt hier eine große Rolle. Wichtige Faktoren sind hierbei die Topographie, fluiddynamische Bedingungen (z. B. Schubspannung) und Kultivierungsbedingungen [10,11]. Mittels Mikrokanälen oder auch Membranen können die Zellen miteinander in Verbindung gebracht werden, wodurch das menschliche Organsystem vereinfacht abgebildet werden kann [10,12].

Hinsichtlich der Substanztestung für Hautmodelle werden Nanopartikel kontrovers diskutiert. Diese finden ihren Einsatz in Kosmetikprodukten wie zum Beispiel in Form von Zinkoxid und Titanoxid in Sonnenschutzmitteln [13,14]. Für Medikamente sind Nanopartikel als Trägermaterial von Wirkstoffen interessant und für die Haut werden Silbernanopartikel in Cremes und antiseptischen Pflastern verarbeitet [15,16]. Toxische Wirkungen und Irritation von einigen Nanomaterialien sind bei der Anwendung auf der Haut bekannt [17]. Viele dieser Studien basieren auf Tierversuchen. Langzeitstudien mit miniaturisierten Hautmodellen aus humanen Zellen existieren bis jetzt noch nicht.

Eine weitere Methodik, welche in der Biotechnologie und Gewebeforschung immer mehr Einzug findet, ist die numerische Simulation. Diese Technik ist ein nützliches Hilfsmittel, um Prozesse zu verstehen, zu verbessern und zu unterstützen. In der Bioprozesstechnik wird die Simulation u. a. verwendet, um Experimente zu optimieren [18] und Zellwachstum zu analysieren [19]. Des Weiteren kommt die Simulation zum Einsatz, um Kultivierungsbedingungen von Geweben zu verbessern [20]. Gerade in der Entwicklung von „organ on a chip“-Systemen können numerische Simulationen genutzt werden, um nicht trivial messbare Effekte, wie zum Beispiel Fluss, Stoffverteilung oder Scherspannung zu untersuchen.

In Anbetracht dieser verschiedenen Aspekte sollten im Rahmen dieser Arbeit Hautmodelle in einem „organ on a chip“-System charakterisiert und der Einsatz einer numerischen Simulation für diesen Zweck bewertet werden. Es wurde eine Methode entwickelt, um die Permeation und Substanzkonzentration in einem kleinen Membran-Einsatzsystem (MES) zu bestimmen. Die Basis hierfür ist ein miniaturisiertes Vollhautmodell (entwickelt von der TU Berlin\*), welches in einem kleinen MES generiert werden kann. Es wurde untersucht, wie reproduzierbar diese Messmethode ist und welche Parameter einen Einfluss auf die Messung ausüben. Als Parameter wurden die Partikelgröße der applizierten Substanz sowie, die Größe und verschiedene Beschaffenheiten der Membran des MESs analysiert. Um die Messgenauigkeit der Methode zu charakterisieren, wurde die Permeation durch verschiedene Zellmodelle bestehend aus Fibroblasten und Keratinozyten betrachtet. Im Hinblick auf zukünftige Anwendungen für die Substanztestung in der Pharmazie und Kosmetikindustrie wurde die Messmethode direkt auf ein „organ-on-a-chip“-System transferiert. Hier wurden die Durchführbarkeit und Reproduzierbarkeit geprüft. Im nächsten Schritt folgten Untersuchungen an Hautmodellen. Es wurden Permeationsmessungen an *in*

---

\*Institut für Biotechnologie an der Technische Universität Berlin, Fachgebiet: Medizinische Biotechnologie, geleitet von Prof. Dr. rer. nat. Roland Lauster.

*in vitro* hergestellten Vollhautmodellen und kommerziell erhältlichen Modellen durchgeführt. Es folgte ein Vergleich der Permeationseigenschaften der Modelle und es wurde die Tauglichkeit und Fehleranfälligkeit der Methode erfasst. Zusätzlich wurden Langzeitversuche mit toxischen, sowie nichttoxischen Nanopartikeln auf kommerziellen Hautmodellen durchgeführt, um zu prüfen, ob Effekte im MES sichtbar sind.

Die TEER (*trans-epithelial electric resistance*) Messung ist eine Methode, die Qualität von *in vitro* gezüchteten Hautmodellen zu beurteilen. Diese Methode ist jedoch für ein kleines MES nicht geeignet. Aus diesem Grund wurde der Fokus zusätzlich daraufgelegt, zu untersuchen, ob die Messmethode in dieser Arbeit präzise genug ist, unterschiedliche Kultivierungsstadien von Hautmodellen zu identifizieren, um somit die Qualität bestimmen zu können.

Wie bereits beschrieben, wird die numerische Simulation immer mehr in der Biotechnologie eingesetzt. In dieser Arbeit wurde eine numerische Simulation entwickelt, welche die erwähnte Messmethode abbildet. Dabei soll mit Hilfe der Simulation der Diffusionskoeffizient *in situ* bestimmt werden. Die Simulation wurde bei der Permeationsmessung in MES und in einem „organ-on-a-chip“-System angewendet und es wurde untersucht, wie genau die Simulation die Messungen abbildet. Des Weiteren wurde analysiert ob die Simulation geeignet ist, die Messmethode zu unterstützen, um somit Aufwand und Zeit zu reduzieren. Gerade während der Untersuchung der Messmethode wurde festgestellt, dass nicht messbare, physikalische Effekte Einfluss auf die Permeation ausüben. Die Simulation wurde verwendet, um die nicht messbaren Effekte numerisch zu analysieren.

Diese Arbeit ist wie folgt aufgebaut. Zunächst werden in Kapitel 2 Grundlagen zu dem Aufbau der Haut und das Konzept von „organ-on-a-chip“ vorgestellt. Anschließend werden physikalische Hintergründe zu Diffusion und Permeation erläutert. Hierbei wird auch auf Hydrogele, Effekte in der Haut und Messmethoden eingegangen. Um das Verständnis für die Glukose- und Laktatbestimmung zu schaffen, wird kurz auf den Energiestoffwechsel in der Zelle und der Haut eingegangen. Das Kapitel wird mit Theorie und Hintergrund zur Simulation abgeschlossen. Hier werden Simulationsprogramm und verschiedenen verwendeten Module erläutert. Im Kapitel 3 wird auf Material und Methoden eingegangen. Zunächst werden die Materialien, Chemikalien und Geräte tabellarisch aufgelistet. Anschließend werden die Methoden in der Zellkultur, die entwickelte Messmethode für MES und „organ-on-a-chip“-System, sowie Methoden in der Histologie und Auswertung der Ergebnisse genauer erläutert. Zum Schluss wird im Detail erklärt, welche Einstellungen für die numerische Simulation vorgenommen wurden.

Die Darstellung der Ergebnisse und Diskussionen ist in drei Abschnitte gegliedert. Im ersten Teil von Kapitel 4 werden zunächst verschiedene Parametereinflüsse und die Durchführbarkeit der Messmethode in MES analysiert. Anschließend wird die Durchführbarkeit und Reproduzierbarkeit der Messmethode in einem „*organ-on-a-chip*“-System dargestellt und geprüft ob es möglich ist, Substanzkonzentration (Glukose und Laktat) in MES zu messen. Es wurde für die Permeationsuntersuchungen 4 %iges Agarosegel als Ersatz für Hautmodelle verwendet. Für die Substanzkonzentrationsmessung wurde ein Zellmodell bestehend aus Fibroblasten und Keratinozyten benutzt. Im Kapitel 5 werden Permeationseigenschaften von Hautmodellen dargestellt. Hier wurden Vollhautmodelle der TU Berlin und ein kommerzielles Hautmodell untersucht. Anschließend folgt eine Analyse der Permeation von Vollhautmodellen während verschiedener Kultivierungszeiten, um zu prüfen ob die Messmethode auch als Qualitätsbestimmung verwendet werden kann. Kapitel 6 zeigt die Ergebnisse zu den numerischen Simulationen. Die Simulation wurde verwendet, um physikalische Effekte im Messsystem numerisch zu analysieren. Zur Validierung wurde die Simulation mit den Messwerten verglichen. Es wurde geprüft in wie fern die Simulation geeignet ist, die Messverfahren zu unterstützen. In Kapitel 7 wird die Arbeit in einem Fazit zusammengefasst und ein Ausblick für weitere Untersuchungen so wie Verbesserungen werden dargestellt. Der Anhang in Kapitel 8 beinhaltet Berechnungen zur Bestimmung der Reynolds- und Machzahl für die Simulation und genauere Methodenbeschreibungen zur Generierung der Vollhautmodelle. Die Arbeit wird mit der Auflistung der verwendeten Referenzen abgeschlossen.

## 2 Grundlagen und Stand der Technik

In diesem Kapitel werden Grundlagen, Hintergrundwissen und das Konzept zu dieser Arbeit vermittelt. Ein Bestandteil dieser Arbeit ist die Charakterisierung des Permeationsverhaltens von Hautmodellen. Dafür werden der Aufbau der Haut und deren Permeationsbarrieren erläutert. Da für die Methodenentwicklung und Untersuchungen der 2-organ-chip (2OC) verwendet wurde, wird das Konzept „organ-on-a-chip“ und der 2OC vorgestellt. Zum näheren Verständnis des Permeationsprozesses werden die Grundlagen der Diffusion und Permeation mit dem Fokus auf Hydrogele und Nanopartikeln näher dargestellt. Es werden einige Methoden zur Bestimmung von Diffusions- und Permeationskoeffizienten vorgestellt. Im Anschluss wird eine vereinfachte Darstellung des Energiestoffwechsels der Zelle erläutert. Am Ende folgen einige Hintergründe zur Simulation.

### 2.1 Aufbau der Haut, Hautmodelle und deren Funktion als Barriere

Die menschliche Haut lässt sich in drei Schichten unterteilen (siehe Abbildung 2.1). Die oberste Schicht wird als Epidermis oder Oberhaut bezeichnet. Diese ist die zentrale Barrierefunktion der Haut und besteht überwiegend aus sich selbst erneuernden Keratinozyten. Direkt unter der Epidermis befindet sich die Dermis, auch Lederhaut genannt. Die Dermis besteht überwiegend aus Kollagen, elastischen Fasern und Hautanhangsgebilden wie Haarfollikeln und Drüsen. An die Dermis schließt sich die Subcutis an. Diese Schicht wird auch als Unterhaut bezeichnet. Sie dient als Wärmeisolierung und Fettspeicherung. Dort befinden sich Nerven, Bindegewebe und Blutgefäße, die zum Teil auch in die Dermis ragen. [21,22]

Im Folgenden werden die drei Schichten der Haut genauer erläutert. Begonnen wird mit der Epidermis. Diese ähnelt einer Backstein-Struktur. Sie ist geschichtet aus verschiedenen Plattenepithelien und besitzt eine Dicke von ungefähr 0,1 – 0,2 mm, an der Hand und an der Fußsohle sogar eine Dicke von 0,8 – 1,5 mm. Zum größten Teil besteht dieses Epithel aus Keratinozyten (> 90 %) und symbiontischen Zellen (Langerhans-Zellen, Melanozyten und Merkelzellen). Morphologisch wird die Epidermis in fünf verschiedene Unterschichten unterteilt. Diese sind Stratum corneum (Hornschicht), Stratum lucidum (Glanzsicht), Stratum granulosum (Körnerzellschicht), Stratum spinosum (Stachelzellschicht) und Stratum basale (Basalschicht) (siehe Abbildung 2.2). Jede Schicht entspricht einem anderen

Differenzierungsstadium der Keratinozyten. Die unterste Basalschicht wird auch als Regenerationsschicht bezeichnet. Diese liegt direkt auf der Basalmembran, welche eine Trennschicht zwischen Epidermis und Dermis darstellt. Hier teilen sich die Keratinozyten, wandern zur Oberfläche und verhornen sich. Ein derartige Erneuerungszyklus dauert ungefähr zwei Wochen. In der Basalschicht liegen auch die bereits erwähnten symbiontischen Zellen. Die Melanozyten sind große Dendritenzellen und enthalten die Pigmente (Melanin). Diese Pigmente sind verantwortlich für die Farbe der menschlichen Haut und bilden einen Schutz vor UV-Strahlen. Zwischen den Keratinozyten befinden sich auch die Langerhans-Zellen. Die Aufgabe dieser Zellen ist die Immunreaktion der Haut. Sie erkennen Antigene und aktivieren die T-Zellen. Die Merkel-Zellen in der Epidermis agieren als Druckrezeptoren und sind sekundäre Sinneszellen. Sie sind verantwortlich für Druck- und Vibrationswahrnehmung. [21,22]

Die Dermis befindet sich direkt unter der Basalmembran und wird grob in zwei Schichten unterteilt, nämlich in Stratum papillare und Stratum reticulare (siehe Abbildung 2.3). An der Grenze zur Basalmembran befindet sich das Stratum papillare. In diesem Bereich befinden sich die Blutversorgungsgefäße und Nervenbahnen. Die Dermis im Bereich von Subkutis wird als Stratum reticulare bezeichnet. Diese Schicht ist für die Struktur und Festigkeit der Haut verantwortlich. Die Dermis besteht aus Kollagenfasern und elastischen Fasern. Die Kollagenfasern definieren die Reißfestigkeit und Dehnbarkeit der Haut und die elastischen Fasern sind für die Struktur verantwortlich, damit die Haut bei einer Verformung wieder in den Ausgangszustand zurückkehrt. Zwischen den Fasern befinden sich Glykosaminglykane und Proteoglykane. Diese bilden die Füllsubstanz der Dermis. Deren Funktion ist die Wasserspeicherung, Erhaltung des Wasser- und Elektrolytgleichgewichts, Filterwirkung, Hämostase, Differenzierung, Wundheilung und Zellmigration. In der Dermis spielen zwei Zelltypen eine große Rolle, Fibroblasten und Mastzellen. Die Fibroblasten sind überwiegend für die Biosynthese verantwortlich. Sie produzieren die Füllsubstanz und Fasern der Dermis. Die Mastzellen sind für die Abwehr der Haut verantwortlich und rufen Entzündungsreaktionen hervor. [21,22]

Die unterste Schicht der Haut ist die Subkutis. Diese besteht hauptsächlich aus Binde- und Fettgewebe. Zwischen den Geweben befinden sich Nervenfasern und Blutgefäße. Die Aufgaben der Subkutis sind die Wärmeisolierung, die mechanische Stoßdämpfung und die Speicherung von Energie. [21,22]

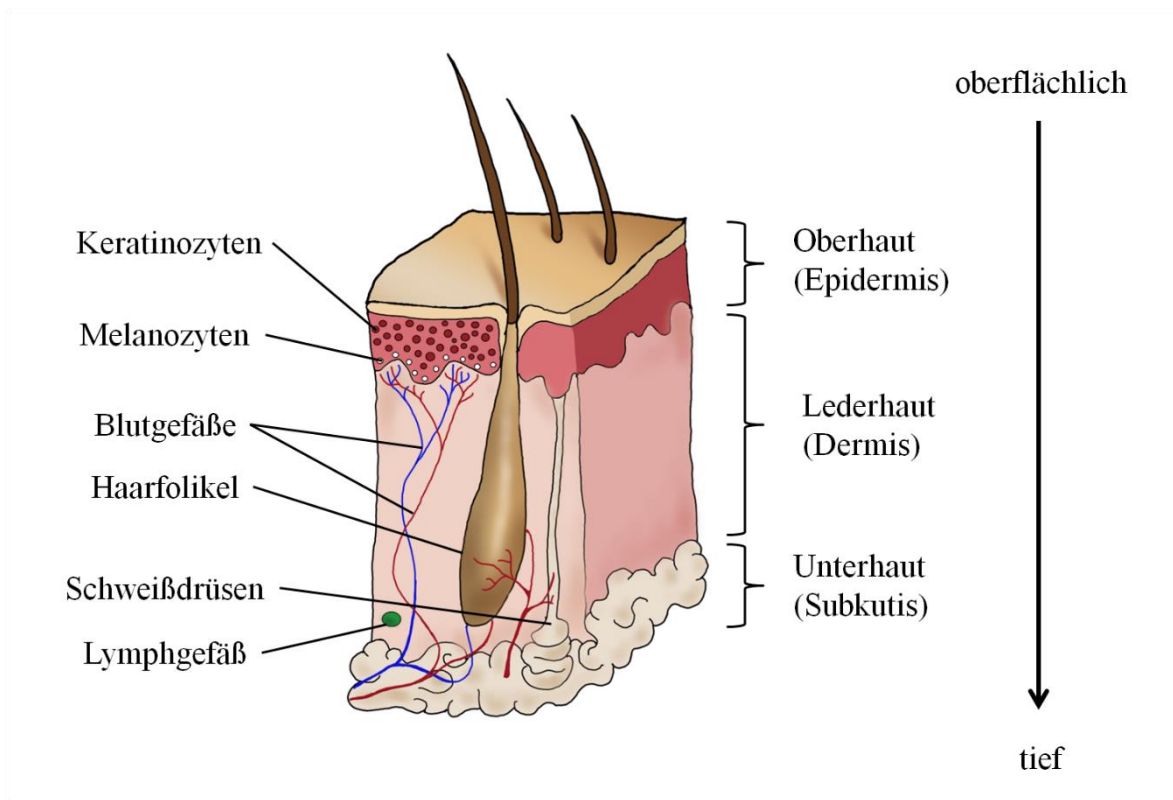


Abbildung 2.1: Aufbau der Haut. Die Haut besteht aus drei Schichten: Oberhaut, Lederhaut und Unterhaut. Auf der Oberhaut finden sich die Keratinozyten und Melanozyten. Haarfollikeln, Blutgefäße, Lymphgefäße und Schweißdrüsen sind in der Lederhaut lokalisiert. Ganz unten befindet sich die Unterhaut, welche überwiegend aus Fettzellen besteht (modifiziert aus [23]).

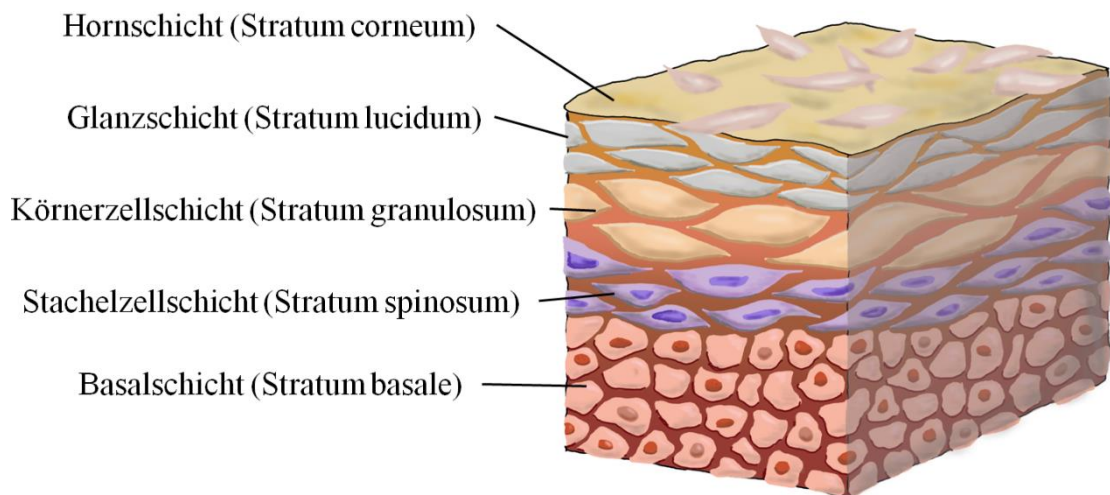


Abbildung 2.2: Aufbau der Epidermis. Ganz unten befindet sich die Basalschicht, in der die Keratinozyten gebildet werden, gefolgt von der Stachelzellschicht. Die Zellen verhornen sich und gehen in die Körnerzellschicht über, gefolgt von der Glanzschicht. An der Oberfläche der Haut befindet sich die Hornschicht (modifiziert aus [24]).

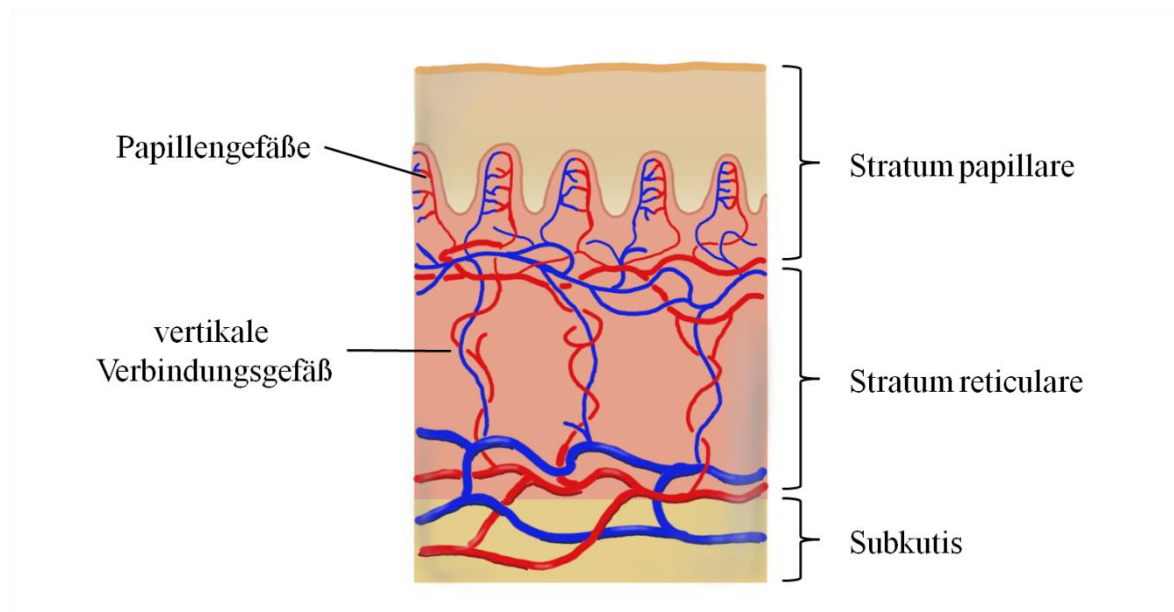


Abbildung 2.3: Aufbau der Dermis. Diese wird grob in zwei Schichten unterteilt. Im Stratum papillare befinden sich die Papillengefäße, welche die Epidermis mit Nährstoffen versorgen. Darunter ist die Stratum reticulare, wo die vertikalen Blutgefäße lokalisiert sind (modifiziert aus [21]).

### Permeationswege und -barriere der Haut

Das Stratum corneum bildet die Hauptbarriere der Haut. In der Literatur werden drei verschiedene Wege unterschieden, über die Substanzen durch diese Barriere gelangen können. Diese sind der transzelluläre, der interzelluläre und der folliculäre Weg (siehe Abbildung 2.4) [25–27]. Der transzelluläre Weg führt die Substanz direkt durch die Zelle. Hierbei muss die Substanz abwechselnd durch lipophile und hydrophile Schichten penetrieren. Es ist sehr unwahrscheinlich, dass dieser Weg bevorzugt wird, da die meisten Substanzen lipophile oder hydrophile Eigenschaften besitzen.

Bei dem interzellulären Penetrationsweg dringt die Substanz zwischen den Zellen durch die Haut durch. In der Wissenschaft wird dieser als der gängigste Penetrationspfad für die meisten Substanzen angenommen. Diese Zell-Zwischenräume bestehen überwiegend aus einer Mischung aus Ceramid, freien Fettsäuren und Cholesterol [28]. Die Lipide sind gewunden oder in Doppellipidschichten angeordnet [29]. Das Eindringen von lipophilen Stoffen wird somit begünstigt. Eine primäre Barriere im interzellulären Bereich sind die *tight junctions* (Schlussleisten) [30]. Diese sind Membranproteine, die für die Zell-Zell-Verbindung verantwortlich sind. Die *tight junctions* entstehen durch die verschiedenen Differenzierungsstadien der Keratinozyten in der Epidermis und sind ab der Stratum granulosum lokalisiert [31].

Bei dem follicularen Penetrationsweg dringt die Substanz über Haarfollikel oder über Drüsen in die Haut ein. Hautbereiche mit wenig oder ohne Haarfollikeln weisen eine deutlich geringere Permeationseigenschaft auf. Der untere Hautbereich der Haarfollikel ist für Substanzen gut permeabel. Der besondere Vorteil bei dem follicularen Penetrationsweg ist die Funktion als Reservoir. In den Follikeln kann die Substanz bis zu zehn Tage lang lagern und nach und nach in die Haut hinein penetrieren. [32–35]

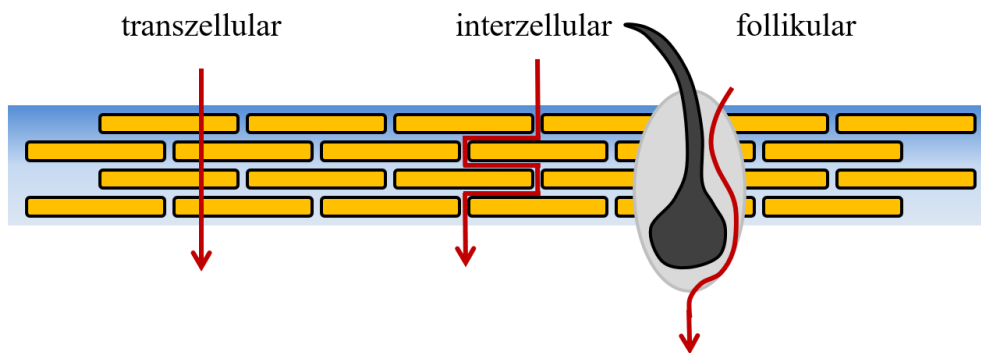


Abbildung 2.4: Vereinfachte Ziegeldarstellung der Haut und die drei möglichen Penetrationswege einer Substanz. Die gelben Ziegel stellen die verhornten Zellen da. Bei dem transzellularen Weg dringt die Substanz durch die Zellen. Bevorzugt wird der interzellulare Pfad, wo die Substanz zwischen den Zellwänden permeiert. Bei dem follicularen Weg sammelt sich die Substanz in den Zwischenräumen der Haarfollikeln und dringt dann in die Haut ein. Die Abbildung wurde aus [25] modifiziert.

### Hautmodelle

Bei Hautmodellen *in vitro* werden meistens die Dermis und die Epidermis ohne Hautanhangsgebilde kultiviert. Hierfür werden primäre Zellen aus der Dermis bzw. Epidermis entnommen [36,37] oder auch Zelllinien wie HaCaT aus Keratinozyten oder L929 Fibroblasten verwendet [38,39], da diese von humanen Proben unabhängig sind. Eine gängige Vorgehensweise, Hautmodelle *in vitro* zu erstellen, ist, zunächst die Fibroblasten in eine Kollagenmatrix einzubetten. Diese bilden die Dermis. Nach ungefähr 1 – 5 Tagen werden Keratinozyten auf die Zell-Kollagenmatrix appliziert. Für die Proliferation der Keratinozyten erfolgt eine Submerskultur (Kultur komplett in Medium eingetaucht) von 1 – 3 Tagen. Im nächsten Schritt wird das Medium soweit abgenommen, dass sich die Keratinozyten an der Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht (*air lift*) befinden. Die Zellen werden 3 – 5 Wochen weiter kultiviert, bis sich die Keratinozyten zu einer mehrlagigen Hornschicht differenzieren. [36–39]

Die Luft-Flüssigkeitsphase entspricht dem natürlichen Wachstumsraum der Keratinozyten und fördert somit auch die Differenzierung. Indizien für eine erfolgreiche differenzierte

Epidermisschicht sind die Bildung mehrerer Schichten, Bildung von Keratohyalin, Schuppenbildung, Verlust des Nucleus und Abflachung der Keratinozyten (Richtung Luftphase). [37]

Mittlerweile sind Hautmodelle auch kommerziell erhältlich. Dabei unterscheidet man zwischen einem Hautmodell, das aus einer Epidermislage besteht, und einem Vollhautmodell, welches aus Epidermis und Dermis zusammengesetzt ist. Ein Beispiel für ein Hautmodell ist EpiDerm™ der Firma MatTek [40] (siehe Abbildung 2.5 links). Dieses ist ein aus humanen Zellen rekonstruiertes Epidermismodell und wird für Irritation, Korrosion und Hydrationsversuche für Cremes und Lotionen eingesetzt. Das Produkt Phemion® von Henkel [9] stellt ein Vollhautmodell dar und beinhaltet eine Dermis und Epidermis.

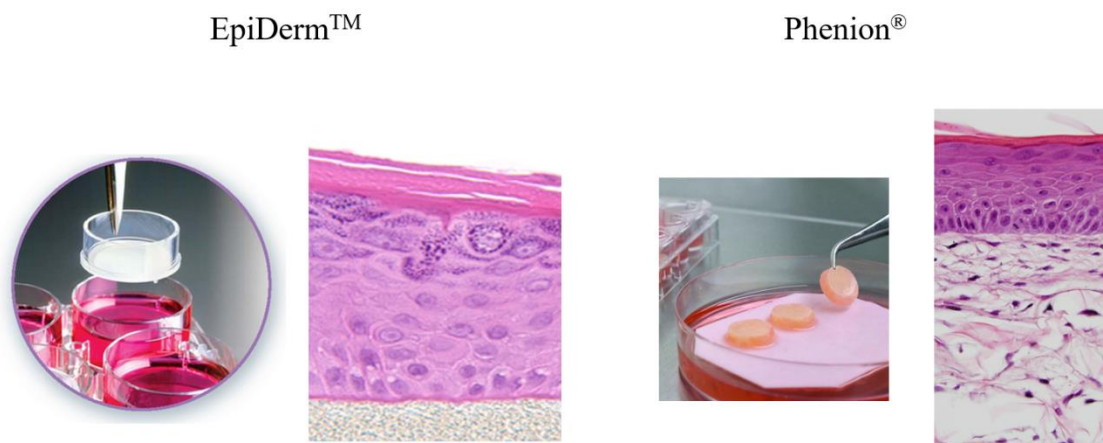


Abbildung 2.5: Links: EpiDerm™ von MatTek, Kultivierungsgefäß und histologischer Schnitt (Quelle: [www.mattek.com](http://www.mattek.com) 18.03.2016). Rechts: Phemion von Henkel, Probe und histologischer Schnitt (Quelle: [www.henkel.de](http://www.henkel.de) 18.03.2016).

### 2.2 Konzept des „organ-on-a-chip“ und Aufbau des 2OC

Tierversuche sind in der Forschung heutzutage immer noch eine gängige Methode und werden zum Beispiel bei Untersuchungen von Krankheiten, Funktionen des biologischen Organismus, sowie dem Testen von Medikamenten genutzt [41,5]. Gerade in der Pharmazie sind Tierexperimente noch unabdingbar. Im Jahr 2003 wurde von der europäischen Union per Gesetz festgelegt, Tierversuche für die Testung von Kosmetika zu verbieten (*EU Cosmetics Directive 2003/15/EC*). Das Gesetz trat im Jahr 2013 in Kraft. Aus diesen Gründen werden alternativen Möglichkeiten für die Substanztestung in der

Kosmetikindustrie benötigt. Eine Methode ist die Testung *in vitro* mit humanen Zellen. Jedoch sind solche Experimente meistens nur bedingt aussagefähig, da menschliche Organe in komplexen dreidimensionalen Strukturen wachsen und deren Interaktion zueinander eine wichtige Rolle spielt [10]. Das „*organ-on-a-chip*“-Konzept bietet für dieses Problem eine geeignete Lösung.

Die Grundidee dieses Konzeptes besteht darin, die Physiologie des menschlichen Organes in miniaturisierter Form so gut wie möglich nachzubilden. Hierfür müssen Mikroumgebungen geschaffen werden, die dem natürlichen Raum entsprechen. Es geht nicht darum, das menschliche Organ komplett auf einem Chip nach zu stellen, sondern die funktionelle Einheit eines Organs abzubilden. Wichtige Faktoren in der Organkultivierung im Chipformat sind die Substratopografie, fluiddynamische Bedingung und die Kulturperfusion [10,11]. Der Chip soll so klein wie möglich sein, sodass menschliche Organe so weit wie möglich minimiert werden und die nötigen Funktionen erhalten bleiben [12,42]. Dadurch kann der Verbrauch an Gewebe geringgehalten werden. Ein weiterer Aspekt ist auch, eine geeignete Umgebung darzustellen, um die Zellen in 3D zu kultivieren, welches mehr deren natürlichen Wachstumsbedingungen entspricht. Für die Pharmazie ist es besonders interessant, Krankheiten auf dem Chip abbilden zu können, um somit die Effektivität von Wirkstoffen zu testen. Aus diesem Grund spielt auch die Langzeitkultivierung von Organismen eine große Rolle [12]. Somit sind die Sterilität und auch die Stabilität wichtige Faktoren für die Entwicklung solcher Chips. Mittlerweile waren eine Vielzahl von „*organ-on-a-chip*“-Systemen beschrieben, die es ermöglichen, humane Organe zu kultivieren [10,43,11]. Die Nachfrage steigt stetig an. Es existieren schon kommerzielle Unternehmen, wie zum Beispiel:  $\mu$ Organo, Nortis, TissUse und AxoSim, die „*organ-on-a-chip*“-Systeme vermarkten.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem 2-organ-chip (2OC). Der 2OC wurde von der TissUse GmbH entwickelt und ist eine Technologie im Größenformat einer Visitenkarte, die das Kultivieren von mehreren Zellorganismen in einem System ermöglicht. Es besteht aus einer Adapterplatte auf der Zellkultur-Kompartimenten mit Halterungen für ein Membran Einsatzsystem und Pumpverbindungen für Luftschläuche (siehe Abbildung 2.6). In diesem Fall wurde die Halterung für das Transwell® (TW) der Firma Corning konzipiert. Bei dem TW handelt es sich um ein MES. Es besteht aus einem zylindrischen Gefäß, welches an der unteren Seite eine Membran besitzt. Die Membran ermöglicht eine Kultivierung von Zellen auf der Membran und eine Nährstoffversorgung von unten. Im 2OC erfolgt die Versorgung über den Mikrofluidkanal. Der Mikrofluidkanal unter der Adapterplatte besteht aus PDMS (Polydimethylsiloxan) und wird mit einer Glasplatte abgeschlossen.

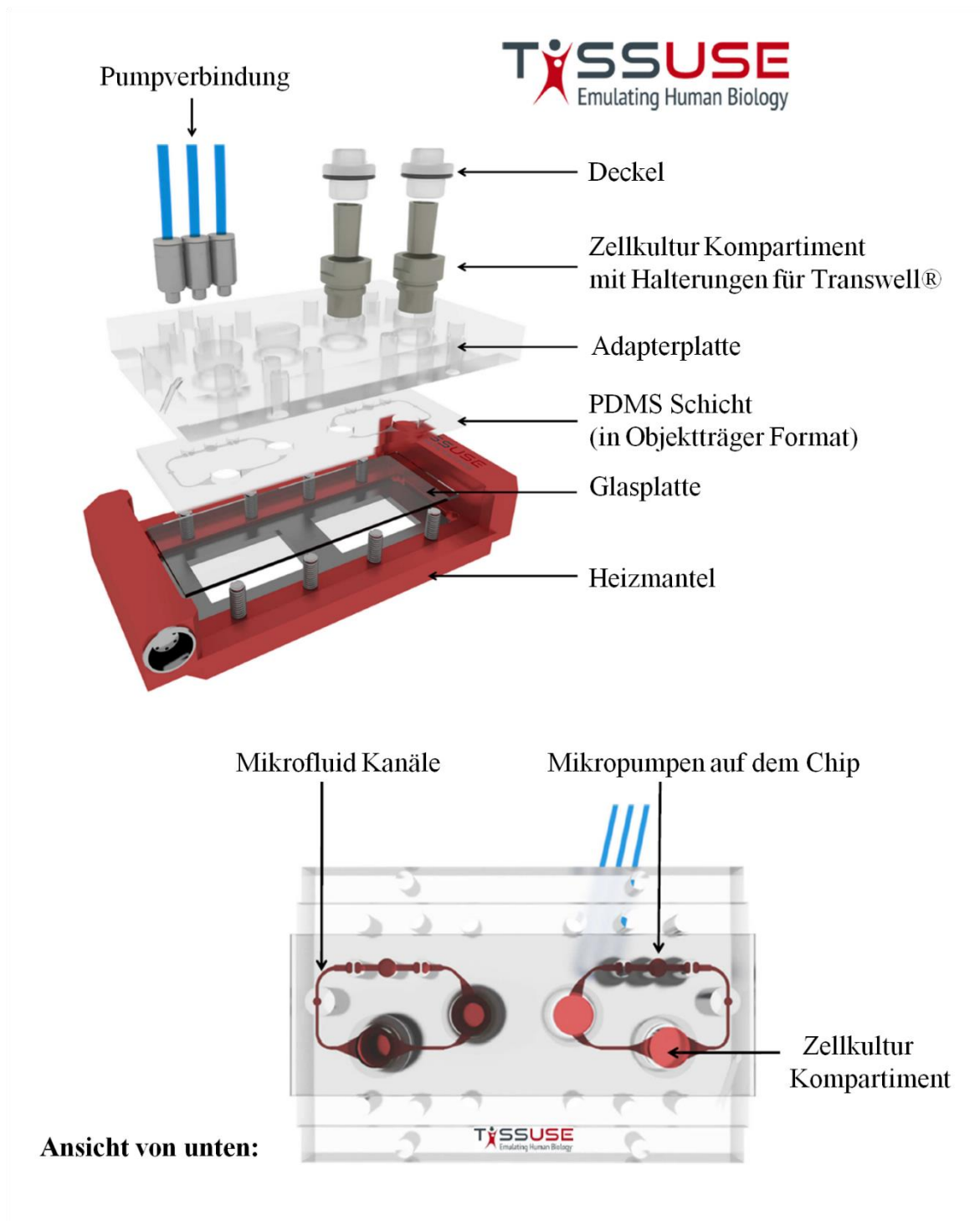


Abbildung 2.6: Schematischer Aufbau des 2OC der TissUse GmbH. Oben: Darstellung der einzelnen Schichten. Auf der Adapterplatte befinden sich die Zellkultur-Kompartimente und Pumpverbindungen. Direkt darunter schließt sich eine PDMS-Schicht mit den Mikrofluid-Kanälen an. Der Chip wird mit einer Glasplatte abgeschlossen und kann mit einem Heizmantel beheizt werden. Unten: Darstellung der Mikrofluid Kanäle in Rot. Die Mikropumpen befördern die Flüssigkeit in die Kanäle und werden mit Luft angetrieben. Zu sehen sind auch die Positionen der Zellkultur-Kompartimente. [44]

Das PDMS ist gasdurchlässig und ermöglicht somit eine Sauerstoffversorgung der Zellen oder eine CO<sub>2</sub> (Kohlenstoffdioxid) Pufferung des Mediums im Brutschrank. Optional kann ein Heizmantel an den Chip angebracht werden, um diesen zu temperieren.

Auf einem Chip befinden sich zwei Mikrofluidkreisläufe. Die Flüssigkeit wird mit Hilfe einer Mikropumpe durch den Kanal befördert. Die Pumpe wird mit Druckluft betrieben und besteht aus drei runden PDMS-Membranen, welche durch zyklisches Verformen die Flüssigkeit durch den Kanal drückt (siehe Abbildung 2.6 Ansicht von unten). Dieser Mikropumpmechanismus ist dem menschlichen Blutkreislauf nachempfunden. [45]

Durch den speziellen Aufbau des 2OCs ist es möglich, Co-Kulturen<sup>†</sup> bis zu 28 Tage steril zu betreiben. Ein besonderer Vorteil ist hierbei die Zellkultur mit Hilfe der bereits erwähnten TW-Einsätze. [46–52]

### 2.3 Diffusion/Permeation, Hydrogele und Nanopartikeln

In diesem Teilkapitel werden die physikalischen Begriffe Diffusion, Permeation und Penetration genauer erläutert. Es folgt eine Beschreibung der gängigen Methoden zur Bestimmung dieser Parameter an der Haut. Anschließend werden Diffusionseigenschaften von Hydrogelen beschrieben und Nanopartikel bei der Anwendung auf der Haut erläutert.

#### Diffusion/Permeation und Penetration

Bei der Diffusion handelt es sich um einen Transportprozess, wobei sich Teilchen durch die brownische Molekularbewegung zufällig in einem Volumen bzw. im Raum verteilen. Die treibende Kraft dafür ist der Konzentrationsgradient [53]. Die Pioniere der Diffusionsuntersuchung waren Thomas Graham (1805 – 1869) und Adolf Fick (1829 – 1901). Thomas Graham beschäftigte sich mit Diffusionsprozessen im Gas und Adolf Fick mit der Diffusion von Stoffen in Flüssigkeit. Dabei fand Adolf Fick heraus, dass die Diffusion mathematisch mit denselben Grundsätzen wie der Wärmetransports und die elektrische Kapazität beschrieben werden kann [54,55]. Aus diesen Erkenntnissen wurde der ersten Fick'sches Gesetz für die Diffusion von gelösten Teilchen hergeleitet:

---

<sup>†</sup> Kultivierung von mehreren Zelltypen in einem System

$$J = -D \frac{\partial C}{\partial z}$$

2.1

- $J$ : Fluss  $\left[\frac{\text{mol}}{\text{m}^2 \text{s}}\right]$   
 $D$ : Diffusionskoeffizient  $\left[\frac{\text{m}^2}{\text{s}}\right]$   
 $C$ : Konzentration  $\left[\frac{\text{mol}}{\text{m}^3}\right]$   
 $z$ : Strecke/Weg  $[\text{m}]$

Das erste Fick'sche Gesetz besagt, dass der molekulare Fluss  $J$  gleich der negativen Diffusionskonstante  $D$  multipliziert mit der Konzentrationsdifferenz  $\partial C$  über die Strecke  $\partial z$  ist.

Im zweiten Fick'schen Gesetz wird die Diffusion in einem dreidimensionalen Fall formuliert. Die Formel lautet wie folgt:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \left( \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} \right)$$

2.2

- $t$ : Zeit  $[\text{s}]$   
 $D$ : Diffusionskoeffizient  $\left[\frac{\text{m}^2}{\text{s}}\right]$   
 $C$ : Konzentration  $\left[\frac{\text{mol}}{\text{m}^3}\right]$   
 $x, y, z$ : Strecke/Weg in x, y, z Richtung  $[\text{m}]$

Die Permeation ist eine vereinfachte Betrachtungsweise der Diffusion. Es handelt sich hierbei um den gleichen physikalischen Prozess. Bei der Permeation werden nur die Stoffe beschrieben, die in ein System hinein und wieder hinaus diffundieren, wo hingegen bei der Diffusion der Fokus auf die Verteilung des Stoffes innerhalb des Systems gelegt wird (siehe Abbildung 2.7).

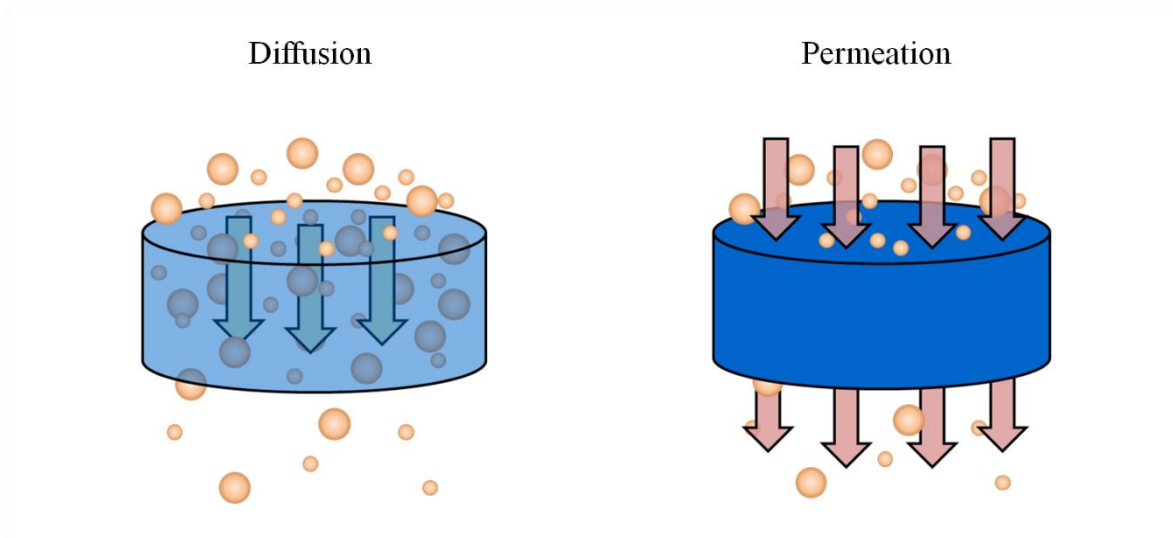


Abbildung 2.7: Darstellung von Diffusion und Permeation von Teilchen (orange) in einem System (blau). Die Diffusion beschreibt das Verteilen der Teilchen in einem System und die Permeation beschreibt, wie viele Teilchen durch ein System hindurch gewandert sind.

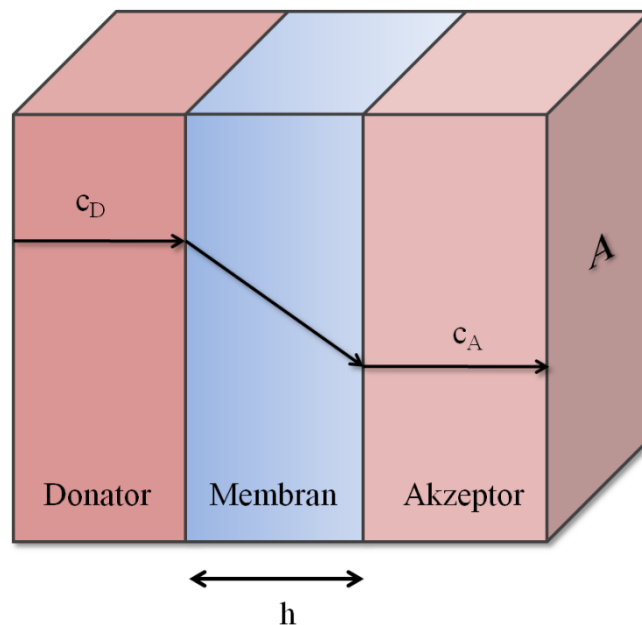


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung einer Membran (mit der Dicke  $h$  und der Fläche  $A$ ) mit Donator und Akzeptor. Der Donator ist die Seite mit der höheren Konzentration  $c_D$ . Somit entsteht ein Konzentrationsgefälle über die Membran zum Akzeptor mit einer Konzentration  $c_A$ .

Die Membran besitzt eine Dicke  $h$  und eine Fläche  $A$ . Auf der linken Seite der Membran befindet sich der Donatorraum mit einem Stoff der Konzentration  $c_D$ , auf der rechten Seite befindet sich der Akzeptorraum mit einem Stoff der Konzentration  $c_A$  (siehe Abbildung 2.8). Dabei gilt, dass  $c_D > c_A$  ist, somit permeiert der Stoff von Donator zum Akzeptor.

Die Gleichung zur Bestimmung der Permeationskonstante kann aus dem Fick'schen Gesetz hergeleitet werden. Der Fluss des Stoffes kann für dieses Beispiel wie folgt mit dem Fick'schen Gesetz beschrieben werden:

$$J = \frac{dm_A}{dtA} = D \frac{(c_{MD} - c_{MA})}{h} \quad 2.3$$

- $m_A$ : Masse im Akzeptor [kg]  
 $t$ : Zeit [s]  
 $c_{MD}$ : Konzentration an der Donator/Membran-Phasengrenze  $\left[\frac{\text{mol}}{\text{m}^3}\right]$   
 $c_{MA}$ : Konzentration an der Membran/Akzeptor-Phasengrenze  $\left[\frac{\text{mol}}{\text{m}^3}\right]$   
 $h$ : Diffusionsstrecke [m]  
 $A$ : Diffusionsfläche [m<sup>2</sup>]

Die Konzentration an der Phasengrenze zur Membran wird über einen Verteilungskoeffizienten definiert. Daraus ergibt sich für  $c_{MD}$  und  $c_{MA}$  folgende Gleichung:

$$c_{MD} = K_D \cdot c_D \quad \text{und} \quad c_{MA} = K_A \cdot c_A \quad 2.4$$

- $K_D$ : Verteilungskoeffizient zwischen Donator und Membran [/]  
 $K_A$ : Verteilungskoeffizient zwischen Akzeptor und Membran [/]  
 $c_D$ : Donatorkonzentration  $\left[\frac{\text{mol}}{\text{m}^3}\right]$   
 $c_A$ : Akzeptorkonzentration  $\left[\frac{\text{mol}}{\text{m}^3}\right]$

Durch das Einsetzen der Gleichung 2.4 in die Gleichung 2.3 und mit der Annahme, dass die Verteilungskoeffizienten auf beiden Seiten der Membran gleich sind ( $K_D = K_A = K$ ), ergibt sich:

$$\frac{dm_A}{dt} = \frac{D \cdot A \cdot K}{h} (c_D - c_A) \quad 2.5$$

Im nächsten Schritt wird der Ausdruck  $\frac{D \cdot K}{h}$  durch die Permeationskonstante  $P = \frac{D \cdot K}{h}$  und  $m_A = c_A \cdot V_A$  ersetzt. Hierfür ergibt sich folgende Gleichung:

$$\frac{dc_A}{dt} = P \cdot A \frac{1}{V_A} (c_D - c_A) \quad 2.6$$

Mit der Annahme, dass  $c_D \gg c_A$  so ergibt sich:

$$\frac{dc_A}{dt} = P \cdot A \frac{c_D}{V_A} \quad 2.7$$

- $P$ : Permeationskoeffizient  $\left[\frac{m}{s}\right]$   
 $t$ : Zeit [s]  
 $V_A$ : Akzeptorvolumen [ $m^3$ ]  
 $c_D$ : Donatorkonzentration  $\left[\frac{mol}{m^3}\right]$   
 $c_A$ : Akzeptorkonzentration  $\left[\frac{mol}{m^3}\right]$

Die Gleichung 2.7 wird zur Berechnung der Permeationskonstante verwendet und gilt nur, wenn die Donatorkonzentration sich gegenüber der Akzeptorkonzentration so gut wie nicht verändert. Diese Bedingung ist nur zu Anfang eines Permeationsprozesses erfüllt, wenn die Akzeptorkonzentration mit der Zeit nahezu linear ansteigt. [56,57]

Als Penetration wird das Eindringen von Substanzen in die Haut bezeichnet. Im Gegensatz zur Permeation und Diffusion wird bei der Untersuchung der Penetration der Fokus auf die Hautoberfläche gelegt. Es wird untersucht, wie schnell bzw. wie tief die Substanz in die Haut penetriert. Dies kann, wie bereits beschrieben, transzellular, interzellular und follikular erfolgen (siehe Abbildung 2.4).

### **Stand der Technik zur Bestimmung der Diffusion/Permeation/Penetration in der Haut**

Es existieren verschiedene etablierte Methoden, die Diffusion, Permeation und Penetration von Stoffen in der Haut zu untersuchen. Im folgenden Teil werden in Kürze einige gängige Methoden näher dargestellt.

Zur Bestimmung von Permeationskonstanten *in vitro* werden meistens Franz-Diffusionszellen verwendet. Eine Franz-Diffusionszelle besteht aus zwei Komponenten, in denen das zu untersuchende Hautpräparat (oder auch eine Barriere) mit einem Dichtungsring fixiert wird (siehe Abbildung 2.9). Auf die obere Komponente (Abdeckung), der Donator, wird die zu untersuchende Substanz appliziert und kann somit über das Präparat in die untere Komponente, den Akzeptor, permeieren. Über ein Rohr kann die Probe aus dem Akzeptor während des Versuches entnommen werden. Ein Magnetrührer unterbindet Konzentrationsgradienten bei der Permeation. Mittels eines Heizmantels kann die Temperatur konstant gehalten werden. [58,59]

Die Größe und Form einer Franz-Diffusionszelle kann sich von Hersteller zur Hersteller und je nach Anwendung stark unterscheiden. Die Höhe einer üblichen Zelle bewegt sich im Rahmen von 10 – 46 cm und der Durchmesser von 1,5 – 9 cm. [60]

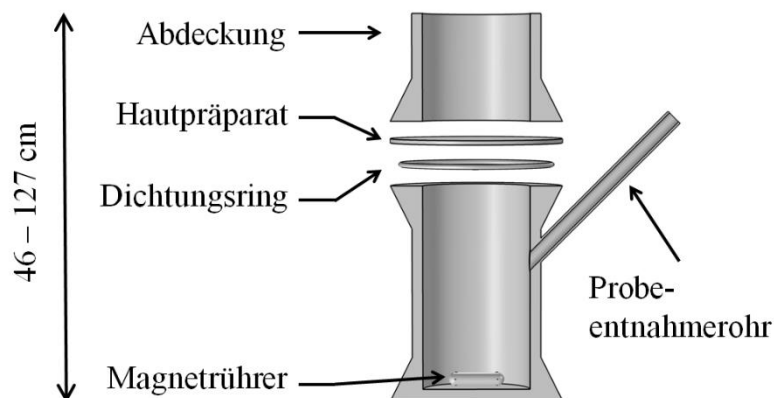


Abbildung 2.9: Schematischer Aufbau einer Franz-Diffusionszelle. Zwischen der Abdeckung und der unteren Komponente wird das Hautpräparat mit Dichtungsringen eingespannt. Über die Öffnung an der Abdeckung kann die zu untersuchende Substanz appliziert werden. Proben können über das Entnahmerohr genommen werden.

Eine Möglichkeit, die Diffusion quantitativ zu messen sind bildgebende Verfahren. Die FRAP-messung (*fluorescence recovery after photobleaching*) ist eine der bekanntesten Methoden, um Diffusionsvorgänge in Geweben und Gelen zu messen. Hierbei wird das zu untersuchende Gewebe/Gel mit dem diffundierenden Stoff getränkt. Dabei muss der Stoff Fluoreszenz-markiert sein. Mit Hilfe eines dünnen Laserstrahls wird eine Stelle ausgebleicht (*bleaching*). Durch die Diffusion wird nach einer bestimmten Zeit ein Gleichgewichtszustand wieder hergestellt. Es wird die Fluoreszenzrückbildung über die Zeit bestimmt. Mit Hilfe einer numerischen Berechnung kann der Diffusionskoeffizient bestimmen werden. [61–64]

Weitere bildgebende Methoden zur Bestimmung von Diffusionsvorgängen in der Haut sind FTIR (*fourier transform infrared*) Spektroskopie [65,66], Zwei-Photonen-Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie in Kombination mit FCS (*fluorescence correlation spectroscopy*) [67,68] und optische Kohärenz-Tomografie [69]. Die besonderen Vorteile bildgebender Verfahren liegen darin, dass diese Methoden nicht invasiv sind und nur sehr kleine Proben benötigt werden. Allerdings ist das benötigte Equipment nicht sehr kostengünstig, nicht mobil und die Bedienung erfordert Erfahrung.

Eine ältere Methode ist es, Diffusionsvorgänge von Stoffen in Gelkörpern zu bestimmen. Hierfür werden Gelkörper mit definierter Geometrie hergestellt. Der zu untersuchende Stoff befindet sich entweder in Lösung oder im Gelkörper und es wird die Konzentrationsänderung über die Zeit gemessen. Häufig werden Kugel, Zylinder, Scheiben oder Platten verwendet, da hierfür bereits Annäherungsformeln existieren, um den Diffusionskoeffizienten zu bestimmen. Aufgrund des Aufbaus, der Geometrie und der Inhomogenität der Haut bzw. der Hautmodelle ist die Eignung dieser Methode für die Untersuchung umstritten. [70]

Um zu untersuchen, wie Wirkstoffe in die Haut penetrieren, wird die Stripping-Methode eingesetzt. Hierbei wird die zu untersuchende Substanz auf die Haut aufgetragen und nach einer bestimmten Zeit wieder abgenommen. Einzelne Schichten der Haut werden mit einem Klebestreifen abgezogen. Anschließend wird die Menge der Substanz analysiert. Für die Analyse gibt es verschiedene Ansätze. Zum Beispiel kann die Substanz direkt an den Klebestreifen bestimmt werden. Wenn die Substanz nicht strahlendurchlässig ist, kann diese mit Röntgenstrahlen ermittelt werden. Mit Hilfe der Fluoreszenzmessung kann auch quantitativ die Menge von fluoreszierenden Substanzen bestimmt werden. Es besteht auch die Möglichkeit, den zu untersuchenden Stoff von den Klebestreifen chemisch zu lösen und anschließend die Konzentration zu bestimmen. Der besondere Vorteil an der Stripping-Methode ist, dass hiermit die Eindringtiefe und somit die Lokalisierung von Substanzen in der Haut ersichtlich wird. Der Versuch ist minimal invasiv und kann direkt an Probanden ausgeführt werden. Ein Problem der Methode ist die undefinierte Schichtdicke, welche von dem Klebestreifen abgetragen wird. Diese kann von Versuch zu Versuch und an verschiedenen Hautpositionen stark voneinander abweichen. Jedoch kann die Schichtdicke mittels Abwiegens grob ermittelt werden. [71–74]

### Diffusion in Hydrogelen

Für diese Arbeit wird ein Hydrogel für die Methodenentwicklung und Validierung verwendet, da der Diffusionsmechanismus dem in der Haut ähnlich ist. Im Folgenden wird die Diffusion in Hydrogelen erläutert. Hydrogele bestehen aus einem wasserhaltigen Polymernetz, wobei der Stofftransport überwiegend in den wässrigen Bereichen stattfindet. Das Polymernetz erweist sich hier als die eigentliche Barriere für die molekulare Bewegung. Entscheidende Faktoren für die Diffusion von Stoffen durch ein Hydrogel sind die Beschaffenheit und die Dichte des Netzes sowie die Form und Größe der Teilchen. Auch spielen die Wasserlöslichkeit und die Ladung eine große Rolle. Generell gilt, dass Moleküle besser und schneller durch ein großmaschiges und bewegliches Netz wandern als durch ein kleinmaschiges, starres Netz. Ebenso diffundieren Moleküle mit einem kleineren hydrodynamischen Radius schneller durch Hydrogele als große. [75,61]

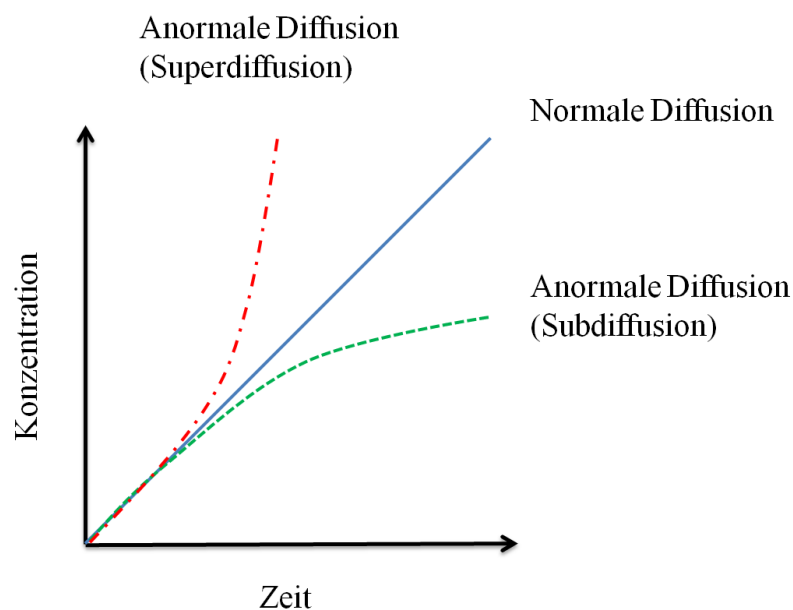


Abbildung 2.10: Schematische Darstellung der Konzentration über der Zeit zur Darstellung verschiedener Diffusionszustände. Die normale Diffusion lässt sich mit dem Fick'schen Gesetz beschreiben und besitzt zur Beginn einen linearen Anstieg. Bei der Subdiffusion wird die Diffusion gehindert und die Kurve verläuft flacher. Wird die Diffusion beschleunigt, handelt es sich um eine Superdiffusion und die Kurve verläuft steiler.

Ein anderer Effekt bei der Diffusion in Hydrogelen ist das Verstricken der Moleküle im Polymernetz [76]. Dieses tritt besonders bei langkettigen und großen Molekülen auf. Hierbei verfangen sich die Moleküle im Netz und können sich nicht mehr weiter fortbewegen. Dadurch schränken sie den Raum ein. Im Diffusionsversuch macht sich dies insofern

bemerkbar, als dass die gemessene Konzentration über die Zeit schneller abflacht (siehe Abbildung 2.10). Dies wird auch als anomale Diffusion (Subdiffusion bezeichnet) und lässt sich nicht durch das Fick'sche Diffusionsgesetz beschreiben [77].

### **Nanopartikel und die dermale Anwendung**

Als Nanopartikel werden Stoffe bezeichnet, die kleiner sind als 100 nm [13]. Diese können aus verschiedenen Materialien bestehen, wie zum Beispiel Metall, Kohlenstoff, Polymer, Keramik, Lipiden und Halbleitern. Die physikalischen Eigenschaften machen Nanopartikel so besonders. Auf Grund der geringen Größen, besitzen sie ein hohes Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis, wodurch sie chemisch reaktionsfähiger sind im Vergleich zu größeren Partikeln. Des Weiteren haben Nanopartikel eine hohe mechanische Beständigkeit und besitzen besondere optische und elektrische Eigenschaften [16]. Einige Nanopartikel liegen in Größenordnungen von Antikörpern, Membranrezeptoren, Proteinen und Nucleinsäuren. Diese Eigenschaft macht das Material so interessant für die Anwendung im Bereich der Bildgebung, Färbung, Diagnose und Therapie [78].

In der dermalen Anwendung werden Nanopartikel meistens in Form von Creme auf die Haut aufgetragen. Auch hier kommen verschiedene Materialien wie Metalloxide, Fulleren und Nanoemulsionen zum Einsatz [13]. Sehr häufig werden Titan- und Zinkoxide in Sonnencreme verwendet. Diese besitzen besonders gute Ultraviolettstrahlen abweisende Eigenschaften [16,13,79]. Auch werden Silberpartikel in Cremes und auch Wundpflaster genutzt, da dieses Nanomaterial eine antiseptische Wirkung besitzt und bakterielle Zellstrukturen zerstört.

Generell wurde herausgefunden, dass Nanopartikel ab einer Größe von 20 bis 40 nm kaum durch die Epidermisschicht der Haut permeieren können. Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass Silberpartikel mit einer Größe von 20 nm nicht durch die Haut penetriert [15] Bei einer Größe von 40 nm dringen Nanopartikel nur 5 bis 8 nm tief in die Haut ein. Nanopartikel, die kleiner sind als 10 nm können bis in der tieferen Ebene der Stratum Corneum eindringen [15].

### 2.4 Energiestoffwechsel der Zelle und in der Haut

Ein Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Bestimmung von Glukoseverbrauch und Laktatproduktion der Hautmodelle. Zum Verständnis wird im Folgenden vereinfacht der Energiestoffwechsel der Zelle und in der Haut erläutert.

Um eine Zelle am Leben zu erhalten, werden Nährstoffe benötigt. Vereinfacht betrachtet, wird die Nahrung im Körper in Energie umgewandelt, damit das thermodynamische Gleichgewicht der Zellen erhalten bleibt. Wird die Nährstoffversorgung unterbrochen, so kann die zelluläre Ordnung nicht mehr aufrecht erhalten werden und das System fällt in Unordnung (Entropie) [80].

Hauptenergiequelle für die Zelle ist das Nucleotid Adenosintriphosphat (ATP). Es besteht aus Adenin, Ribose und drei Phosphateinheiten. Durch das Hydrolysieren der Phosphateinheiten von ATP zu Adenosindiphosphat (ADP) und weiter zu Adenosinmonophosphat (AMP) wird sehr viel Enthalpie freigesetzt. Diese Enthalpie wird zur Lebenserhaltung im Körper genutzt. [80,81]

Aus einem Glukosemolekül kann die Zelle mit Hilfe des Metabolismus bis zu 30 ATP herstellen. Der erste Schritt der Energiegewinnung ist die Glykolyse (Zuckerspaltung). Hierbei wird ein Zuckermolekül (Glucose) über mehrere Schritte in zwei Pyruvatmoleküle umgewandelt. Hierbei wird neben Wasser, Wasserstoff und NADH (NADH ist ein mit  $H^+$  reduziertes  $NAD^+$  Nicotinamidadeninucleotid), 2 ATP gewonnen. Für diesen Prozess wird kein Sauerstoff benötigt. Die effektive ATP Rückgewinnung erfolgt über die Atmungskette in den Mitochondrien. Hierfür wird das Pyruvat in die Zellorganelle eingeschleust und über die Pyruvat-Dehydrogenase in Acetyl-CoA (Coenzym A) umgewandelt. Das Acetyl-CoA wird anschließend in den Citratzyklus eingeschleust. Hierbei wird kein ATP erzeugt, jedoch weiteres NADH. Das NADH wird in der Atmungskette letztendlich über mehrere Komplexe reoxidiert zu  $NAD^+$ , wodurch ATP synthetisiert wird. Bei diesem Prozess wird Sauerstoff benötigt. Der Sauerstoff wird in  $H_2O$  umgewandelt. In der Abbildung 2.11 (links) ist die Verstoffwechslung von Glukose über die Atmungskette vereinfacht schematisch dargestellt. [81]

Ist jedoch nicht genügend Sauerstoff vorhanden, wird das Pyruvat im Zytoplasma der Zelle über die Laktat-Dehydrogenase zur Laktat umgewandelt. Hierbei wird das NADH zu  $NAD^+$  reduziert. Dieser Prozess soll verhindern, dass die Glykolyse zum Erliegen kommt.

Bei der Haut erfolgt die Verstoffwechslung überwiegend in der Epidermis, obwohl diese nur 5 % der gesamten Haut darstellt. Der Verbrauch ist auf die hohe Zellteilungsaktivität in diesem Bereich zurückzuführen. Da diese nicht durchblutet wird, erfolgt die Versorgung

über die Diffusion aus der Dermis. Die Hautzellen sind fähig, die Glukose-Verstoffwechselung über die Atmungskette sowie über Pyruvat zum Laktat durchzuführen. Es wurde gezeigt, dass der zweite Weg bevorzugt wird. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Keratinozyten der Haut während der Differenzierung zur Hornhaut die Mitochondrien verlieren. Diese sind essenziell für die Glukose-Verstoffwechselung über die Atmungskette. Demzufolge könnte das der Grund für die hohe Laktatproduktion der Haut im Vergleich zu anderen menschlichen Organen sein. [82–85]

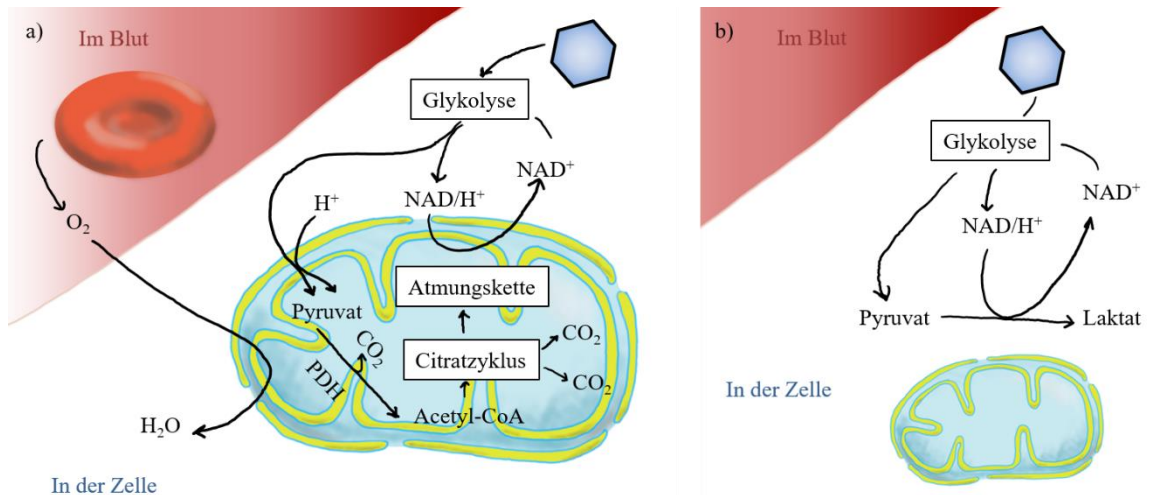


Abbildung 2.11: a) Schematische Darstellung der Glukose-Verstoffwechselung in der Zelle über die Atmungskette. Das Glukosemolekül wird durch die Glykolyse in Pyruvat umgewandelt, welches in den Mitochondrien über die Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) zu Acetyl-CoA wird. Anschließend folgt die ATP-Gewinnung über den Citratzyklus und Atmungskette. b) Schematische Darstellung der Glukose-Verstoffwechselung direkt über eine Reduktion des Pyruvates in Laktat (modifiziert aus [86]).

### 2.5 Theorie und Hintergrund zur numerischen Simulation

Die numerische Simulation wurde mit der Software COMSOL Multiphysics (Version 5.1, COMSOL INC.) durchgeführt. Die Methode basiert auf der finiten Element-Zerlegung. Dabei wird das Problem mittels partieller Differentialgleichungen (PDE – *partial differential equation*) gelöst. Die Software bietet verschiedene Module für verschiedene physikalische Probleme. Dabei können die Module miteinander gekoppelt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier Module verwendet und miteinander gekoppelt. Die Diffusionsvorgänge wurden mit dem Modul „*Chemical Species Transport*“ simuliert. Für die Verstoffwechselung wurde das „*Chemical Engineering*“ Modul verwendet. Zur Simulation von Fluidfluss im 2OC wurde das „*Fluid Flow*“ Modul für laminare Strömungen benutzt.

Alle Parameterbestimmungen in der Simulation wurden mit dem „*Optimization*“ Modul durchgeführt.

### Transport von gelösten Stoffen (*Chemical Species Transport Modul*)

Mit Hilfe des Moduls „*Chemical Species Transport*“ können Transportvorgänge von Teilchen in der festen, Flüssig- und Gasphase simuliert werden. Der Stofftransport, Diffusionsvorgänge und Konvektionen basieren auf dem Fick'schen Gesetz. Eine feste Annahme ist, dass alle Stoffe sich in Lösung befinden. Für die Simulation wird folgende Gleichung verwendet:

$$\frac{\partial c}{\partial t} + u \cdot \nabla c = \nabla \cdot (D \nabla c) + R$$

2.8

- $c$ : Konzentration des gelösten Substrates  $\left[\frac{\text{mol}}{\text{m}^3}\right]$
- $D$ : Diffusionskoeffizient  $\left[\frac{\text{m}^2}{\text{s}}\right]$
- $R$ : Reaktionsrate des Substrates  $\left[\frac{\text{mol}}{\text{m}^3 \text{s}}\right]$
- $u$ : Vektorgeschwindigkeit  $\left[\frac{\text{m}}{\text{s}}\right]$
- $t$ : Zeit [s]

Der Vektorgeschwindigkeit  $u$  kann mit dem „Fluid Flow“-Modul gekoppelt werden, um somit den Fluidfluss mit einzubeziehen. Des Weiteren kann die Reaktionsrate  $R$  mit dem „Chemical Engineering“ Modul verknüpft werden, um chemische Reaktionen in den Transportvorgängen zu integrieren.

### Laminare Fluidströmung (*Fluid Flow Modul*)

Laminare Fluidströmungen können mit dem *Fluid Flow*-Modul simuliert werden. Dieses Modul wird auch als CFD (*computational fluid dynamics*) Modul bezeichnet. Als Grundlage für die Simulation dient die Navier-Stokes-Gleichung:

$$\rho \frac{\partial u}{\partial t} - \nabla \cdot [\eta(\nabla u + (\nabla u)^T)] + \rho(u \cdot \nabla)u + \nabla p = F$$

2.9

- $\rho$ : Dichte  $\left[\frac{kg}{m^3}\right]$
- $\eta$ : Dynamische Viskosität  $[Pa \cdot s]$
- $F$ : Kraftvektor  $\left[\frac{N}{m^3}\right]$
- $p$ : Druck  $[Pa]$
- $u$ : Geschwindigkeitsvektor  $\left[\frac{m}{s}\right]$
- $t$ : Zeit  $[s]$

Bei der Fluidsimulation mit diesem Modul müssen zwei Bedingungen klar definiert sein. Die erste Bedingung ist, dass eine laminare Strömung vorliegt. Dieses kann über die Reynoldszahl näherungsweise abgeschätzt werden:

$$Re = \frac{u \cdot \bar{l}}{\nu}$$

2.10

- $Re$ : Reynoldszahl  $[/]$
- $\bar{l}$ : Charakteristische Länge  $[m]$
- $u$ : Geschwindigkeitsvektor  $\left[\frac{m}{s}\right]$
- $\nu$ : Viskosität  $\left[\frac{m^2}{s}\right]$

Wird ein kritischer Reynoldswert von 2320 (bei Rohrströmung) überschritten, so treten turbulente Strömungen auf und die Navier-Stokes-Gleichung kann für dieses Problem nicht verwendet werden.

Bei der zweiten Bedingung handelt es sich um die Frage, ob das Fluid zur Vereinfachung auch als inkompressibel angenommen werden kann. Hierfür kann die Machzahl ermittelt werden:

$$Ma = \frac{u}{a} \tag{2.11}$$

$Ma$ : Machzahl [/]

$u$ : Geschwindigkeitsvektor  $\left[\frac{m}{s}\right]$

$a$ : Schallgeschwindigkeit  $\left[\frac{m}{s}\right]$

Ist die Machzahl kleiner als eins, so kann das Fluid als inkompressibel angenähert werden. Bei einem Wert über eins muss in der Simulation die Kompressibilität des Fluides berücksichtigt werden.

### Chemische Reaktion

Chemische Reaktionen von Substanzen können mit dem „*Chemical Reaction Engineering*“ Modul definiert werden. Dieses Modul basiert auf dem Massenwirkungsgesetz, welches durch folgende Reaktion und Gleichung beschrieben wird:

$$R_j = k_j^f \prod_{i \in \text{react}} c_i^{-v_{ij}} - k_j^r \prod_{i \in \text{prod}} c_i^{-v_{ij}} \tag{2.12}$$

$R_j$ : Reaktionsrate der Reaktion  $j$   $\left[\frac{mol}{m^3s}\right]$

$k_j^f$ : Geschwindigkeitskonstante der Vorwärtsreaktion  $\left[\frac{m^3}{smol}\right]$

$k_j^r$ : Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion  $\left[\frac{m^3}{smol}\right]$

$v^{ij}$ : Stöchiometrischer Koeffizient [/]

$c_i$ : Konzentration des gelösten Substrates  $i$   $\left[\frac{mol}{m^3}\right]$

Die chemische Reaktion wird zunächst dimensionslos simuliert und kann anschließend auf einen 2D oder 3D Raum abgebildet werden.

### **Parameter optimieren (*Optimization* Modul)**

Das „*Optimization*“ Modul kann auf alle physikalischen Simulationen angewandt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nur die Parameteroptimierung basierend auf dem SNOPT (*Sparse Nonlinear OPTimizer*) Algorithmus benutzt. Dieser Algorithmus wurde von Philip E. Gill von der San Diego Universität in Kalifornien, sowie von Walter Murray und Michael A. Saunders von der Stanford Universität entwickelt. Es können mit Hilfe von SNOPT sogenannte Maxima oder Minima-Parameter-Probleme gelöst werden. Diese PDE Probleme können stationär oder zeitabhängig sein. Der Algorithmus variiert und sucht nach einem Parameter, mit dem ein Maximum oder ein Minimum eines Zustandes erreicht wird.

# 3 Materialien und Methoden

Die verwendeten Materialien und Methoden werden in diesem Kapitel vorgestellt. Im ersten Abschnitt sind die Materialien und Software aufgelistet. Anschließend wird auf die Zellkultur eingegangen. Hier werden die verwendeten Zellen und die Methoden zur Herstellung der Hautmodelle erläutert. Anschließend werden die Methoden zur Bestimmung der Permeation und der metabolischen Aktivitäten, sowie die dafür verwendeten Messgeräte näher erläutert. Im nächsten Teil werden die verschiedenen Präparationsschritte bis zur histologischen Färbung erläutert. Zum Schluss wird auf die Simulation, Auswertungsmethoden und Datenaufbereitung eingegangen.

## 3.1 Materialien und Software

Die Laborgeräte- und Equipment (Tabelle 3.1), Verbrauchsmaterialien (Tabelle 3.2), Chemikalien, Puffer, Lösungen (Tabelle 3.3) und Medienzusammensetzung (Tabelle 3.4) sind tabellarisch aufgelistet. Im Anschluss wird erläutert, welche Software und Geräte in dieser Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 3.1: Laborgeräte und -Equipment.

Gerät	Details	Firma
Einbettformen aus Metall	Für Biopsien	Carl Roth
Elektrisch beheizbare Pinzette	Leica EG F	Leica
Exsikkator		Nalgene
Fluoreszenzspektrometer	Victor 1420	Wallac Perkin Elmer Inc
Gasbrenner	Portabel mit Kartusche	Camping Gaz
Inkubator	Heracell 150i	Thermo Scientific
Mikroskop	Diaphot	Nikon
Mikroskop (Fluoreszenz)	Eclipse 80i	Nikon
Mikrotom	Microm HM 430	Thermo Scientific
Kryotom	CM1950	Leica
Pipetten		Eppendorf
Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschmann

### 3. Materialien und Methoden

Gerät	Details	Firma
Plattformschüttler	Tiramax 100	Heidolph Instruments
Sicherheitswerkbank	BSK 4040	Kaefer ID
Paraffinstreckbad	MH8515x6	Barnsteadt
Paraffinwärmer		MEDAX
Wärmeschränk	WB120	mytron
Wärmeplatte	MHH6616x6	Barnsteadt
Zählkammer	Neubauer	Marienfeld
Zentrifuge	Avanti J-26S XP	Beckmann

Tabelle 3.2: Verbrauchsmaterialien.

Material	Details	Firma
Biopsiestanzen	4,5 mm Durchmesser	Acu Punch
Blottingpapier	Rotilab	Carl Roth
Deckgläser	24 x 60 mm	Carl Roth
Einbettkassette	40 x 28 x 6,8 mm	Carl Roth
HTS Transwell Permeabel Supports	96 well, Polykarbonat, 0,4 µ, Porengröße	Corning
Kanüle	Verschieden Größe	B.Braun
Kryobehälter		Sakura
Objektträger	HistoBond	Roth
Petrischale	TC-Schale 100	Sarstedt
Pipettenspitze	10 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstedt
Präzisionswischtücher	11 x 21 cm	Kimberley Clark
Reagiergefäß	1 ml, 2 ml, 5 ml	Sarstedt
Serologische Pipette	5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt
Spritze	10 ml, 20 ml Omnifix	Roth
Sterilfilter	0,22 µm Porengröße, 33 mm Durchmesser	Roth
Ultra-low-attachment plate	96 well	Corning
Zellkulturflasche	75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup>	Greiner bio one
Zentrifugenröhrchen	15 ml, 50 ml	Sarstedt

### 3. Materialien und Methoden

Tabelle 3.3: Chemikalien, Puffer und Lösungen.

Chemikalie	Details	Firma
Agarose	High Resolution	Roth
Cadmium Tellurid		Roth
CANdot® quantum dot (CdSe core/shell/shell) 525 nm		CAN
CANdot® quantum dot (CdSe core/shell/shell) 600 nm		CAN
Carbon Quantum Dot		Roth
Essigsäure	96 %	Roth
Ethanol	96 %, >99,8 %	Roth
Fibrinogen		Baxter
Fetales Kälberserum	FBS Superior	Biochrom
Fluorescein Natrium		Roth
Hank's Balanced Salt Solution	Mit Phenolrot	Biochrom
Histofix	4 % Formaldehydlösung	Roth
Histokit	Einschlussmittel	Roth
Isopropanol		Roth
Kaliumiodid		Sigma Aldrich
Kohlenstoffdioxid	Gasflasche	Westfalen AG
Kollagen A	1 mg/ml	Biochrom
Matriderm®	1 mm, 2 mm (105 x 148 mm)	Medskin Solutions
Natriumthiosulfatlösung		Roth
Paraffin	Surgipath Paraplast	Leica Biosystems
Phosphate Buffered Saline	Tabletten	Gibco
Qtracker® 525 Cell Labeling Kit		Invitrogen
Stärke		Roth
Thrombin		Baxter
Trypanblau		VWR
Trypsin/EDTA		GE Healthcare

### 3. Materialien und Methoden

Tabelle 3.4: Wachstumsmedium.

Medium	Komponenten	Konzentration	Firma
D10	DMEM		Lonza
	FBS	10 %	Biochrom
	Penizillin	100 U/ml	Biochrom
	Streptomycin	100 µg/ml	
D05	DMEM		Lonza
	FBS	5 %	Biochrom
	Penizillin	100 U/ml	Biochrom
	Streptomycin	100 µg/ml	
D10A	D10	100 %	
	L-Ascorbic Acid 2-Phosphate Sesquimagnesium Salt Hydrate	50 µg/ml	Sigma Aldrich
DL	Derma Life Basal Medium		Cell Systems
	L-Glutamin	6 mM	
	Extrakt P <sup>TM</sup>	0,4 %	
	Epinephrin	1 µM	
	rh TGF-α	0,5 ng/ml	
	Apo- Transferrin	5 µg/ml	
	Insulin	5 µg/ml	
	Hydrokortison hemisuccinat	100 mg/ml	
	CaCl <sub>2</sub>	0.02 mM	
	Penizillin Streptomycin	100 units/ml 100 µg/ml	Biochrom
DLA	DL	100 %	
	L-Ascorbic Acid 2-Phosphate	50 µg/ml	Sigma Aldrich
E1	EpiLife + HKGS:		Gibco
	Penizillin	100 U/ml	Biochrom
	Streptomycin	100 µg/ml	
E2	E1 Medium	100 %	
	CaCl <sub>2</sub>	1,5 mM	Roth
E3	E2 Medium	100 %	
	L-Ascorbic Acid 2-Phosphate	50 µg/ml	
	KGF	5 ng/ml	Propotech

#### **Verwendete Software**

Die Simulationen wurden mit dem Programm COMSOL Multiphysics (Version 5.1, COMSOL INC.) durchgeführt. Für die Ansteuerung des Fluoreszenzmessgerät Victor 1420 wurde die Software Wallec 1420 Manager verwendet. Die Aufnahme am Mikroskop erfolgte mit dem Programm NIS-Elements AR. Ergebnisauswertung und Diagrammerzeugung wurden mit Origin 8.5.1 durchgeführt und für die statistischen Auswertungen wurden die Programme PASW Statistics 18 und SigmaPlot 10.0 verwendet.

## **3.2 Zellkultur und Hautmodelle**

Für diese Arbeit wurden primäre dermale Fibroblasten und Keratinozyten zu Herstellung der Vollhautmodelle verwendet. Für das Zellmodell wird zusätzlich die Zelllinie HaCaT benutzt. Die Kulturbedingungen der Zellen werden in diesem Kapitel vorgestellt. Anschließend folgt eine Erläuterung der Methoden zur Herstellung der Zell- und Vollhautmodelle. Diese Modelle wurden in der MES kultiviert. Es wurde das 96 und 12 Transwell<sup>®</sup> System von Corning verwendet. Des Weiteren wurden zum Vergleich kommerzielle Hautmodelle verwendet. Die Arbeiten mit Zellen und Hautmodellen erfolgte unter sterilen Bedingungen.

#### **Kultur der Zellen**

Für die Zellkultur wurden die Keratinozytenzelllinie HaCaT (*Human adult low calcium high temperature*), primäre Keratinozyten und primäre Fibroblasten verwendet. Diese Zellen wurden von der TU Berlin zur Verfügung gestellt. Die Fibroblasten wurden im D10 Medium und die HaCaTs wurden im D05 Medium kultiviert. Für die Kultivierung von primären Keratinozyten wurde DL oder E1 Medium verwendet. Soweit nichts anderes angegeben ist, wurden die Zellen sowie die aus den Zellen generierten Modelle bei 37°C, >90 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt im Brutschrank kultiviert. Ein Mediumwechsel wurde drei Mal wöchentlich durchgeführt.

#### **Agarose und Kollagengele**

Für Testung und Validierung der Methoden wurden Agarose- und Kollagengele als Barriere für die Permeationsuntersuchungen verwendet. Des Weiteren wurde das Kollagengel als Grundlage für die Zellmodelle benutzt. Die Methode zu Herstellung dieser Gele wird im Folgenden erläutert.

Das Agarose Hydrogel besteht aus einer Vernetzung von 3,6-Anhydrogalaktose und D-Galaktose und gehört zu der Gruppe der Polysaccharide. Agarosegel wird unter anderem auch zur Validierung von Modellen zur Untersuchung von Diffusionsvorgängen in Geweben genutzt [87]. Für das Herstellen von 2 % Agarose wurde 0,2 g Agarose *High Resolution* Pulver in 10 ml H<sub>2</sub>O auf einem Magnetrührer gemischt und auf 80 °C für 8 min lang erhitzt. Anschließend wurde die flüssige Agarose in das zu untersuchende System pipettiert.

Für die Zellmodelle und Hautmodelle wurde Rattenschwanzkollagen verwendet (Serva/ TU Berlin). Das Kollagengel wurde wie folgt angesetzt: Die Herstellung von Kollagengel erfolgte unter sterilen Bedingungen auf Eis. Die niedrige Temperatur soll den Polymerisationsprozess verzögern. Es wurde zuerst 1 ml Rattenschwanz-Kollagen in saurer Lösung mit 125 µl HBSS (pH 5,5 von Biochrome) zusammenpipettiert und diese mit einer Natronlauge (1 M) bis zum Farbumschlag von gelb nach rotviolett (pH 6,4 – 8,3) trittiert. Für die Vermischung wurde eine 1 ml Pipettenspitze oder ein Zellschaber verwendet. Es wurde darauf geachtet, Blasenbildung zu vermeiden. Im nächsten Schritt wurden 125 µl Zellsuspension in Medium oder nur 125 µl Medium ohne Zellen vorsichtig hinzugegeben und verrührt. Die Zusammensetzungen der Zellsuspension und des Mediums variierten von Versuch zu Versuch. Anschließend wurde die Lösung in das zu untersuchende System pipettiert und bis zu 45 min im Inkubator bei 37 °C ausgehärtet.

#### **Herstellung der Zellmodelle**

Die Zellmodelle sind eine vereinfachte Form der Hautmodelle und wurden für Voruntersuchungen und Methodenentwicklung verwendet. Für das Ansetzen der Zellmodelle wurde Rattenschwanzkollagen benutzt. Das Kollagen wurde, wie zuvor beschrieben, hergestellt. Es wurde im letzten Schritt des Protokolls 125 µl Zellsuspension mit Fibroblasten in D10 anstatt nur Medium hinzugefügt. Das Gel wurde direkt in die MESs pipettiert. Die Zellzahl wurde von Untersuchung zu Untersuchung variiert. Nach der Aushärtung wurde D10 Medium auf und unter das Modell gefüllt. Je nach Größe der MES wurden für das Gel und Medium unterschiedliche Volumina verwendet, welche aus der

Tabelle 3.5 entnommen werden können. Optional wurde anstatt des Rattenschwanzkollagens auch die Matriderm™ Kollagen-Elastin-Matrix verwendet. Hierbei wurde die Zellsuspension direkt in die Matrix geimpft (siehe Herstellung der Vollhautmodelle). Nach einem Tag Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde das Medium im Donator entnommen und eine Suspension mit HaCaT und D05 mit einer Konzentration von 0,5x10<sup>6</sup> Zellen pro ml auf das Kollagen-Zellgel/ die Matrix pipettiert gegeben. Das Medium im Akzeptor wurde gegen D10 ausgewechselt. Es folgte eine zwei- bis dreitägige Kultivierung im Brutschrank für die Proliferation der HaCaT-Zellen. Im nächsten Schritt wurde ein *air lift* durchgeführt. Hierbei wurde das Medium im Donator abgenommen, damit sich die Zellen in der Luft Flüssigkeit-Phase Grenzschicht befinden. Nach zwei- bis siebentägiger Kultivierung wurden die Zellmodelle für die Permeationsversuche verwendet.

#### **Herstellung der Vollhautmodelle**

Die Hautmodelle wurden von Katherina Schimek an der TU Berlin konstruiert [88]. Im Laufe des Projektes wurden drei verschiedene Vollhautmodelle entwickelt. Für diese Arbeit wurden diese Modelle von 1 bis 3 durchnummeriert. Bei der Herstellung variierten die Dauer und das verwendete Medium. Detaillierte Anleitungen zu den jeweiligen Vollhautmodellen sind im Anhang aufgelistet. Im Folgenden wird die Methode zur Herstellung der Vollhautmodelle vereinfacht dargestellt.

Aus einer 1 mm dicken Kollagenmatte (Matriderm®) wurden Stanzen im Durchmesser von 4,5 mm hergestellt, in PBS eingelegt und entgast (siehe Abbildung 3.1 a – b). Anschließend wurde die Stanze in D10A Medium überführt und mit primären humanen Fibroblasten besiedelt (siehe Abbildung 3.1 c). Das Modell wurde ungefähr 8 Tage lang bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Das Medium wurde 3-mal wöchentlich gewechselt. Am Tag 9 wurde die Stanze in ein 96 MES transferiert (siehe Abbildung 3.1 d) und 3 Tage lang weiter in dem System kultiviert. Hierbei wurde über und unter das System Medium gelegt. Dabei ist das Modell im Medium eingetaucht (*submerge* Kultur). Im nächsten Schritt wurde das Medium entnommen und das Modell wurde mit einem Fibringel versiegelt (siehe Abbildung 3.1 e). Es wurde wieder Medium in das MES gefüllt und ein Tag lang im Brutschrank inkubiert. Am Tag darauf wurde das Medium abgenommen und das Modell mit primären humanen Keratinozyten besiedelt (siehe Abbildung 3.1 f) und 7 Tage lang weiter unter *submerge* Bedingungen kultiviert. Am Tag 20 wurde das Medium über dem Modell abgenommen, sodass die Kultur sich in einer Luft-Flüssigkeitsphase befindet (*air lift*) (siehe Abbildung 3.1 g). Anschließend wurde das Modell ein bis zwei Wochen lang im *air lift* weiter kultiviert. Das Medium wurde weiterhin 3-mal die Woche ausgetauscht.

### Hautmodelle von Matek™

Die Hautmodelle der Firma Matek™ wurden von der TU Berlin für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt und wurden anschließend wie im Protokoll beschrieben kultiviert.

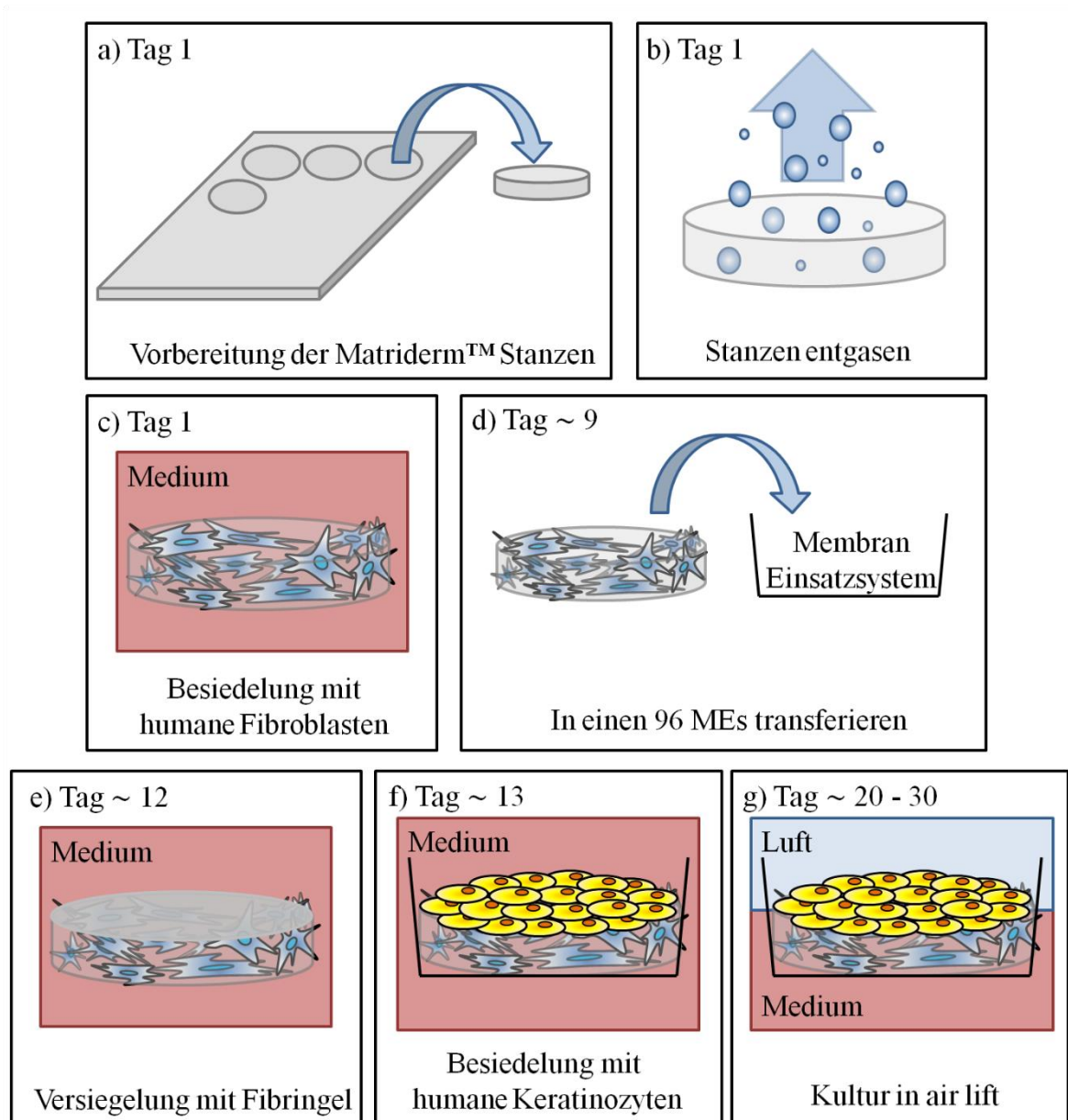


Abbildung 3.1: Arbeitsschritte zu Generierung des Vollhautmodells. a) Zunächst wurden Stanzen hergestellt und im Medium eingelegt. b) Diese wurden dann entgast und c) mit humanen Fibroblasten besiedelt. Nach ungefähr 8 Tagen Kultur wurde d) das Modell in ein Membran Einsatzsystem transferiert. e) Nach Tag 12 wurde das Modell mit einem Fibringel versiegelt. f) Ein Tag darauf erfolgte die Besiedelung mit humanen Keratinozyten. g) Nach ungefähr einer Woche wurde der *air lift* durchgeführt und das Modell zwei Wochen weiter kultiviert.

### **3.3 Methode und Charakterisierung der Permeationsmessung in 2OC und MES**

In Folgenden wird die Nutzung und das Handling des 2OC erläutert. Es wird die Permeationsmessung im MES und 2OC erklärt. Anschließend wird die Methode zur Bestimmung der Glukose- und Laktatkonzentration im Medium beschrieben. Im Anschluss folgt die Darstellung verschiedener Aufbauten zur Untersuchung der Messmethode.

#### **Nutzung und Kultur in 2OC**

Der 2OC und die Pumpensteuerung wurden von der TissUse GmbH für diese Arbeit zu Verfügung gestellt. Umfangreiche Versuche mit 2OCs wurden direkt an der TU Berlin im Fachgebiet Medizinische Biotechnologie durchgeführt.

Für die Versuche mit Hautmodellen wurden die 2OCs mit 80 %igem Ethanol sterilisiert. Die Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen und alle Schraubwerkzeuge wurden vor dem Benutzen sterilisiert. Die einzelnen Bauteile für den 2OC sind in Abbildung 3.2 dargestellt. Zunächst wurden die Halterungen für die Spritzenadapter auf die Adapterplatte geschraubt. Ein Pumpkanal wurde mit drei Pump- und zwei Adapterzugängen verbunden (siehe Abbildung 2.6). An die Halterungen wurden die Spritzenadapter angebracht. Es wurden 2 ml-Spritzen mit 80 % Ethanol gefüllt und auf einen Spritzenadapter aufgesetzt. Auf den anderen Spritzenadapter wurde eine leere Spritze aufgesetzt. Anschließend wurde der Kanal gefüllt, indem vorsichtig das Ethanol von der einen Spritze in die andere gedrückt wurde. Durch mehrmaliges hin- und herdrücken wurden Luftblaseneinschlüsse im Kanal entfernt. Das Ganze wurde 20 min stehen gelassen. Im nächsten Schritt wurde das Ethanol in der einen Spritze gesammelt, diese dann entfernt. Es wurde eine neue Spritze mit PBS gefüllt und durch den Kanal auf die andere Seite gedrückt. Die volle Spritze auf der anderen Seite wurde wieder verworfen. Dieser Schritt mit PBS wurde zweimal durchgeführt und anschließend wurde der 2OC mit dem gewünschten Medium befüllt. Die Halterung und Spritzenadapter wurden abgeschraubt und die jeweilige Halterung angebracht. Für die MES wurde die PEEK Halterung verwendet. Auf der anderen Seite wurde eine Halterung aus Metall oder PC angebracht für die Fluoreszenzmessung, da PEEK als Material zu stark reflektiert. Für die Lagerung bis zur Nutzung wurde in die jeweiligen Halterungen zunächst 200 µl Medium hinein pipettiert.

Für die Permeationsversuche im 2OC ohne Hautmodelle wurden die Kanäle mit H<sub>2</sub>O gefüllt und es war nicht notwendig, die Fluidkanäle mit Ethanol zu sterilisieren.

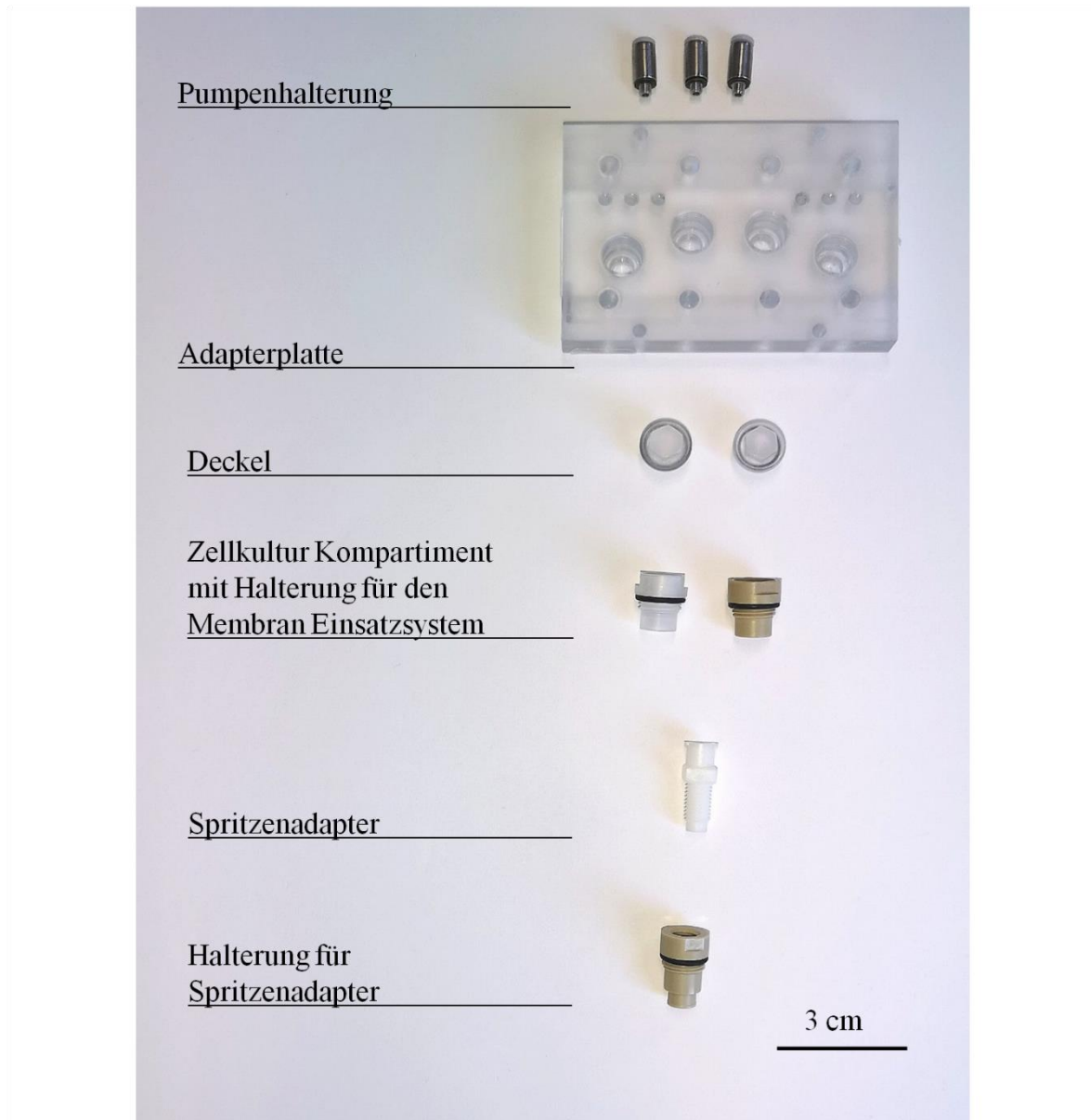


Abbildung 3.2: Darstellung und Benennung der Einzelteile für den 2OC. Auf der Adapterplatte können oben links und rechts die Pumpherhaltungen für die Luftschläuche angeschlossen werden. Auf die größeren Schraubverbindungen passen die Zellkultur-Kompartimente (mit Deckeln) und die Halterung für den Spritzenadapter. Der Spritzenadapter kann zum Befüllen der Fluidkanäle an die Halterung angebracht werden.

### Permeationsmessung in MES

Die Bestimmung der Permeationskonstanten erfolgte in einem MES der Firma Corning (Transwell®). Das MES besteht aus einem Einsatz für eine handelsübliche Well-Platte mit einer Membran. Diese ermöglicht das Kultivieren von Zellen auf der Membran und die Mediumversorgung von unten. Es wurden MES in Größe von 12 und 96 Wellsystemen verwendet.

Die Gele, Haut- und Zellmodelle wurden in dem MES (auf der Membran) hergestellt und dienen als Barriere für die zu untersuchenden Substanzen. Für die Versuche wurden verschiedene Substanzen auf die Barriere appliziert, welche als Donator bezeichnet werden. Die Flüssigkeit auf der anderen Seite der Barriere in der *receiver* Platte, ohne die zu untersuchende Substanz, wird als Akzeptor bezeichnet (siehe Abbildung 3.3). Das Volumen für die Gelbarriere entspricht einer Höhe von 2 mm. Es wurden für den Versuch im 12- und 96 MES verschiedene Volumina für die Barriere, Donator und Akzeptor verwendet (Tabelle 3.5).

Tabelle 3.5: Pipettiervolumen für den Permeationsversuch in einem 12 und 96 MES.

Membran Einsatzsystem	Donatorvolumen [μl]	Barrierevolumen [μl]	Akzeptorvolumen [μl]
12	590	226	1845
96	75	28,6	300

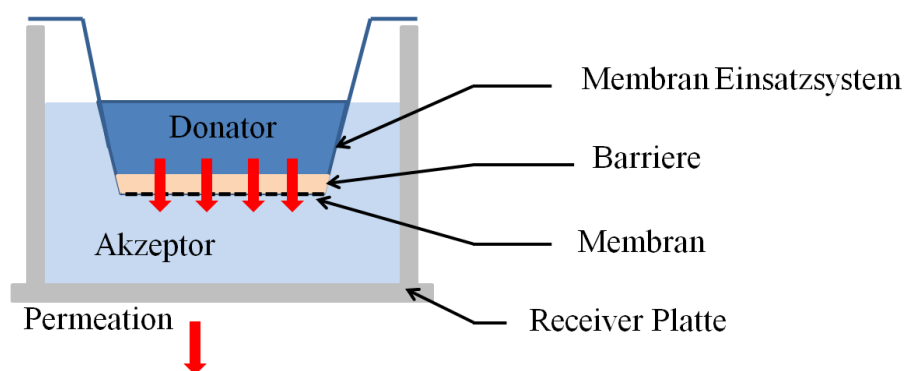


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des Permeationsversuchs in einem MES. Die Barriere befindet sich auf der Membran und steht stellvertretend für die Hautmodelle bzw. Gele. Auf der Barriere wird die zu untersuchende Substanz appliziert, welche als Donator bezeichnet wird. Unter dem Membran befindet sich der Akzeptor, welches aus einer Flüssigkeit (zum Beispiel Wasser oder Medium) besteht was nicht die Substanz beinhaltet.

Die Volumina wurden so abgestimmt, dass der Flüssigkeitsstand von Donator und Akzeptor gleich hoch ist. Somit kann der hydrodynamische Druck der Flüssigkeit im Versuch vernachlässigt werden.

Die Permeationsversuche erfolgten in einer Kammer mit einer Luftfeuchtigkeit von  $\geq 90\%$  und einer Temperatur von  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Dies wurde den Kultivierungsbedingungen der Zellen im Brutschrank nachempfunden. Zusätzlich wurde die Versuchsplatte auf einen Schüttler mit einer Schüttelrate von 480 rpm gelegt, um Konzentrationsgradienten an der Akzeptorseite zu minimieren.

Die Konzentration der permeierten Substanz im Akzeptor wurde mit einem Fluoreszenzmessgerät bestimmt. Hierfür wurden das MES entfernt und die *receiver* Platte in das Fluoreszenzmessgerät gelegt. Nach der Messung wurde das MES wieder auf die *receiver* Platte gelegt und das ganze System in die Kammer zurückgelegt. Eine Messung erfolgt alle 30 bis 60 min.

#### **Permeationsmessung im 2OC**

Die Bestimmung der Permeationskoeffizienten im 2OC ist ähnlich aufgebaut wie im MES. Hierfür wurde ein 96 MES im 2OC an der Position 1 eingesetzt (siehe Abbildung 3.4). Es wurde ein Flüssigkeitsvolumen von  $300\text{ }\mu\text{l}$  in die Halterung an Position 1 vorgelegt. Anschließend wurde das MES eingesetzt. Die überstehende Flüssigkeit wurde nach und nach entnommen. Mit dieser Technik kann Blasenbildung beim Einsetzen vermieden werden. Ein Volumen von 200 bis  $220\text{ }\mu\text{l}$  Flüssigkeit wurde in die Halterung an der Position 2 als Akzeptor hineinpipettiert. Auf die Barriere im MES wurde ein Flüssigkeitsvolumen von  $75\text{ }\mu\text{l}$  als Donator appliziert. Die Halterungen wurden mit einem Deckel verschlossen und das 2OC an das Pumpsystem angeschlossen. Für den Permeationsversuch wurde eine mittlere Pumpgeschwindigkeit von  $15,76\text{ mm/s}$  eingestellt. Während des Versuches wurde der Chip im Brutschrank mit einer Temperatur von  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und einer Luftfeuchtigkeit von  $>90\%$  gelagert. Zur Detektion des permeierten Stoffes wurde alle 30 bis 60 min an der Position 2 mit dem Fluoreszenzsensor modul FluoMod 2.0 gemessen oder die Flüssigkeit wurde in eine 96 Well-Patte überführt und die Fluoreszenz mit dem Fluoreszenzmessgerät bestimmt.

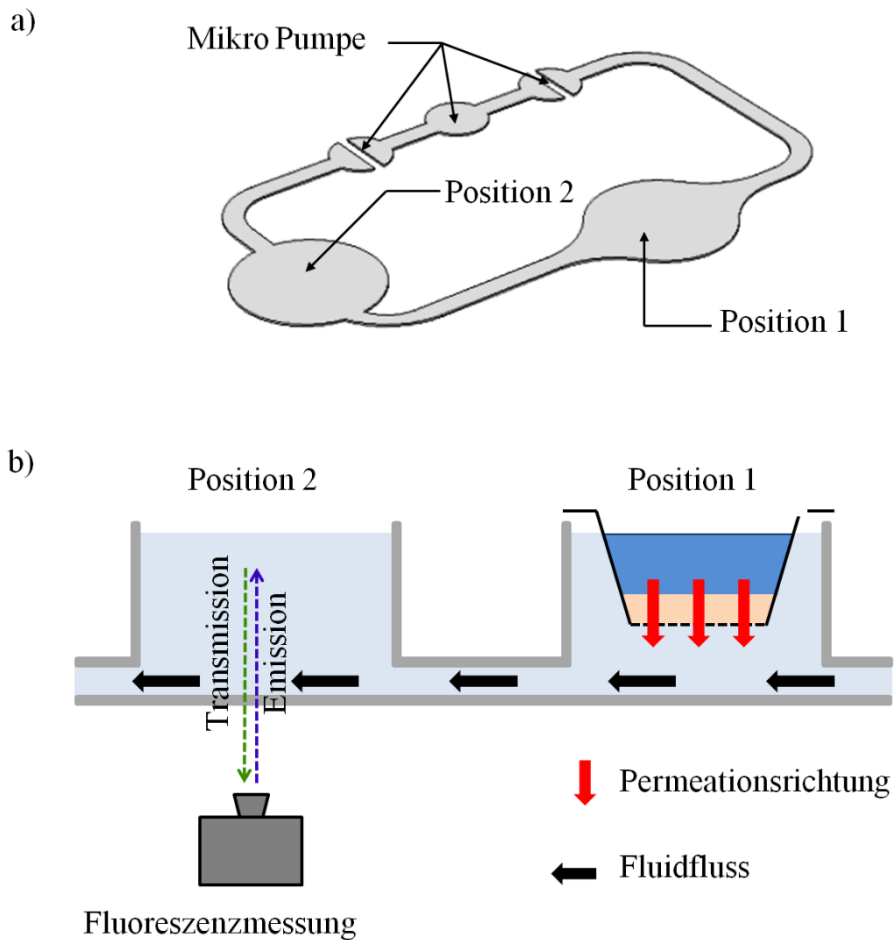


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung des Permeationsversuchs im 2OC. a) Deklaration von Position 1 und Position 2 am 2OC Flusskanal. b) Vereinfachte Seitendarstellung des Permeationsversuches in einem 2OC. Am Position 1 wird das 96 MES eingesetzt und an der Position 2 erfolgt die Fluoreszenzmessung mit FluoMod 2.0.

### Permeationsmessung mit Nanopartikeln

Zur Bestimmung der Permeation von Nanopartikeln wurden das EpiDerm™ Modell in die 48 Well Platte überführt und in einer Halterung (siehe Abbildung 8.3) positioniert. Nanopartikel wurden in regelmäßigen Abständen mit einem Volumen von 2 µl auf das Hautmodell appliziert. Auf der Abbildung 3.5 ist schematisch der Versuchsaufbau dargestellt. Es wurde darauf geachtet die Substanz möglichst in die Mitte des Modells zu pipettieren. Die Fluoreszenzmessung erfolgte nach 24 h. Während der Durchführung wurde die Platte im Brutschrank bei 37 C mit 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

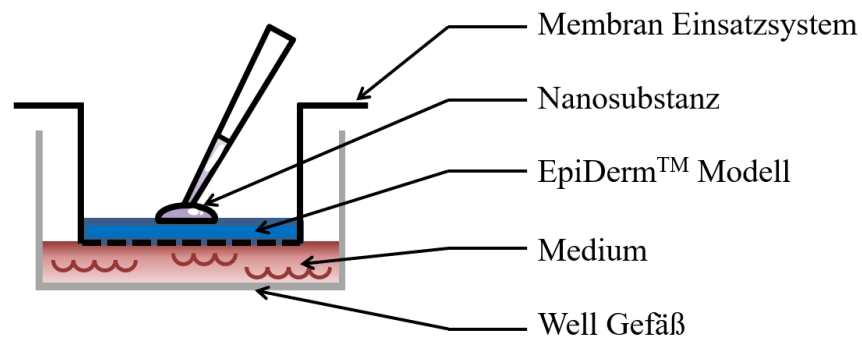


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung der Permeationsbestimmung. Das Hautmodell befindet sich auf der Membran eines Membraneinsatz-System. Die zu untersuchende Substanz wird direkt auf das Hautmodelle appliziert. Direkt unter den Hautmodelle befindet sich das Medium in einem größeren Well-Gefäß.

#### **Verwendetes Permeat und Nanopartikel**

Als Permeat für die Permeationsversuche wurde überwiegend Fluorescein Natrium (FN, Roth) verwendet. Für die Untersuchung von verschiedenen größeren Molekulargewichten (wt) kam FITC-Dextran (FD, fluorescein isothiocyanate-dextran, Sigma-Aldrich) mit wt von 4.000 bis 70.000 zum Einsatz. Die Applikation von Nanopartikeln erfolgte mit verschiedenen toxischen sowie nicht toxischen Materialien. Ungelöste Substanzen wurden je nach Versuchsaufbau in H<sub>2</sub>O oder im Medium gelöst. Im Folgenden werden die verwendeten Nanopartikel genauer erläutert.

**Cadmium Tellurid** (CdT, Roth) besteht aus einer Verbindung zwischen Cadmium und Tellur und findet seine Anwendung in der Halbleitertechnik und in Solarzellen. Trotz der leicht toxischen Eigenschaft des Materials findet es auch Anwendung als fluoreszierende Marker in der Zellkulturtechnik [89]. Der Fluoreszenzanregungsbereich liegt bei einer Wellenlänge zwischen 505 – 515 nm. In der Literatur wird ein Größenbereich von 2,0 bis 4,0 nm von CdT angegeben [89,90].

**Carbon Quantum Dots** (CQD, Sigma-Aldrich) bestehen aus einwandigen Kohlenstoff-Nanoröhren. Sie sind gering toxisch und eignen sich sehr gut für Bioimaging. Diese Substanz kann sehr gut mit einer Wellenlänge von 380 nm, 410 nm und 440 nm angeregt werden. Der Emissionsbereich liegt bei 450 bis 550 nm. Die Partikelgröße bewegt sich unter 10 nm.

Es wurden **verschiedene Quantum Dots** verwendet (QD, Qdot®). Diese sind in Tabelle 3.6 aufgelistet. Quantum Dots sind kleine Materialstrukturen, die überwiegend aus Halbleitern bestehen. Durch deren räumliche Anordnung können ihre Energiewerte nur eingeschränkte Spektren annehmen (innere Quanteneffekte), wodurch diese lumineszieren oder mit Fluoreszenz angeregt werden können. Die Quantum Dots von CAN sind toxisch, nicht wasserlöslich und lumineszieren.

Tabelle 3.6: Liste der verwendete Quantum Dots

Quantum Dots	Abkürzung	Extension/ Emission in nm	Hersteller
Qtracker® 525 Cell Labeling Kit	Q525	405-485/525	Invitrogen
Qdot™ 545 ITK™ organic quantum dots	Q545	UV bis blau und grün/545	Invitrogen
CANdot® qantum dot (CdSe core/shell/shell) 525 nm	C525	-/525	CAN
CANdot quantum dot (CdSe core/shell/shell) 600 nml	C600	-/600	CAN

#### **Bestimmung der Konzentration von Glukose und Laktat in MES**

Für diesen Versuch wurden Zellen- oder Vollhautmodelle im 96 MES generiert. Das alte Medium wurde abgenommen und durch neues ersetzt. Hierbei wurde auch Medium direkt auf die Modelle pipettiert. Die verwendeten Mengen sind aus der Tabelle 3.5 zu entnehmen. Während des Versuches blieben die Proben im Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C, >90 % Luftfeuchtigkeit und einem CO<sub>2</sub> Gehalt von 5 %. Bei der Probenentnahme wurde das Medium im Well sowie auf dem Modell entnommen und für die Glukose-/Laktatbestimmung eingefroren. Es wurde pro Entnahme immer das Medium aus zwei Proben entnommen und die Lösungen zusammen pipettiert, um genügend Volumen für die Messung zur Verfügung zu stellen. Die Konzentration von Glukose und Laktat wurde mit einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie oder mit einem enzymatischen Analyse Gerät bestimmt.

#### **Charakterisierung der Messmethode zur Bestimmung der Permeation**

Zur Bestimmung der Permeationskoeffizienten von Hautmodellen, sowie Messung der Glukoseverbrauch und Laktatproduktion, wurden Methoden entwickelt, die bereits in diesem Kapitel beschrieben wurden. Ein Ziel war es, verschiedene Einflussfaktoren auf die Permeation in einem MES zu identifizieren und die Sensitivität einzuschätzen. Hierfür wurden Gele oder Zellmodelle als Ersatz für die Hautmodelle verwendet. Zur Analyse der Methode wurden sechs verschiedene Schwerpunkte untersucht, die in Tabelle 3.7 aufgelistet sind. Im Anschluss folgt eine detaillierte Beschreibung des Arbeitsprogramms zur Untersuchung der Methode.

Tabelle 3.7: Arbeitsprogramm zur Analyse der Methode.

Methodenanalyse	
A)	Permeation in verschieden großen MES
B)	Einfluss der Membran auf die Permeationsmessung
C)	Permeationsmessung mit verschiedener Partikelgrößen
D)	Permeationsmessungen mit Zellmodellen
E)	Permeationsmessungen im 2OC
F)	Bestimmung der Glukose und Laktatkonzentration im MES

#### A) Permeation in verschieden großen MES

Es wurden Permeationmessungen in einem 12 und 96 Well großen MES durchgeführt, die einen Membrandurchmesser von 12 mm und 4,26 mm besitzen. Als Barriere wurde 2 %iges Agarosegel benutzt und die Donatorsubstanz war FN mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml in H<sub>2</sub>O.

#### B) Einfluss der Membran auf die Permeationsmessung

CORNING bietet verschiedene TW-Systeme an. Neben verschiedenen TW Größen von 96 bis 6 Well existieren auch Membranen, die aus unterschiedlichen Materialien und Porengrößen bestehen. Von den drei vorhandenen Materialien Polyester (PE), Polycarbonat (PC) und Polytetrafluoethylen (PTFE) sind laut Datenblatt nur die ersten zwei genannten für die Kultivierung von Geweben geeignet. Die vorhandene Porengröße der Membranen bewegt sich in Bereichen von 0,4 bis 8,0 µm. Es wurde untersucht, wie stark die Beschaffenheit der Membranen die Permeationseigenschaften beeinflusst. Hierfür wurden Permeationsversuche mit FN (0,1 mg/ml) durch die Membran mit und ohne 2 %iges Agarosegel durchgeführt. Es wurden Membranen bestehend aus PE und PC mit jeweils einer Porengröße von 0,4 und 3,0 µm verwendet.

#### C) Permeationsmessung mit verschiedenen Partikelgrößen

In diesem Abschnitt soll der Einfluss verschiedener Partikelgrößen der Substanz auf die Permeationseigenschaften untersucht werden. Hierfür wurden Permeationsversuche im 96 Well MES mit 2 %igem Agarosegel durchgeführt. Es wurden FN mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml und FICT-Dextran 4.000, 10.000, 20.000 und 40.000 mit einer Konzentration von 4 mg/ml als Substanz verwendet. Die Konzentration wurde eher auf die Farbintensität angepasst und nicht auf die Molarität. Bereits in vorangegangenen Versuchen wurde festgestellt, dass die Konzentration der Substanzen keinen Einfluss auf die Permeation hat. Aus diesem Grund wurde der Faktor nicht konstant gehalten.

#### D) Permeationsmessungen mit Zellmodellen

Es sollte geklärt werden, ob die Methode sensitiv genug ist, geringe Veränderungen an Zellmodellen zu detektieren. Hierfür wurden in einem 12 Well MES Zellmodelle bestehend aus nur Kollagengel, Kollagengel + Fibroblasten, Kollagengel + HaCaT und Kollagengel + Fibroblasten + HaCaT hergestellt. An diesen Modellen wurde die Permeation von 0,1 mg/ml FN ermittelt. Des Weiteren wurde die Zellzahl der Fibroblasten variiert, um zu prüfen ob dies einen Einfluss auf die Permeation hat. Diese Versuche wurden im 96 Well MES durchgeführt. Es wurde weiterhin FN mit derselben Konzentration gearbeitet. Die Zellkonzentration der Fibroblasten variierte von  $0,11 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^5$  Zellen pro Gel.

#### E) Permeationsmessungen im 2OC

Für die Permeationsmessung im 2OC wurde 2 %iges Agarosegel in einem 96 Well MES hergestellt. Dieser wurde an der Position 1 (siehe Abbildung 3.4) im 2OC eingesetzt. Als Permeat wurde 0,01 mg/ml FN verwendet. In den Akzeptor wurde 200  $\mu$ l H<sub>2</sub>O (+ 20  $\mu$ l Flüssigkeit im Kanal) pipettiert. Der Permeationsversuch wurde in 7 Kreisläufen durchgeführt.

#### F) Bestimmung der Glukose und Laktatkonzentration im MES

Es soll untersucht werden, ob eine Änderung der Glukose und Laktatkonzentration im MES messbar ist. Hierfür wurden zwei verschiedene Zellmodelle verwendet. Das eine bestand aus Kollagengel + HaCaT + Fibroblasten und das andere aus Matriderm™ + HaCaT + Fibroblasten. Es wurden zwei unterschiedlich lange Versuche durchgeführt mit einer Versuchsdauer von 6 bis 12 Stunden und 71 Stunden. Die Mediumentnahme erfolgte in einem Intervall von 1 bis 6 Stunden, wobei das Medium immer aus zwei Modellen entnommen wurde. Die Glukose- und Laktatkonzentration aus der Mischung wurde im Anschluss mit der HPLC bestimmt.

## 3.4 Histologie

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit den verwendeten histologischen Methoden. Es wird zunächst die Entwässerung und Einbettung der Hautmodelle nach der Kultivierung und den Versuchen erläutert. Im Anschluss wird die Herstellung histologischer Schnitte und die HE-Färbung beschrieben.

### Entwässerung und Einbettung

Die Proben wurden nach der Kultivierung und den Versuchen zwei bis drei Mal in PBS gewaschen und anschließend zur Fixierung 1 Tag lang in 4 %ige gepufferte Formalinlösung (HistoFix von Roth) eingelegt. Im nächsten Schritt wurden die Hautmodelle aus den TWs geschnitten. Wenn möglich, wurde die Membran, auf der die Modelle kultiviert wurden, entfernt. Im Anschluss wurden die Proben in Pergamentpapier gewickelt und in Einbettkassetten gelegt. Für die Entwässerung wurden die Proben jeweils für eine bestimmte Zeit in eine aufsteigende Ethanolreihe gelegt. Die Dauer und die Konzentration sind in der Tabelle 3.8 aufgelistet.

Tabelle 3.8: Arbeitsschritte zur Entwässerung. Die Proben wurden nacheinander in ein Gefäß mit aufsteigender Ethanolkonzentration eingelegt.

Schritt	1	2	3	4	5	6	7
Ethanolkonzentration	50 %	70 %	80 %	90 %	96 %	99,8 %	99,8 %
Dauer des Einlegens	1,0 h	1,0 h	1,0 h	1,0 h	1,0 h	0,5 h	0,5 h

Nach der Entwässerung folgte die Einbettung in Paraffin. Hierfür wurde Paraplast<sup>®</sup> (Leica Systems) in einem Wärmeschrank bei 60 °C geschmolzen. Die Proben wurden zunächst für 3 h in Paraplast<sup>®</sup>/Isopropanol (1:1) eingelegt. Anschließend folgte das Einlegen in drei Paraplast<sup>®</sup>-Behälter für jeweils 3 h. Diese Schritte dienen zur Infiltration der Proben mit Paraffin. Zum Schluss wurden die Proben in einem Paraplast Block fixiert.

#### **Histologische Schnitte**

Die histologischen Schnitte wurden mit einem Mikrotom durchgeführt. Hierbei wurden die Probenblöcke eingespannt und Schnitte mit Schichtdicken von 3 – 5 µm angefertigt. In einem 37 °C temperierten Wasserbad wurden die Schnitte entspannt und auf einen Objektträger mit Blottingpapier fixiert. Die Trocknung der Proben erfolgte auf einer Objektträger-Trockenbank bei einer Temperatur von 40 – 50 °C.

#### **Kryoschnitte**

Am Ende der Permeationsuntersuchungen mit Nanopartikeln wurden die Hautmodelle mit Kryomedium Tissue Tek eingefroren. Mit der Kryotom wurden 8 µm dicke Proben geschnitten und an einem Objektträger angebracht. Die Arbeitstemperatur in der Kammer und auf dem Schlitten des Kryotoms wurde auf -21 °C eingestellt. Die Proben auf dem Objektträger wurden bis zur Färbung und Mikroskopie bei -4 °C im Kühlschrank gelagert.

#### **HE-Färbung**

Für die HE-Färbung (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) wurden die Proben auf Deckgläser nacheinander zwei Mal für 10 min in Roti<sup>®</sup>-Histol entparaffiniert. Im Anschluss folgte eine Hydrierung mit einer absteigenden Ethanolreihe. Hierfür wurden die Proben für 2 min nacheinander in 2x100 %, 90 %, 80 %, 70 %, 50 % Ethanol-Wasser Gemisch und bidestilliertes Wasser getaucht. Im nächsten Schritt wurden die Proben 10 min lang in Hämalaun-Lösung eingelegt, 2 min in Leitungswasser gespült und kurz für 20 s in eine HCL-Alkohol Lösung (0,3 % HCL in 96 % Ethanol) eingetaucht. Das Bläuen der Hämalaun-Färbung erfolgte für 6 min unter fließendem Leitungswasser. Mit bidestilliertem Wasser wurden die Proben gespült und anschließend für 10 min in Eosin-Lösung gefärbt. Zum Schluss folgte wieder eine Reinigung mit bidestilliertem Wasser und die Proben wurden mit Roti<sup>®</sup>-Histokitt eingedeckelt. Anschließend wurden die Proben mikroskopiert.

## 3.5 Auswertung und Messgeräte

In diesem Teilkapitel werden die Methoden zur Auswertung und Beurteilung der Ergebnisse in dieser Arbeit genauer erläutert. Des Weiteren werden die verschiedenen Messgeräte kurz umrissen, die für die Versuche verwendet wurden.

### Auswertung der Permeationsversuche

Die gemessenen Werte aus den Permeationsversuchen wurden mit Hilfe einer Kalibrierungskurve in Konzentrationen ( $\text{mol/m}^3$ ) konvertiert. Die Kalibrierungskurve wurde aus den Fluoreszenzlösungen mit definierten Konzentrationen hergestellt (Verdünnung von 1/10 bis 1/320). Um die Permeationskonstante zu ermitteln wurde die Gleichung 2.7 genutzt. Die ermittelte Konzentration im Akzeptor wurde über die Zeit aufgetragen und der lineare Bereich wurde zur Bestimmung der Permeationskonstante verwendet.

### Variationskoeffizient

Der Variationskoeffizient beschreibt eine prozentuale Streuung der Werte um einen Mittelwert. Diese Größe wird in der Auswertung verwendet, um die Reproduzierbarkeit der Versuche darzustellen. Der Variationskoeffizient  $c_v$  wird wie folgt ermittelt:

$$c_v = \frac{\sigma}{\mu}$$

3.1

$c_v$ : Variationskoeffizient [%]

$\sigma$ : Standardabweichung [/]

$\mu$ : Mittelwert [/]

### Anpassgüte

Die Anpassgüte wird verwendet, um zu prüfen, wie gut die Simulation die experimentelle Werte im Vergleich zum Mittelwert beschreibt. Bewegt sich der Wert in Richtung Eins bedeutet es, dass die Simulation besser ist als der Mittelwert. Die Qualität der Simulation lässt nach, wenn sich der Wert Richtung Null bewegt. Nimmt die Anpassgüte einen

negativen Wert an, so ist der Mittelwert die bessere Anpassung an das experimentelle Ergebnis als die Simulation. Die Formel ist wie folgt definiert:

$$r^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - y_s)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - y_m)^2}$$

3.2

- $r^2$ : Anpassgüte [/]
- $n$ : Anzahl der Messpunkte [/]
- $y_i$ : Experimenteller Wert [/]
- $y_s$ : Simulierter Wert [/]
- $y_m$ : Gemittelter Wert der experimentellen Daten [/]

#### **Statistik**

Zum Vergleich von Stichproben wurde eine statistische Auswertung durchgeführt. Hierfür wurde das Programm PASW (Version 18, SPSS Inc.) verwendet. Die Testung auf Normalverteilung der Werte erfolgte mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test und die Homogenität der Varianz wurde mit der Levene-Statistik geprüft.

Beim Vergleich zweier Gruppen wurde für normalverteilte Werte der t-Test verwendet, bei homogener und inhomogener Varianz. Waren die Werte nicht normalverteilt, wurde der Mann-Whitney-U Test verwendet.

Beim Vergleich mehrerer Stichproben wurden für normalverteilte Werte eine ANOVA (*analysis of variance*) und ein Post-Hoc-Test (Tukey) durchgeführt. Im Falle, dass die Homogenität der Varianzen nicht gegeben ist, wurde ein Post-Hoc-Test (Tamhane) durchgeführt. Existiert keine Normalverteilung, so wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Das Signifikanzniveau wurde auf 5 % festgelegt.

#### **Fluoreszenzmessgerät Viktor 1420 Multilable Counter**

Zur Bestimmung der permeierten Fluoreszenzsubstanzen in den MES wurde das Fluoreszenzmessgerät Viktor 1420 Multilable Counter (Perkim Elmer) verwendet. Es wurde die Anzahl der Photonen über eine definierte Zeitdauer von 0,5 s bestimmt und als Messwert ausgegeben. Hierfür wurde zur Anregung eine Wellenlänge von 485 nm verwendet und die

Emission fand bei einer Wellenlänge von 535 nm statt. Zur Ansteuerung des Messgerätes wurde das Programm Wallac 1420 verwendet.

#### **Fluoreszenzsensor modul FluoMod 2.0**

Die Detektion der fluoreszierenden Substanz im Einsatz 2 (Akzeptor) des 2OCs erfolgte mit dem Fluoreszenzsensor modul FluoMod 2.0. Dieses wurde vom Fraunhofer-Institut für Werkstoff- und Strahlentechnik IWS speziell für die Anwendung im 2OC entwickelt. Das Gerät ist mobil und nicht in einem Gehäuse, wie zum Beispiel bei herkömmlichen Fluoreszenzreadern, integriert. Das Licht wird mittels zweier Dioden mit verschiedenen Wellenlängen (Anregung  $479\pm 20$  nm und  $585\pm 20$  nm) erzeugt und ermöglicht die zeitgleiche Messung von zwei Fluoreszenzfarbstoffen. Die Detektion erfolgt über einen PMT Detektor (Detektion  $524\pm 20$  nm und  $628\pm 20$  nm).

#### **HPLC Kontron®**

Die Glukose- und Laktatkonzentration wurde mittels einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) von Kontron® bestimmt. Hierfür wurde eine Trennsäule Aminex HPX-87H column (300 x 7,8 mm) verwendet. Die zu untersuchende Flüssigkeit wurde mit einer Geschwindigkeit von 0,6 ml/min durch die Säule befördert und der Druck betrug dabei ungefähr 76 bar. Als mobile Phase wurde eine Flüssigkeit aus bidestilliertem Wasser mit 5 mM Schwefelsäure verwendet.

### **3.6 Numerische Simulation**

Die Simulation der Experimente im MES und im MOC wurde mittels COMSOL Multiphysics durchgeführt.

Für die Simulationen wurden folgende Vereinfachungen angenommen:

- a) Der Diffusionskoeffizient des zu untersuchenden Substrates in Wasser ist viel höher als im Gel, da diese auf dem Schüttler kontinuierlich vermischt wurde. In der Simulation wurde für alle Substanzen der Diffusionskoeffizient in Wasser als  $1 \times 10^{-8}$  m/s festgelegt.

- b) Im Versuch diffundiert die Substanz durch die Barriere und anschließend durch die Membran des MES. Für die Simulation wurden Barriere und Membran als ein homogener Körper angenommen.
- c) Für die Fluidflusssimulation wurden alle Randeffekte als „nicht gleitend“ (*no slip*) angenommen.
- d) Bei der Fluidflusssimulation wurde die Flussgeschwindigkeit als konstant angenommen. Im Versuch wurde die Flüssigkeit über eine Pumpe durch das 2OC befördert, bei der bauartbedingt eine Pulsation nicht auszuschließen ist. Des Weiteren wurde die Strömung als laminar und inkompressibel angenommen (siehe Anhang 8.1)
- e) Die Geometrie wurde im Vergleich zum realen Körper zum Teil auch vereinfacht dargestellt. Dieses wird in den jeweiligen Simulationen genauer beschrieben.

Im Folgenden wird der Aufbau der Simulation im MES und im 2OC näher erläutert. Hierbei werden chronologisch die einzelnen Module und Punkte zum Aufbau des Programmes beschrieben.

#### **Simulation der Permeation im MES**

Erstellung der Geometrie:

Zu Beginn der Simulation wurde die Geometrie des MES (Volumen von Donator, Akzeptor und Gel) in die Simulation integriert. Hierfür wurde das in COMSOL vorhandene Geometrie-Modul verwendet. Die leicht konische Form des Donators und die elliptische Form des Akzeptors der 96 Well MES wurden vernachlässigt und als Zylinder angenommen. Das Gel im MES weist, auf Grund der Oberflächenspannung eine stark konkave Krümmung auf. Diese wurde in der Geometrie mit Hilfe einer Kugelfläche mit dem Radius  $r$  angenähert. Für die 12 Well MES wurde die Krümmung in der Simulation vernachlässigt, da diese im Verhältnis zur Durchmesser relativ gering ausfällt. Die geometrischen Parameter sind in der Tabelle 3.9 aufgelistet und auf der Abbildung 3.6 e) dargestellt. Auf der Abbildung 3.6 a) und b) sind die Geometrien der MES zu sehen. Auf Grund der Symmetrie des Körpers wurde nur ein Viertel der gesamten Geometrie verwendet, somit kann in der Simulation Rechenzeit eingespart werden.

Vernetzung der Geometrie:

Für das Vernetzen wurde die automatische Netzgenerierung des Simulationsprogrammes verwendet. Als Auswahl stehen mehrere Abstufungen der Netzdichte zur Verfügung. Es wurde für das 96 Well MES die Einstellung „fein“ als Netzdichte für die Generierung von Donator und Akzeptor verwendet, die Option „extrem fein“ für die Generierung der Barriere.

### 3. Materialien und Methoden

---

Für das 12 Well MES wurde die Netzdichte mit der Einstellung „normal“ für Donator und Akzeptor und die Einstellung „feiner“ für die Barriere verwendet. Die Vernetzungselemente bestanden aus Tetraedern.

Tabelle 3.9: Geometrie-Parameter zur Erstellung der 96 und 12-Well MES für die Simulation.

Geometrie Parameter	für 96 MES in [mm]	für 12 MES in [mm]	Beschreibung
d_tran	5,65	14,7	Durchmesser des MES
d_a	4,26	12,1	Durchmesser der Membran
d_w	8,79	21,97	Durchmesser des Akzeptors
h_b	2	2	Höhe der Barriere
h_sp	1	1	Spalt zwischen Transwell und Boden
h_a	3,37	5,24	Höhe des Akzeptors
b	$h_b/2$	-	Eintauchtiefe der Kugel
r	$((d_a)^2+4*b^2)/(8*b)$	-	Radius der Kugel

Alle Elementargrößenparameter wie maximale und minimale Elementargröße, maximale Element-Wachstumsrate, Krümmungsfaktor und Auflösung kleinerer Bereiche wurden vom Programm selbst festgelegt. Diese Parametergrößen sind für das 96 Well MES auf der Tabelle 3.10 und für 12 Well MES auf der Tabelle 3.11 aufgelistet. Wichtig bei der Netzgenerierung ist die Reihenfolge. Es wurde zuerst das feinere Netz in der Barriere generiert und anschließend der Rest.

Definition von Messsonden:

COMSOL ermöglicht es, Messsonden in die Simulation zu integrieren, um dort gewünschte simulierte Werte bestimmen zu können. Es wurden jeweils eine Gebietsmesssonde im Donator und Akzeptor definiert. Diese ermitteln den Mittelwert der Substratkonzentration.

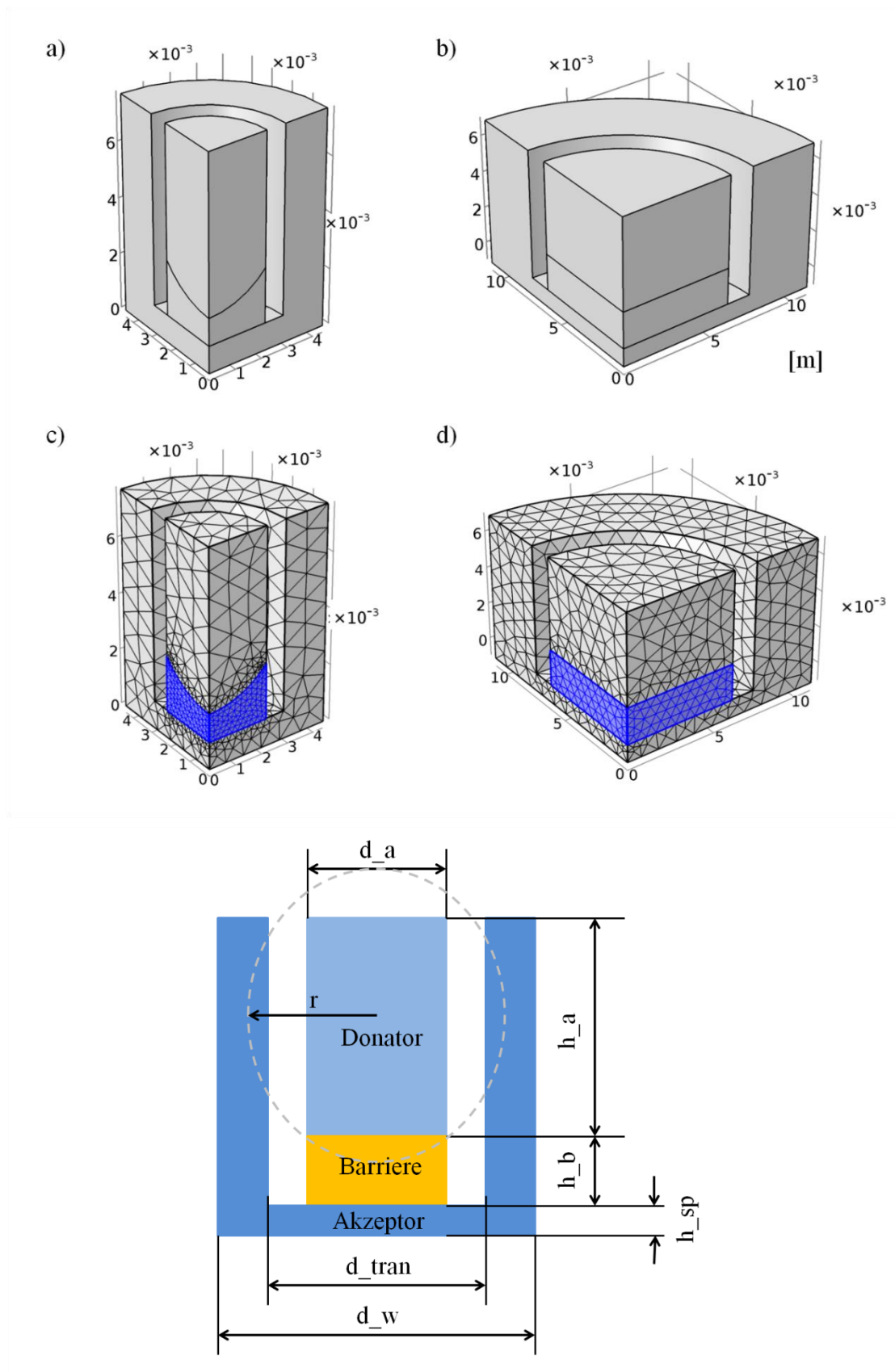


Abbildung 3.6: Geometrie und Vernetzung der MES für die Simulation. Darstellung der Geometrie für den 96 Well MES a) und 12 Well MES b). Zum Vernetzen wurde das integrierte Programm

### 3. Materialien und Methoden

verwendet, wobei die Barriere (in blau) feiner vernetzt wurde (c und d). e) Auflistung und Darstellung der einzelnen geometrischen Parameter der MES.

Tabelle 3.10: Auflistung der Elementargeößenparameter beim Vernetzen für die Geometrie des 96 Well MES.

Elementargeößenparameter	für 96 Well MES „fein“ Einstellung	für 96 Well MES „extrem fein“ Einstellung
Maximale Elementargeöße	0,904 mm	0,226 mm
Minimale Elementargeöße	0,113 mm	$2,26 \times 10^{-3}$ mm
Minimale Element-Wachstumsrate	1,45	1,13
Krümmungsfaktor	0,5	0,2
Auflösung kleiner Bereiche	0,6	1

Tabelle 3.11: Auflistung der Elementargeößenparameter beim Vernetzen für die Geometrie des 12 Well MES.

Elementargeößenparameter	für 12 MES „normal“ Einstellung	für 12 MES „feiner“ Einstellung
Maximale Elementargeöße	1,1 mm	0,604 mm
Minimale Elementargeöße	0,198 mm	0,0439 mm
Minimale Element-Wachstumsrate	1,5	1,4
Krümmungsfaktor	0,6	0,4
Auflösung kleiner Bereiche	0,5	0,7

#### Transport verdünnter Spezies (*Transport of Diluted Species*):

In dem Modul „*Transport of Diluted Species*“ wurde die Randbedingung für die Diffusionssimulation definiert. Hierbei wurde der Diffusionskoeffizient im Akzeptor und im Donator auf einen Wert von  $1 \times 10^{-9}$  m/s festgelegt. Der Diffusionskoeffizient in der Barriere wurde je nach zu untersuchendem Problem angepasst. Für die Parameteroptimierung wurde der Koeffizient in der Barriere als die zu optimierende Variable D angenommen. Zu Untersuchungen von Diffusionsvorgängen wurde der Koeffizient einem definierten Wert zugeordnet.

Der Barriere und dem Akzeptor wurde eine Startkonzentration von Null zugewiesen. Beim Donator wurde die Startkonzentration der zu untersuchenden Substanz eingegeben (siehe Tabelle 3.12). Wie bereits erwähnt, wurde nur ein Viertel der Geometrie für die Simulation verwendet. Die Schnittflächen wurden in diesem Modul als spiegelsymmetrisch definiert.

### 3. Materialien und Methoden

Tabelle 3.12 Verwendete Donatorkonzentration für die Simulation.

Substanz	Abkürzung	Konzentration [mol/m <sup>2</sup> ]
Fluorescein Natrium	C_fl	0,266
FITC-dextran 4.000 g/mol	C_4	0,5
FITC-dextran 10.000 g/mol	C_10	0,2
FITC-dextran 20.000 g/mol	C_20	0,1
FITC-dextran 40.000 g/mol	C_40	0,05

#### Optimierung (*Optimization*):

Für die Anpassung der Diffusionskoeffizienten an experimentell ermittelte Werte wurde das „*Optimization*“ Modul verwendet. Es wurde eine „Globale Funktion der kleinsten Quadrate“ (*global least-squares objective*) erstellt. Mittels dieser Funktion konnten die experimentellen Werte eingelesen werden. Aus den Experimenten wurden die Zeit und die Konzentration im Donator (C) eingelesen. Im nächsten Schritt wurde im Optimierungsmodul die „Globale Steuerungsvariabel“ (*global control variables*) definiert. Hier wurde die Variable D\_unbe (für unbekannter Diffusionskoeffizient) deklariert mit einem Anfangswert von 1, einer unteren Beschränkung von 0 und einer oberen Beschränkung von 100. Da der Diffusionkoeffizient um einem Faktor  $\times 10^{-10}$  kleiner ist, wurde eine Variable D deklariert mit dem Ausdruck „D\_unbe\*1e-10“. Die Variable D wird somit in der Simulation als unbekannter Wert in der Definition der Barriere eingesetzt.

#### Reaktionstechnik (*Reaction Engineering*):

Zur Simulation des Glukoseverbrauchs und der Laktatproduktion der Zell- und Vollhautmodelle wurden in diesem Modul zwei Reaktionen deklariert:



G: Glukose  $\left[\frac{\text{mol}}{\text{m}^3}\right]$

A: Ersatzvariable für reagierte Glukose  $\left[\frac{\text{mol}}{\text{m}^3}\right]$

L: Laktat  $\left[\frac{\text{mol}}{\text{m}^3}\right]$

B: Ersatzvariable für reagiertes Laktat  $\left[\frac{\text{mol}}{\text{m}^3}\right]$

t: Zeit [s]

Kopplung zwischen Glukoseverbrauch und Laktatproduktion wurde mit Ersatzvariablen realisiert. Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde experimentell bestimmt. Die ermittelten Reaktionsraten wurden in die Simulation eingetragen und mit einem Volumenfaktor von 17,83 multipliziert. Dieser Faktor ist das Verhältnis zwischen Reaktionsvolumen zu restlichem Substanzvolumen (siehe Gleichung 3.5).

$$\text{Volumenfaktor} = \frac{\text{Substanzvolumen}}{\text{Barrierevolumen}} = \frac{9,29 \cdot 10^{-8} \text{m}^3}{5,21 \cdot 10^{-9} \text{m}^3} = 17,83$$

3.5

Mit Hilfe des „*Generate Space-Dependent Model*“ wurde eine Verlinkung der Substanzen und Reaktionen zur „*Transport of Diluted Species*“ hergestellt. Die Anfangskonzentration in der Barriere wurde für Substanz A auf Null gesetzt und die für B auf  $5000 \text{ mol/m}^3$ , damit es in der Simulation nicht verbraucht wird. Alle anderen Anfangskonzentrationswerte stammen aus den experimentellen Versuchen.

#### **Simulation des Permeation im 2OC**

Einstellung der Geometrie:

Beim 2OC wurde zunächst die CAD (*computer aided design*) Datei der Mikrofluid-Kanäle in die Simulation implementiert. Die Geometrie ist auf der Abbildung 3.4 zu sehen. Die Lücken in dem Bereich der drei Mikropumpen wurden vereinfacht mit einem Quader (2,6 mm x 0,5 mm x 0,1 mm) und einer kleinen Scheibe (Höhe: 0,1 mm; Radius: 2,5 mm) überbrückt (siehe Abbildung 3.7 a)). Die Scheibe ist bei der Flussimulation nicht in der Geometrie enthalten und wird in der Diffusionssimulation verwendet. An der Position 1 und 2 (siehe Abbildung 3.4) wurde der Füllraum über dem Kanal mit Hilfe eines Zylinders (Höhe: 3,7 mm; Radius: 9,0 mm) angenähert. An Position 1 wurde die Geometrie der 96 Well MES integriert (siehe Abbildung 3.7 b)). Die Maße für das 96 Well MES sind in der Tabelle 3.9 aufgelistet.

Vernetzung der Geometrie:

Die Vernetzung erfolgte automatisch im integrierten System in COMSOL Multiphysics. Mit der Einstellung „fein“ wurde die gesamte Geometrie mit Tetraeder-Elementen vernetzt. Auf der Abbildung 3.7 c) ist die vernetzte Geometrie zu sehen und in der Tabelle 3.13 sind die Elementargrößenparameter aufgelistet.

Tabelle 3.13: Elementargeößenparameter für das Vernetzen des 2OC Systems.

Elementargeößenparameter	Einstellung „fein“
Maximale Elementgröße	2,42 mm
Minimale Elementgröße	0,302 mm
Minimale Element-Wachstumsrate	1,45
Krümmungsfaktor	0,5
Auflösung kleiner Bereiche	0,6

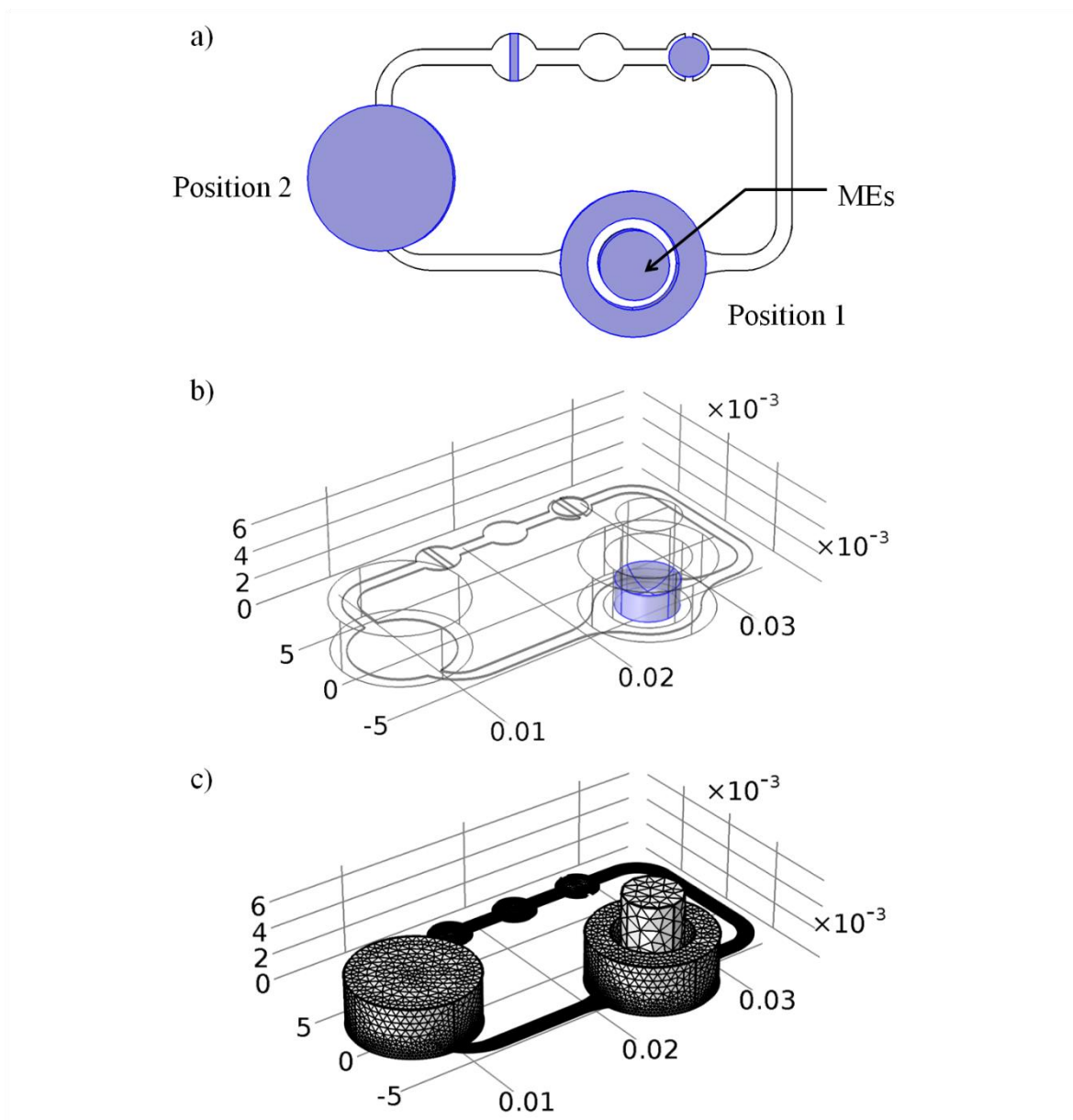


Abbildung 3.7: Geometrie der 2OC in der Simulation. a) Draufsicht der 2OC Fluidkanal mit der Position des MES (1) und Flüssigkeitzylinders (2), sowie die Überbrückung der Pumpkanäle (blau). b) Position der Barriere im 2OC Simulation (blau). c) Vernetzung der MOC Geometrie.

#### Laminare Strömung (*Laminar Flow*):

Wie bereits am Anfang der Kapitel erwähnt, wurde die Strömung im 2OC Kanal vereinfacht als laminar und konstant angenommen. Auf der Abbildung 3.8 ist die Geometrie der Strömungssimulation dargestellt. An der Position für die Mikropumpe (siehe blaues Rechteck auf Abbildung 3.8) wurde der Zufluss und Abfluss des Fluides definiert. Die Eintrittsgeschwindigkeit beträgt 15,76 mm/s. Diesem Wert entspricht die mittlere Fließgeschwindigkeit bei einer Pumpfrequenz von 0,475 Hz. Am Abfluss wurde ein Druck von 0 Pa definiert.

#### Transport verdünnter Spezies (*Transport of Diluted Species*):

Die Simulation der Diffusion erfolgte ähnlich wie im MES. Der Diffusionskoeffizient im Donator und im Akzeptor (hier ist auch der Fluidkanal mit inbegriffen) wurde auf einen Wert von  $1 \times 10^{-9}$  m<sup>2</sup>/s festgelegt. Die Diffusionskoeffizienten der Barriere stammen aus der Parameter-Optimierung in der vorangegangenen Simulation.

Als Anfangsbedingung wurde die Startkonzentration in der Barriere und Akzeptor auf Null gesetzt und die Konzentration im Donator dem jeweiligen Stoff zugeordnet (siehe Tabelle 3.11).

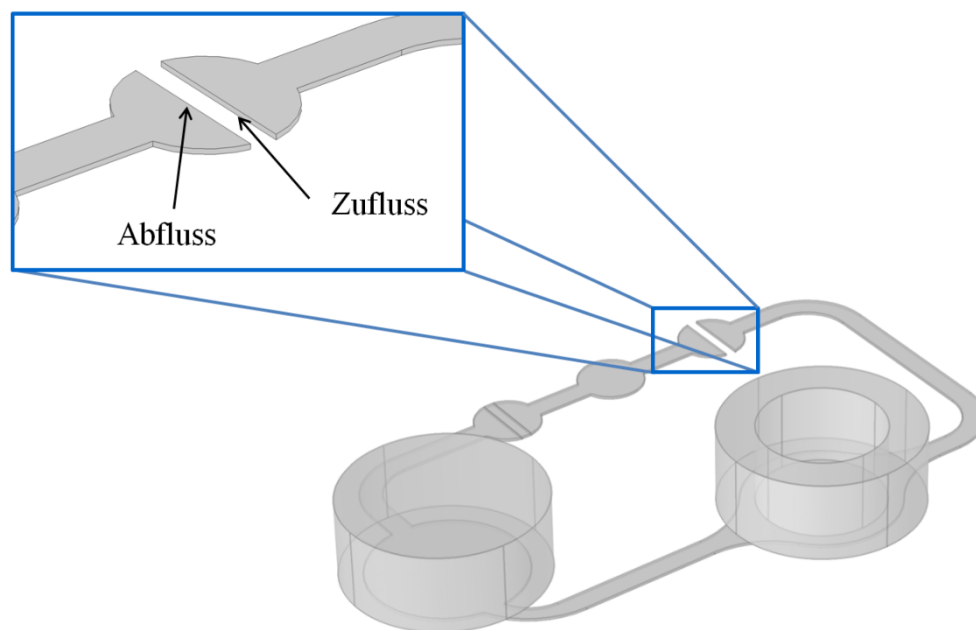


Abbildung 3.8: Geometrie für die die Strömungssimulation des 2OCs. Auf der Vergrößerung ist die Position des Zuflusses und Abflusses dargestellt.

## **4 Charakterisierung der Messmethoden zur Bestimmung der Permeation**

Für die Kultivierung von Hautmodellen ist die Luft-Flüssigkeitsgrenze ein essentielles Kriterium [37]. Hierfür wurde ein Membran-Einsatzsystem verwendet, auf dem die Modelle kultiviert wurden. Die Grundidee bei der Entwicklung der Methode bestand darin, direkt in solch einem System die Permeationsmessung durchzuführen. Hierbei können mehrere Faktoren, wie die Beschaffenheit der Membran, Größe des Systems oder inkonstante Versuchsparameter das Ergebnis beeinflussen. Diese Parameter werden in diesem Kapitel genauer untersucht. Des Weiteren wurde getestet, ob es möglich ist die Glukose- und Laktatkonzentration in einem MES zu bestimmen und ob die Permeationsmessung im 2OC reproduzierbar ist.

### **4.1 Ergebnisse der Messmethoden zur Bestimmung der Permeation**

In diesem Teil werden die Ergebnisse einzeln vorgestellt. Wie bereits beschrieben, wurden sechs verschiedene Schwerpunkte festgelegt und untersucht, die von A) bis F) (siehe Kapitel 3.3) beschriftet sind. Diese werden in chronologischer Reihenfolge beschrieben.

#### **A) Einfluss verschieden großer MES auf die Permeation**

Die MES von Corning gibt es in verschiedenen Größen. Für das 2OC wurde nur der 96 Well MES verwendet, da das System für solche kleinen Einsätze konzipiert wurde. Jedoch können verschieden große MES die Permeationseigenschaften beeinflussen, was hier genauer betrachtet werden soll. Hierfür wurde das 96 Well MES (Durchmesser von 4,26 mm) mit den 12 Well MES (Durchmesser von 12 mm) verglichen. Aus den ersten Permeationsversuchen wurde zunächst der Verlauf der Akzeptorkonzentration aus den beiden Systemen aufgezeichnet (siehe Abbildung 4.1). Wie erwartet, ähnelt der Verlauf einer Diffusionskurve nach Fick'schem Gesetz. Die Steigung der Kurve beginnt zunächst flach und nimmt über die Zeit zu. Gegen Ende der Messung ist eine Abflachung der Kurve zu sehen. Auffällig ist, dass eine Differenz zwischen dem Permeationsversuch im 12 und 96 Well MES existiert. Hier ist gut zu erkennen, dass der Kurvenverlauf bei dem 96 Well MES flacher verläuft als beim 12 MES.

#### 4. Charakterisierung der Messmethoden zur Bestimmung der Permeation

Um diesen Sachverhalt genauer zu analysieren, wurden weitere Versuche durchgeführt. Bei dem 12 Well MES wurden vier Versuche mit jeweils drei Proben und beim 96 Well MES wurden drei Versuche mit jeweils 8 Proben verwendet (siehe Tabelle 4.1). Die aus diesem Versuch ermittelten Permeationskoeffizienten liegen bei einem Wert von  $11,59 \pm 0,19 \times 10^{-8} \text{ m/s}$  für 12 MES und  $6,23 \pm 0,70 \times 10^{-8} \text{ m/s}$  für das 96 MES. Hieraus resultiert ein methodischer Fehler von 1,6 % für 12 MES und 11,2 % für MES. Da keine Homogenität der Varianzen gegeben ist, wurde ein t-Test zur Bestimmung der Signifikanz durchgeführt. Es existiert ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Systemen mit einem P-Wert von 0,001. Aus diesem Resultat ist zu erkennen, dass die Substanzen im System mit kleinerem Durchmesser langsamer permeieren als im größeren System. Somit lässt sich schlussfolgern, dass die Größe bzw. die Fläche des MES einen Einfluss auf die Permeationseigenschaft besitzt.

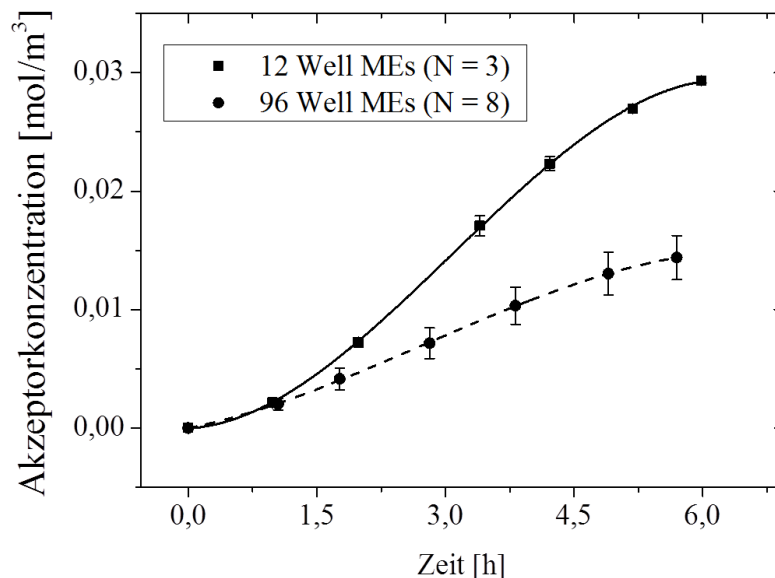


Abbildung 4.1: Vergleich von Permeationsversuchen in verschiedenen großen MES. Es wurden 12 und 96 Well MES verwendet, wobei die Permeation von FN 2 % Agarosegel untersucht wurde. Im Diagramm ist die Akzeptorkonzentration über der Zeit aufgetragen. Die Kurve vom 96 Well MES verläuft flacher im Vergleich zum 12 Well MES.

Tabelle 4.1: Permeationskoeffizient von FN durch 2 % Agarosegel in einem 12- und 96 Well MES.

Permeat	MES	Permeationskoeffizient [ $\times 10^{-8} \text{ m/s}$ ]	STABW [ $\times 10^{-8} \text{ m/s}$ ]	Anzahl der Proben [N]
Na.Fl	12	11,59	0,19	4x3
Na.Fl	96	6,23	0,70	3x8

### **B) Einfluss der Membran auf die Permeation**

Neben den Größenunterschieden bei den MES existieren auch noch verschiedene Membranen und Porengrößen. Der Einfluss dieser Faktoren wurde in diesem Teil genauer untersucht. Zur Verfügung standen 12 Well MES mit Membranen bestehend aus PC und PE, mit jeweils eine Porengröße von 0,3 und 0,4  $\mu\text{m}$ . Das Ergebnis aus diesem Versuch ist in der Tabelle 4.1 zusammengefasst. Zu sehen sind die verwendeten Membranen mit der jeweiligen Porengröße, der gemessene Peremationskoeffizient und die zugehörige Standardabweichung. Der Permeationskoeffizient lag für PC 0,4 bei einem Wert von  $8,03 \times 10^{-8}$  m/s, für PC 0,3 bei  $8,10 \times 10^{-8}$  m/s, für PE 0,4 bei  $5,94 \times 10^{-8}$  m/s und für PE 0,3 bei  $8,59 \times 10^{-8}$  m/s. Die Standardabweichung bewegte sich in einem Bereich von  $0,37 \times 10^{-8}$  bis  $0,54 \times 10^{-8}$  m/s. Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen mit Post-Hoc-Test (Tukey) ergab, dass PC 0,4, PC 0,3 und PE 0,3 sich nicht signifikant voneinander unterscheiden, da der P-Wert kleiner als 0,001 beträgt. Die Permeationskonstante von PE 0,4 ist signifikant kleiner im Vergleich zu den drei anderen Membranen mit einem P-Wert von 1,95 – 0,995. Somit scheinen die Permeationskoeffizienten sich bei den Membranen PC 0,4, PC 0,3 und PE 0,3 nicht zu unterscheiden, obwohl die Porengröße variiert. Für die weiteren Untersuchungen wurde die PC 0,4 Membran verwendet.

Tabelle 4.2: Permeationskoeffizient von FN durch 2 % Agarosegel in einem 96 MES mit unterschiedlichen Membranen. (N=6)

Membran	Permeationskoeffizient [ $\times 10^{-8}$ m/s]	STABW [ $\times 10^{-8}$ m/s]
PC 0,4 $\mu\text{m}$	8,03	0,52
PC 3,0 $\mu\text{m}$	8,10	0,39
PE 0,4 $\mu\text{m}$	5,94	0,54
PE 3,0 $\mu\text{m}$	8,59	0,37

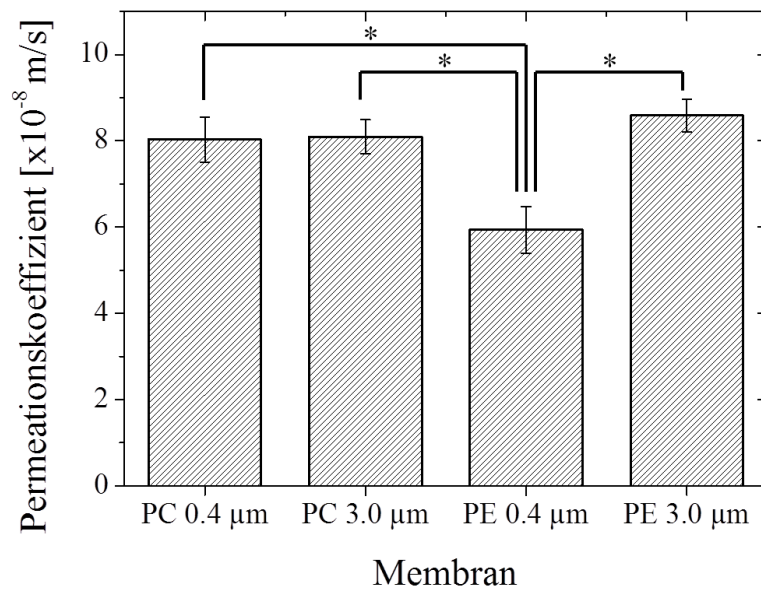


Abbildung 4.2: Permeationskoeffizient bei verschiedenen Membranen für MES. Darstellung der Permeationsversuche im Balkendiagramm, mit FN durch 2 % Agarosegel in einem 96 Well MES mit verschiedenem Membranmaterial (PC und PE) und Porengröße (0,4 und 3,0  $\mu\text{m}$ ).

### C) Einfluss verschiedener Partikelgrößen auf die Permeation

Die Partikelgröße der Substanz beeinflusst die Permeation. In Untersuchungen wurde bereits festgestellt, dass größere Partikel die Permeationsgeschwindigkeit reduziert [57]. Die Stokes-Einstein Gleichung beschreibt, dass sich der Radius der Partikelteilchen umgekehrt proportional zur Diffusionsgeschwindigkeit verhält. Es soll hier untersucht werden, ob dieser Sachverhalt auch in dem kleinen 96 Well MES messbar ist.

Das Resultat des Versuches ist in Tabelle 4.3 dargestellt. In dieser Tabelle sind die Substanz bzw. das Permeat, der dazugehörige Stokesradius, der Permeationskoeffizient, und die Standardabweichung aufgelistet. Der Stokesradius beschreibt eine hypothetische Kugel für die Substanz, welches dieselbe Diffusionseigenschaft besitzt wie ein Teilchen mit genau demselben Radius. Die verwendeten Substanzen besitzen einen Stokesradius in einem Bereich von  $5 - 45 \times 10^{-10}$  m. Der Permeationskoeffizient nimmt mit der Zunahme des Stokesradius ab. Bei der Substanz FN mit dem kleinsten Stokesradius beträgt der Permeationskoeffizient  $4,79 \times 10^{-8}$  m/s und steigt auf einen Wert von  $0,27 \times 10^{-8}$  m/s bei FD40.000 an, welches das größte Molekül darstellt. Die Standardabweichungen bewegen sich in einem Bereich von  $0,08 \times 10^{-8}$  m/s bis  $0,47 \times 10^{-8}$  m/s. Beim Auftragen der

#### 4. Charakterisierung der Messmethoden zur Bestimmung der Permeation

Permeationskoeffizienten über die Inverse des Stokesradius (siehe Abbildung 4.3 lineare Regression über die ersten vier Punkte) ist eine nahezu lineare Abhängigkeit zu erkennen.

Tabelle 4.3: Permeationskoeffizient der Substanzen mit verschiedenen molekularen Stokes Radien. Der Versuch erfolgte in einem 96er MES durch 2 % Agarosegel. (N=7)

Permeat	Permeationskoeffizient [ $\times 10^{-8}$ m/s]	STABW [ $\times 10^{-8}$ m/s]	Stokesradius des Permeats [ $\times 10^{-10}$ m]
FN	4,79	0,20	5
FD4.000	2,37	0,31	14
FD10.000	1,67	0,47	23
FD20.000	0,65	0,30	33
FD40.000	0,27	0,08	45

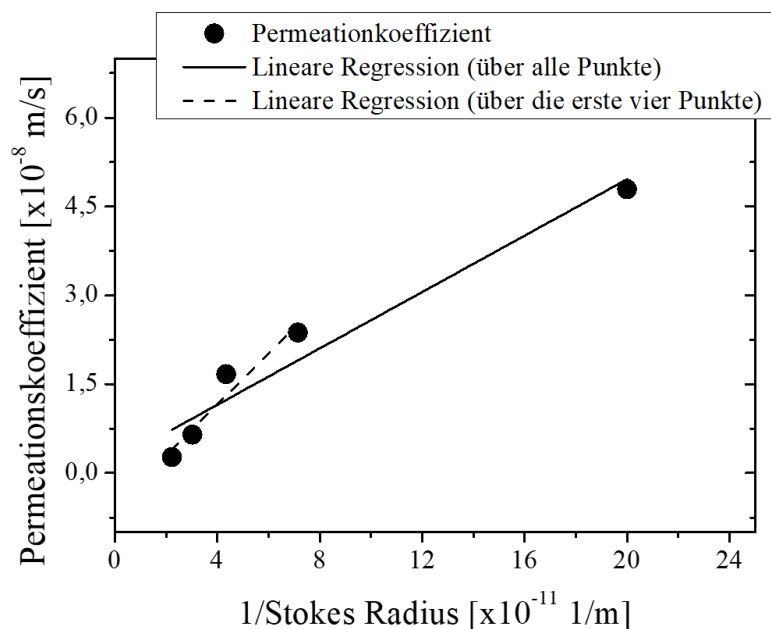


Abbildung 4.3: Die experimentell ermittelten Permeationskoeffizienten als Funktion über dem 1/Stokes Radius aufgetragen. Es wurde ein Permeationsversuch mit 96 Well MES durchgeführt. Als Barriere wurde 2 % Agarosegel und als Permeat wurde FN und FICT-Dextran (4,000 – 40,000 mol wt.) verwendet.

Das Bestimmtheitsmaß beträgt hier 92,5 %. Der vierte Punkt mit der Substanz FD40.000 scheint etwas abzuweichen (siehe Abbildung 4.3 lineare Regression über alle Punkte). Bei der linearen Regression über alle Punkte sinkt das Bestimmtheitsmaß ab auf einen Wert von 90,5 %.

##### D) Einfluss von Fibroblasten und Keratinozyten auf die Permeation

Die Entwicklung dieser Methode zur Bestimmung der Permeation ist für die Anwendung an Hautmodellen bestimmt. Ein voll ausgereiftes Hautmodell bildet eine Barriere aus Hornhautschichten, welche die Permeationseigenschaften beeinflussen. Dieser Zusammenhang soll hier in einen vereinfachten Zellmodell untersucht werden. Als Barriere wurden für die Permeationsversuche verschiedene Zellmodelle, bestehend aus Keratinozyten und Fibroblasten, verwendet. Es soll hier untersucht werden, in wie fern diese Zellen in unterschiedlichen Konstellationen und Konzentrationen die Permeation beeinflussen. In Abbildung 4.4 ist beispielhaft die HE Färbung eines Zellmodells bestehend aus Kol. + H. + F. (Kol.=Kollagen, H.=HaCaT, F.=Fibroblasten) zu sehen. Es lassen sich grob zwei Schichten voneinander unterscheiden, nämlich die Kollagen- und die HaCaT-Schicht. Die Kollagenstruktur des Zellmodells ist leicht rosa angefärbt. Darin sind Fibroblasten erkennbar, die dunkler gefärbt sind. Die Zellkerne der Fibroblasten weisen eine nahezu lila Färbung auf. Auf der Kollagenmatrix ist eine Schicht von mehreren Zellkernen in lila zu erkennen. Diese stellt die HaCaT dar. Es ist zu erkennen, dass diese Zellen eine abgeschlossene Schicht auf dem Model bilden.

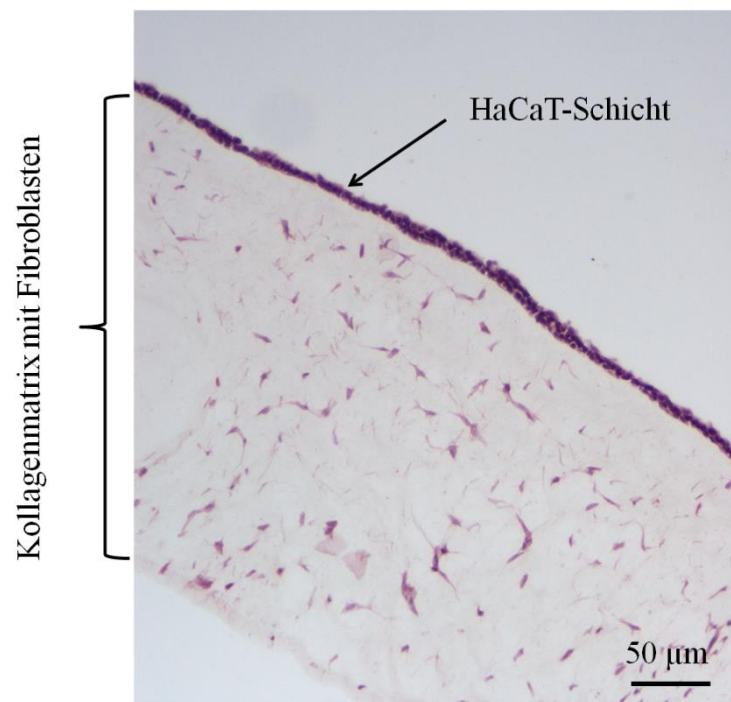


Abbildung 4.4: Repräsentative HE Färbung des Zellmodells bestehend aus Kol. + H. + F. Im Kollagenmatrix sind Fibroblasten (lila) lokalisiert. Direkt über der Kollagenschicht ist HaCaT zu erkennen. Dieses bildet die äußerste Schicht des Zellmodells.

#### 4. Charakterisierung der Messmethoden zur Bestimmung der Permeation

---

Das Ergebnis des Permeationsversuchs zu den verschiedenen Zellmodellkonstellationen ist in Tabelle 4.4 dargestellt. Aufgelistet sind die Permeationskoeffizienten und die Standardabweichungen. Es wurden zwei Versuche mit jeweils 3 Proben durchgeführt. Die Permeation von FN erfolgt am schnellsten durch das Modell Kol. mit einem Permeationskoeffizient von  $2,18 \times 10^{-8}$  m/s. Der Permeationskoeffizient sinkt bei dem Modell Kol.+F. auf einen Wert von  $1,85 \times 10^{-8}$  und bei den Modellen Kol.+H. und Kol.+F.+H. beträgt der Wert  $1,67 \times 10^{-8}$  m/s. Die Standardabweichung liegt in diesem Versuch zwischen  $0,23 \times 10^{-8}$  m/s und  $0,35 \times 10^{-8}$  m/s. Der Fehler bewegt sich hier im Bereich von 10,6 % bis 21,0 %. Bei der statistischen Auswertung ist nur ein signifikanter Unterschied zwischen dem Modell mit Kol. und Kol.+F.+H. mit einem P-Wert von 0,022 (Post-Hoc, Tamhane) zu erkennen. Alle anderen Modelle unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (P-Wert von 0,097 – 1 (Post-Hoc, Tamhane)). In Abbildung 4.6 ist der Zusammenhang der Permeationskoeffizienten als Balkendiagramm visualisiert. Es ist eine Tendenz zu erkennen, dass die Versuche mit HaCaT einen geringeren Permeationskoeffizienten aufweisen im Vergleich zu den Modellen ohne HaCaT. Aus dieser Messung ist ersichtlich, dass die Methode zur Bestimmung der Permeation auch für kultivierte Hautmodelle angewendet werden kann.

Tabelle 4.4: Permeationskoeffizienten aus dem Versuch mit FN durch Zellmodelle in einem 12 MES. (Kol- = Kollagen, F. = Fibroblasten, H. = HaCaT) (N = 2x3).

Zellmodelle	Permeationskoeffizient [ $\times 10^{-8}$ m/s]	STABW [ $\times 10^{-8}$ m/s]
Kol.	2,18	0,23
Kol. + F.	1,85	0,38
Kol. + H.	1,67	0,35
Kol. + F. + H.	1,67	0,23

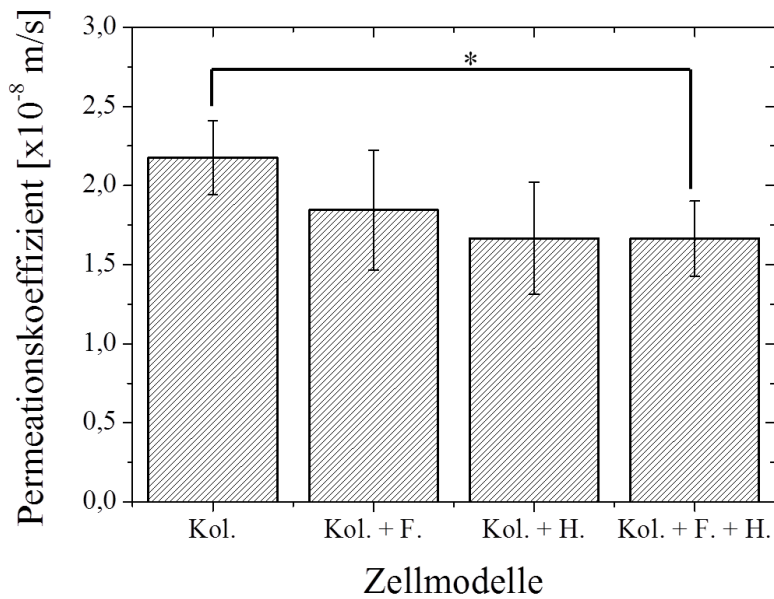


Abbildung 4.5: Permeationskoeffizienten zu den verschiedenen Zellmodellen als Balkendiagramm dargestellt. In den Versuchen wurde die Permeation von FN durch verschiedene Zellmodelle in einem 12 Well MES (Kol. = Kollagen, F. = Fibroblasten, H. = HaCaT) bestimmt.

In einem weiteren Permeationsversuch wurde die Konzentration der Fibroblasten verändert. Hierfür wurde das kleine MES System (96 Well) verwendet. Der daraus resultierende Permeationskoeffizient liegt in einem Bereich zwischen  $5,64 \times 10^{-8}$  bis  $5,91 \times 10^{-8}$  m/s (siehe Tabelle 4.5), die Standardabweichung zwischen  $0,15 \times 10^{-8}$  und  $0,27 \times 10^{-8}$  m/s. Daraus resultiert ein prozentualer Fehler zwischen 2,5 % bis 4,7 %. Bei der Darstellung als Balkendiagramm ist kaum ein Unterschied zwischen den Proben zu erkennen (siehe Abbildung 4.6), welches durch die Statistik bestätigt wird. Beim ANOVA-Vergleich der Proben zueinander ergab sich ein P-Wert von 0,294, somit existiert kein signifikanter Unterschied. Die Fibroblastenkonzentration im Gel beeinflusst nicht die Permeationseigenschaften des Modells.

Tabelle 4.5: Permeationskoeffizient aus dem Versuch mit FN durch Kol. + F. + H. Model mit verschiedener Fibroblastendichte in einem 96 Well MES.

Dichte [Zellen im Gel] $\times 10^5$	Permeationskoeffizient [ $\times 10^{-8}$ m/s]	STABW [ $\times 10^{-8}$ m/s]	Anzahl der Proben [N]
1	5,91	0,15	1x3
0,5	5,64	0,26	1x3
0,23	5,90	0,16	2x3
0,11	5,73	0,27	2x3

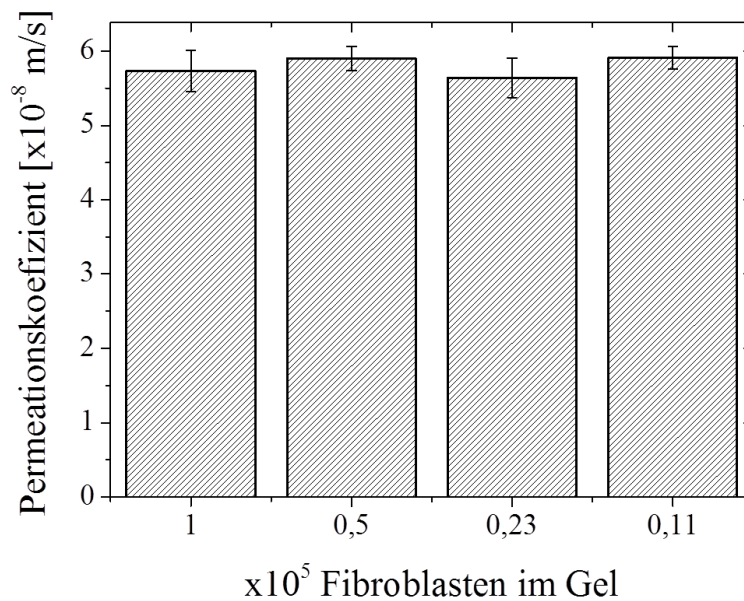


Abbildung 4.6: Peremationskoeffizienten zu verschiedenen Fibroblastenmengen im Gel als Balkendiagramm. Im Versuch wurden die Permeationskoeffizienten von FN durch ein Zellmodell mit unterschiedlicher Fibroblastendichte in einem 96 Well MES bestimmt.

#### E) Bestimmung der Permeation im 2OC

In diesen Versuch wurde, der von der Firma TissUse entwickelte 2OC verwendet. Es sollte untersucht werden, ob die Permeation auch über einen 96 Well MES in einem 2OC System bestimmt werden kann. Das Ergebnis ist in der Abbildung 4.7 zu sehen, hierbei wurde die gemessene Konzentration im Akzeptor über die Zeit aufgetragen. Es wurden insgesamt Versuche in sieben verschiedenen 2OCs durchgeführt. Auf dem Diagramm ist bei allen Konzentrationsverläufen zu erkennen, dass diese eine verzögerten Anstieg aufweisen und anschließend linear verlaufen. Bei einigen Kurven ist auch am Ende ein leichtes Abflachen zu erkennen. Das Ergebnis ähnelt dem des Permeationsversuchs im 96 Well MES (siehe Abbildung 4.1). Die Tatsache, dass sich die Resultate in MES und im 2OC ähneln und diese auch eine Diffusionskurve nach Ficks Definition zeigen, belegt, dass diese Methode zur Bestimmung der Permeation im 2OC geeignet ist. Auffällig ist, dass zwischen den Versuchen eine recht hohe Streuung existiert, welche anhand der errechneten Permeationskoeffizienten ersichtlich wird. Der Wert schwankt zwischen  $2,63 \times 10^{-8}$  m/s und  $8,22 \times 10^{-8}$  m/s, der Mittelwert liegt bei  $4,52 \times 10^{-8}$  m/s mit einer Standardabweichung von  $\pm 1,98 \times 10^{-8}$  m/s. Die Beschaffenheit der Fluidkanal im 2OC und leichte Volumenänderung des Agarosegels kann Gründe für die Abweichung sein. Diese wird später ausführliche

diskutiert. Letztendlich kann gezeigt werden, dass die Permeation in einem 2OC bestimmt werden kann.

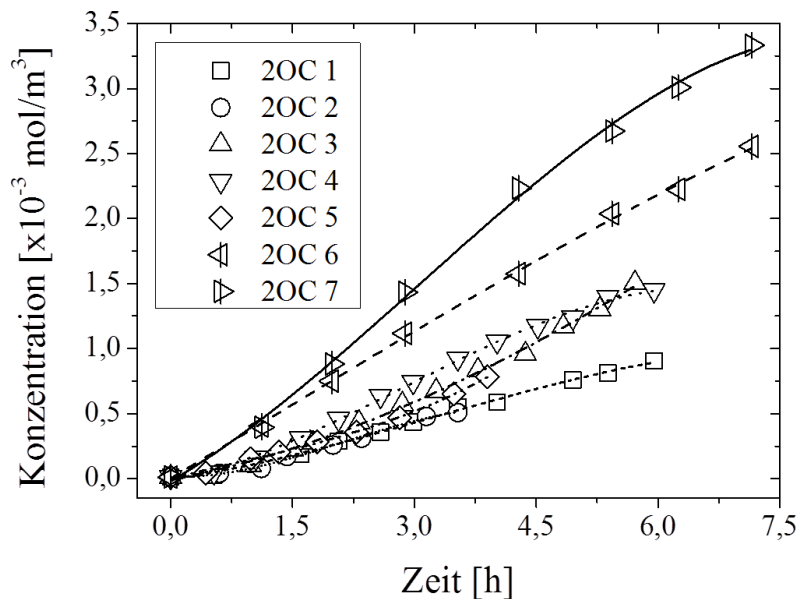


Abbildung 4.7: Permeationsversuch in 2OC. Es wurde die Peremation von FN 2 % Agarsoegel in sieben 2OC Kreisläufen.

#### F) Bestimmung der Glukose und Laktatkonzentration im MES

Der Glukoseverbrauch und die Laktatproduktion von Hautmodellen sind nützliche Informationen für die Abschätzung der erforderlichen Medium Menge, bzw. wann das Medium gewechselt werden soll. Auch könnten diese Parameter vielleicht eine Aussage zum Entwicklungszustand der Hautmodelle geben. In diesem Versuch soll untersucht werden, ob es überhaupt möglich ist, den Glukoseverbrauch und die Laktatproduktion in einem kleinen 96 Well MES zu messen. In Abbildung 4.8 ist exemplarisch ein Ergebnis aus diesem Versuch zu sehen. Es wurde der zeitliche Verlauf der Glukose- und Laktatkonzentration im Medium bei dem Zellmodell (nach 3-wöchiger Kultur) mit Rattenschwanzkollagen aufgetragen. Hierbei wurden Messungen mit einer Dauer bis 12 Stunden oder 71 Stunden durchgeführt. Diese werden im Folgenden als „kurze Messung“ und „lange Messung“ bezeichnet. Die Glukosekonzentration nimmt über die Zeit stetig ab und die Laktatkonzentration nimmt über die Zeit stetig zu. Auffällig sind einige Ausreißer in der Messung. Diese wurden für die Bestimmung der Verbrauchs- und Produktionsraten mit einbezogen. Es wurde eine lineare Regression durch die Daten gelegt, um Glukoseverbrauch und Laktatproduktion zu bestimmen. Die Werte liegen bei 0,024 g/l h für die kurze Messung und 0,023 g/l h für die lange Messung (siehe Tabelle 4.6).

#### 4. Charakterisierung der Messmethoden zur Bestimmung der Permeation

Bei den Matriderm™ Modellen existiert ein größerer Unterschied zwischen der kurzen Messung mit einem Verbrauch von 0,089 g/l h und der langen Messung mit 0,033 g/l h. Zu erkennen ist, dass Abweichungen bei dem Glukoseverbrauch zwischen den zwei Zellmodellen sowie auch bei dem kurzen und langen Versuch existieren. Bei dem Zellmodell mit Rattenschwanzkollagen ist kaum ein Unterschied bei dem Glukoseverbrauch zu sehen. Die Laktatproduktion bei diesem Modell liegt bei 0,048 g/l h für die kurze und 0,027 g/l h für die lange Messung. Bei den Zellmodellen mit Matridem™ liegt der Wert bei 0,056 g/l h für die kurze und 0,023 g/l h für die lange Messung. Auch sind in der Laktatproduktion größere Unterschiede zu sehen. Da in diesem Versuch nur ein Messpunkt existiert (N = 1), war keine statistische Auswertung möglich.

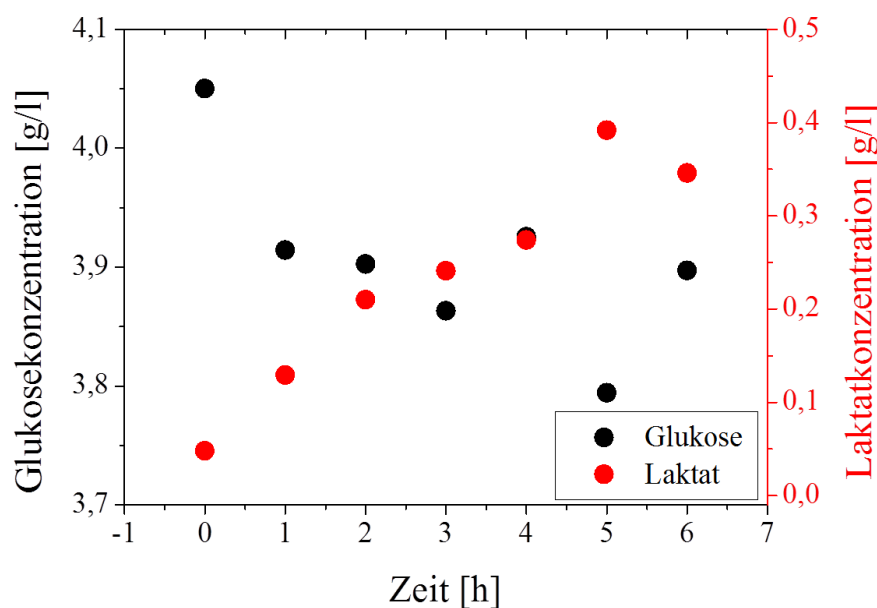


Abbildung 4.8: Glukose- und Laktatkonzentration bei der Kultur eines Zellmodells bestehend aus Kollagenegel, HaCaT und Fibroblasten. Die Versuchsdauer der kurzen Messung betrug 6 Stunden.

Tabelle 4.6: Glukoseverbrauch und Laktatproduktion von Zellmodellen bestehend aus Rattenschwanzkollagen und Matridem™. Die kurze Messung dauerte 6 bis 12 Stunden und die lange Messung dauert bis 71 Stunden. (Kol.=Rattenschwanzkollagen, H.=HaCaT, F.=Fibroblasten)

Modellzusammensetzung	Glukoseverbrauch [g/l·h]	
	(kurze Messung)	(lange Messung)
Kol. + H. + F.	0,024	0,023
Matriderm™ + H. + F.	0,089	0,033
Modellzusammensetzung	Laktatproduktion [g/l·h]	
	(kurze Messung)	(lange Messung)
Kol. + H. + F.	0,048	0,027
Matriderm™ + H. + F.	0,056	0,023

In Abbildung 4.9 ist exemplarisch die HE Färbung der Modelle aus Matriderm™ und Rattenschwanzkollagen zu sehen. In beiden Abbildungen ist eine sandwichähnliche Struktur zu erkennen, in deren Mitte grüulich das Kollagen lokalisiert ist. Am Rand sind oben und unten in rot bis lila Zellschichten sichtbar. Das aus Matriderm™-Matrix bestehende Modell weist optisch eine tiefere und dichtere Zellschicht am Rand auf (siehe Abbildung 4.9 a)) im Vergleich zum Rattenschwanzkollagen (siehe Abbildung 4.9 b)). In beiden Modellen ist auffällig, dass die Zellen am unteren Rand lokalisiert sind. Die Zellen scheinen um die Kollagenmatrix proliferiert zu sein. Beim Vergleich der Kollagenstruktur fällt auf, dass die Struktur vom Rattenschwanzkollagen feiner und homogener wirkt. Die Trennung zwischen oberer bzw. unterer Zellschicht und Matrix ist schärfer als bei Modell mit Matriderm™. Letztendlich kann zusammengefasst werden, dass es möglich ist, die Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsrate in einem 96 Well MES zu bestimmen. Allerdings ist das Volumen relativ gering und somit wurden die Proben mehrerer Modelle zusammenpipettiert. Aus diesem Grund war eine statistische Auswertung nicht durchführbar.

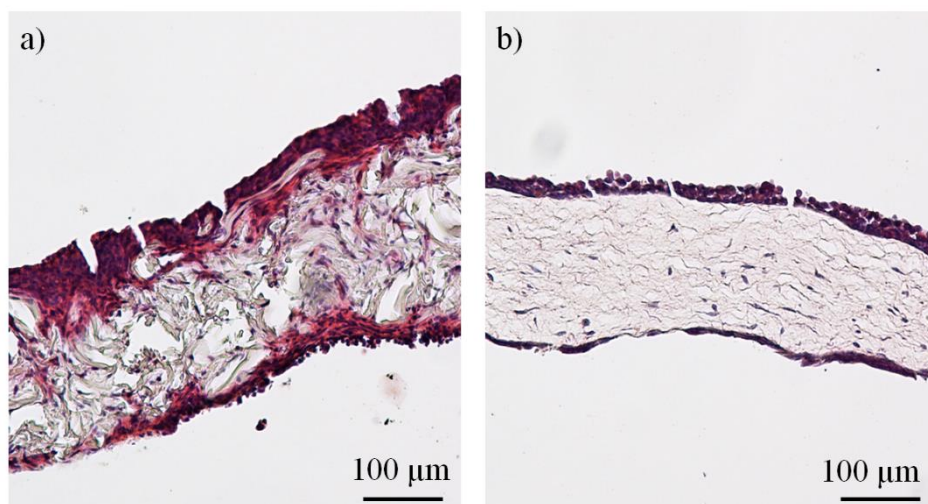


Abbildung 4.9: HE Färbung der Zellmodelle. Es sind exemplarisch Zellmodelle bestehend aus HaCaT, Fibroblasten und einer Matrix dargestellt. Die Fibroblasten sind in der Matrix eingebettet und die HaCaTs wurden auf das Modell appliziert. Es wurden zwei verschiedene Matrizen verwendet: a) Matriderm und b) Rattenschwanzkollagen als Matrix.

## 4.2 Diskussion der methodischen Entwicklung

Die Methode, zur Messung der Permeation in einem 96 Well MES wurde entwickelt, da bislang keine geeignete Methode für die in solchen kleinen Gefäßen kultivierten Hautmodelle zur Verfügung stand. Des Weiteren wurde die Methode für das 20C System

#### 4. Charakterisierung der Messmethoden zur Bestimmung der Permeation

---

benötigt, welches so konzipiert wurde, dass 3D Modelle auf ein MES direkt eingesetzt werden können. Bei der Methodenentwicklung wurden Faktoren wie Temperatur, Verdunstung und Konzentrationsgradient berücksichtigt. Eine konstante Temperatur kann mit Hilfe eines Wärme- bzw. Brutschranks geschaffen werden. Die Verdunstung kann mit einem Wasserreservoir reduziert werden. In der ersten Untersuchung wurde festgestellt, dass die Größe des MES einen erheblichen Einfluss auf die Permeationskoeffizienten besitzt. Die Permeationsgeschwindigkeit ist im kleineren 96 MES langsamer als im größeren 12 MES. Eine mögliche Ursache hierfür könnte der Konzentrationsgradient direkt unter der Membran im Akzeptor sein. Die Substanz diffundiert durch die Gel- und Membranfläche und verteilt sich seitlich im Akzeptor. Da sich die Fläche-zu-Volumenverhältnisse der 96 und 12 MES unterscheiden, ist der Konzentrationsgradient auch verschieden. Dieser Effekt beeinflusst die Permeation. Der Spalt zwischen Membran und Boden misst nur knapp 1 mm, wodurch eine gute Vermischung nicht gewährleistet ist. Diese Problematik wird in der Simulation noch genauer untersucht.

Die Reproduzierbarkeit spielt eine große Rolle in der Versuchsdurchführung. Bei den Wiederholungen der Versuche wurde festgestellt, dass die Ergebnisse eine Abweichung von bis zu  $\pm 41,3\%$  aufweisen (Abweichung von höchstem zu niedrigstem Permeationskoeffizienten bei gleicher Messkonstellation). Dabei handelt es sich überwiegend um systematische Fehler. Wie bereit gezeigt, liegt der methodische Fehler hier niedriger (1,6 % bis 11,2 %). Mögliche Gründe für den systematischen Fehler können leichte Konzentrationsänderungen im System durch Pipettierfehler und im Ansetzen von Lösungen und Gelen sein. Auch können kleine Abweichungen bei den kleinen Volumina, mit welchen gearbeitet wurde, große Abweichungen im Ergebnis hervorrufen. Es ist jedoch aus einer Zusammenstellung in der Literatur auch bekannt, dass Permeationsuntersuchungen eine recht hohe Variation besitzen, diese können von 15 % bis 45,5 % [59] reichen. Vor diesem Hintergrund liegt die Abweichung dieser Methode im Rahmen. Eine Möglichkeit die Abweichung zu reduzieren, ist es, eine einzige Stocklösung für die Permeationsversuche zu verwenden. In einer weiteren Untersuchung gegen Ende der Arbeit wurde festgestellt, dass der systematische Fehler dann auf 12,9 % reduziert werden kann (siehe Tabelle 4.7).

Tabelle 4.7: Variationskoeffizient der Permeationsversuche mit FN durch 2 % Agarosegel in einem 96 Well MES.

	Variationskoeffi- zient [%]	Anzahl der Versuche [N]
Verschiedene Stocklösungen	28,8	3 x 6 – 8
Eine Stocklösung	12,9	3 x 8

#### 4. Charakterisierung der Messmethoden zur Bestimmung der Permeation

---

Weiter wurde untersucht, ob verschiedene Materialien und Porengrößen der Membran einen Einfluss auf die Permeationseigenschaften besitzen. Bis auf PE mit der Porengröße 0,4  $\mu\text{m}$  scheinen die anderen untersuchten Membranen (PC 0,4, PC 0,3 und PE 3,0) ähnliche Permeationseigenschaften aufzuweisen. Bei Hinzunahme der Herstellerdaten (siehe Tabelle 4.8) ist zu sehen, dass die Membranen mit der Porengröße 3,0  $\mu\text{m}$  dieselbe Porendichte aufweisen. Somit lässt sich auch erklären, dass die Permeation nahezu gleich ist. Es ist zu vermuten, dass das Material kein Einfluss auf die Penetration von FN. besitzt. Bei den Membranen mit der Porengröße 0,4  $\mu\text{m}$  ist die Porendichte bei Polykarbonat höher als bei Polyester, dadurch ist die Permeation bei Polyester demzufolge auch geringer.

Tabelle 4.8: Porendichte für Transwells<sup>®</sup> aus Polykarbonat- und Polyestermembranen (Quelle: Hersteller Datenblatt)

Porengröße [mm]	Porendichte [Pore/cm <sup>2</sup> ]	
	Polykarbonat (PC)	Polyester (PE)
0,4	$1 \times 10^8$	$4 \times 10^6$
3,0	$2 \times 10^6$	$2 \times 10^6$

Dass die Molekulargröße der Substanz die Permeationsgeschwindigkeit beeinflusst ist logisch und wurde schon aus anderen Versuchen bestätigt [57,75]. Die Relation zwischen Permeationskoeffizient und Stokes Radius kann mit der Navier-Stokes-Gleichung beschrieben werden. Es existiert hier ein linearer Zusammenhang. Dieser lineare Zusammenhang war auch in den Ergebnissen zu erkennen (siehe Abbildung 4.3 lineare Regression über die ersten vier Punkte). Die Ausnahme bildet die Substanz FD40.000. Hier nimmt die Permeationskonstante nicht linear mit der Molekulargröße zu. Sie scheint leicht abzuflachen (siehe Abbildung 4.3 lineare Regression über alle Punkte). Gründe dafür können darin bestehen, dass große Molekül teilweise die Poren in der Membran verstopfen und somit die Permeationsgeschwindigkeit [91] sinkt. Nichtsdestotrotz zeigen die Ergebnisse den erwarteten Sachverhalt, was für die Durchführbarkeit der Methode spricht.

In Hinblick auf die Anwendung dieser Messmethode zur Bestimmung der Permeation auf Hautmodelle wurden hier Untersuchungen mit Zellmodellen bestehend aus Fibroblasten und Keratinozyten verwendet. Im Normalfall wird bei der Generierung von Hautmodellen eine Differenzierung der Keratinozyten begünstigt. Dadurch entsteht eine Hornschicht, welche die Oberfläche des Hautmodells abdeckt [37]. Diese Schicht ist eine interzelluläre Barriere gegenüber eindringenden Stoffen. Hierbei wird die Permeation von Substanzen reduziert. Bei dem Versuch mit verschiedenen Zellmodellen sollte neben der Anwendung für zellenbesiedelte Modelle auch getestet werden, ob die Methode sensitiv genug ist,

verschiedene Zellkonzentrationen und Zellschichten zu unterscheiden. Die Permeationsmessung kann verschiedene Fibroblastendichten in der Kollagenmatrix mit FN nicht auflösen. Eine Hauptaufgabe der Fibroblasten ist die Bildung der Interzellulärematrix [22,21]. Diese Matrix und die Fibroblasten selbst scheinen keine Barriere für die Substanz FN zu sein. Bei den Versuchen mit HaCaT-Zellen ist zu sehen, dass der Permeationskoeffizient tendenziell abnimmt. Die Ursache hierfür liegt darin, dass die Keratinozyten eine abgeschlossene, mehrschichtige Barriere bilden können [39,38]. Diese Barriere erschwert das Eindringen der Substanz in das Zellmodell und reduziert somit die Permeationsgeschwindigkeit. Es ist zusätzlich positiv aufgefallen, dass der Fehler bei den Untersuchungen mit Zellmodellen in Rahmen der methodischen Fehler liegt. Das spricht für gute, gleichmäßig erzeugte Zellmodelle.

Im direkten Vergleich zu der herkömmlich verwendeten Franzzelle bietet diese Methode, Permeation über einen MES zu bestimmen, einige Vor- und auch Nachteile. Ein Vorteil dieser Methode ist der kompakte Aufbau in kleinen Volumina. Dieser ermöglicht eine höhere Anzahl an Experimenten. Es können mehrere Proben gleichzeitig untersucht werden, wohingegen bei der Franzzelle für jede Probe ein Gerät benötigt wird. Des Weiteren ist die Handhabung mit den MES einfacher. Die Proben werden direkt auf der Membran erzeugt bzw. kultiviert und müssen nicht aus dem Kulturgefäß genommen und auf die Franzzelle aufgebracht werden. Aufgrund der Größe und einfacheren Handhabung in einem MES resultiert eine Zeit und Kostenersparnis. Der Nachteil bei der Permeationsmessung in MES System besteht wiederum darin, dass die Proben nicht eingespannt werden können, diese werden direkt auf der Membran gemessen. Somit müssen die Proben die Membranfläche abdecken, damit die zu untersuchende Flüssigkeit nicht seitlich an der Probe vorbeifließt. Ein anderer Faktor, den man bei dieser Methode beachten muss, ist, dass die Permeation über eine Probe und Membran gemessen wird. Die Membran hat somit einen Einfluss auf das Permeationsverhalten und das muss berücksichtigt werden.

Die Permeation durch Hautmodelle in einem Flusssystem wurde von anderen Forschungsgruppen in der Vergangenheit bereits untersucht [92,93]. Dabei befand sich das Hautmodell auf einer Membran in einem perfundierten System. Es wurde eine Substanz auf das Modell appliziert und Proben in der Perfusion entnommen, um die Permeation zu bestimmen.

Das in dieser Arbeit verwendete 2OC System ermöglicht das Kultivieren von mehreren Organen auf einem Chip. Da die Zellkultur-Kompartimente speziell für die MES konzipiert wurden [46,12,52,50], kann die Permeationsmessung in MES direkt auf das 2OC System übertragen werden. Aus dem Permeationsversuch im 2OC ist ersichtlich, dass die experimentellen Werte eine große Streuung aufweisen, wobei die Verläufe eine typische Diffusionskurve beschreiben. Ein möglicher Grund hierfür liegt an der Heterogenität der einzelnen 2OCs. Durch die teilweisen per Hand angefertigten Komponenten ist immer eine

kleine Variation des Systems zu erwarten. Diese kann zum Beispiel das Pumpverhalten der Flüssigkeit beeinflussen, wodurch die Permeation beeinflusst wird. Auch spielen die bereits erwähnten, typischen Fehlerquellen in dem MES eine Rolle, wodurch die Abweichungen entstehen. Jedoch liegen die aus dieser Messung ermittelten Permeationskoeffizienten in derselben Größenordnung.

Mit Hilfe dieser Methode ist es auch möglich, Permeation und Diffusion von Substanzen in anderen 3D-Geweben wie zum Beispiel Leber, Niere oder Darm zu ermitteln. Diese Gewebe können auf einem MES kultiviert werden. Hierdurch können neue Fragestellungen untersucht werden, zum Beispiel zur Diffusionsgeschwindigkeit von Substanzen in solchen Geweben.

Des Weiteren sollte in Kulturen mit Zellmodellen der Metabolismus während der Kultur verfolgt werden können. Hierfür wurde geprüft, ob es möglich ist, den Glukoseverbrauch und die Laktatbildung in einem 96 MES System zu ermitteln. Erste Versuche mit einem vereinfachten Zellmodell bestätigen die Durchführbarkeit. Jedoch gibt es Unterschiede bei den ermittelten Produktions- und Verbrauchsraten, wenn der Versuch verschiedene zeitliche Konstitutionen aufweist.

Auffallend ist, dass die Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsraten in den kürzeren Versuchen höher waren als in längeren. Es ist möglich, dass die Zellen im Modell nach einer längeren Kultivierungsdauer eine andere C-Quelle wie zum Beispiel Glutamin bevorzugen [81]. Auch kann das Laktat nach einer bestimmten Zeit wieder verstoffwechselt werden, wodurch die Laktatproduktion in der Messung augenscheinlich abnimmt. Um die Vergleichbarkeit in diesem Versuch zu gewährleisten, muss die Versuchsdauer auf jeden Fall konstant gehalten werden, da sich offensichtlich Glukoseverbrauch und Laktatproduktion mit der Zeit verändern.

## 5 Untersuchungen mit Hautmodellen

Die entwickelte Messmethode zur Bestimmung der Permeation soll nun auf Hautmodelle angewendet werden. Hierfür wurden kommerzielle Hautmodelle von der Firma MatTek untersucht. Es wurden auch Vollhautmodelle nach den Protokollen von Katharina Schimek (TU Berlin) [94] hergestellt und für die Untersuchung hinzugezogen. Da sich die Vollhautmodelle währenddessen noch im Entwicklungsstadium befanden, wurden sie nach und nach verändert und für diese Arbeit adaptiert. Insgesamt gab es drei Protokolle, die Vollhautmodell 1 – 3 nummeriert sind. Dabei ist Nummer 1 zeitlich gesehen das erste Protokoll und Nummer 3 das jüngste und letzte Protokoll. Alle Permeationsbestimmungen in diesem Kapitel wurden in Kooperation mit der TU Berlin durchgeführt. Dort bestand die Möglichkeit, die Versuche in einem größeren Maßstab durchzuführen. Das kommerzielle Hautmodelle MatTek wurden von der TU Berlin zu Verfügung gestellt.

### 5.1 Ergebnisse der Permeationsuntersuchungen mit Hautmodellen

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse aus den Permeationsmessungen mit Hautmodellen zusammengetragen. Da, wie bereits erwähnt, während des Projektes das Vollhautmodell stetig weiterentwickelt wurde und auch nur zu gewissen Zeitpunkten die kommerziellen Hautmodelle zu Verfügung standen, wurden verschiedene Parameter mit unterschiedlichen Hautmodellen evaluiert. Dadurch ist die Vergleichbarkeit der Vollhautmodelle zueinander nicht gewährleistet. Jeder Abschnitt entspricht einer Versuchsreihe und ist unabhängig von den Anderen zu betrachten. Es werden im Anschluss dieser Kapitel mögliche Zusammenhänge diskutiert.

#### **Einfluss verschiedener Partikelgrößen bei Vollhautmodell 1**

Bei der Untersuchung von Vollhautmodell 1 (Kultivierungszeit von 24 – 25 Tagen) wurde der Permeationsversuch im 2OC durchgeführt, wobei die Permeation der Substanzen FN und FD4.000 miteinander verglichen wurden. Der ermittelte Permeationskoeffizient liegt bei  $5,59 \times 10^{-8}$  m/s für FN und  $1,63 \times 10^{-8}$  m/s für FD4.000 (siehe Tabelle 5.1). Die Standardabweichung liegt bei  $0,39 \times 10^{-8}$  m/s und  $0,16 \times 10^{-8}$  m/s. Diese entspricht einer prozentualen Abweichung von 7 % und 10 %, welche im Rahmen der vorangegangene Permeationsmessungen liegt (siehe Kapitel 4). Die Anzahl der Proben betrug 3 für die

## 5. Untersuchungen mit Hautmodellen

Substanz FN und 6 für FD4.000. Mittels eines t-Tests konnte bestätigt werden, dass sich die beiden Werte signifikant voneinander unterscheiden. Der P-Wert war kleiner als 0,001. Wie erwartet permeiert die größere molekulare Substanz FD4.000 langsamer durch das Vollhautmodell als die kleinere molekulare Substanz FN.

Tabelle 5.1: Permeationskoeffizient von FN und FD4.000 für Vollhautmodell 1.

Substanz	Permeationskoeffizient [ $\times 10^{-8}$ m/s]	STABW [ $\times 10^{-8}$ m/s]	Anzahl der Proben [N]
FN.	5,59	0,39	3
FD4.000	1,63	0,16	6

Um die Morphologie der Vollhautmodelle 1 analysieren zu können, wurden diese nach der Messung geschnitten und gefärbt. In der Abbildung 5.1 sind exemplarisch zwei histologische Schnitte mit einer HE Färbung von Vollhautmodell 1 zu sehen. Ähnlich wie bei den Zellenmodellen (vergleiche mit Abbildung 4.9) ist auch hier eine Sandwichstruktur zu erkennen. In der Mitte befindet sich in gräulicher Färbung das Kollagen. Am Rand sind in rot die Zellschichten lokalisiert. In blau sind die Zellkerne gefärbt. Es ist gut zu erkennen, dass mehrere Zellschichten am Rand gebildet wurden. Jedoch besitzen diese Schichten keine konstante Schichtdicke und variieren sehr stark (vergleiche Abbildung 5.1 links und rechts). Ebenso ist flächenartiger Zellenbewuchs in der Matrix sichtbar. Es ist optisch ersichtlich, dass keine Differenzierung der Keratinozyten stattgefunden hat. Somit hat sich auch kein Stratum corneum während der Kultur gebildet.

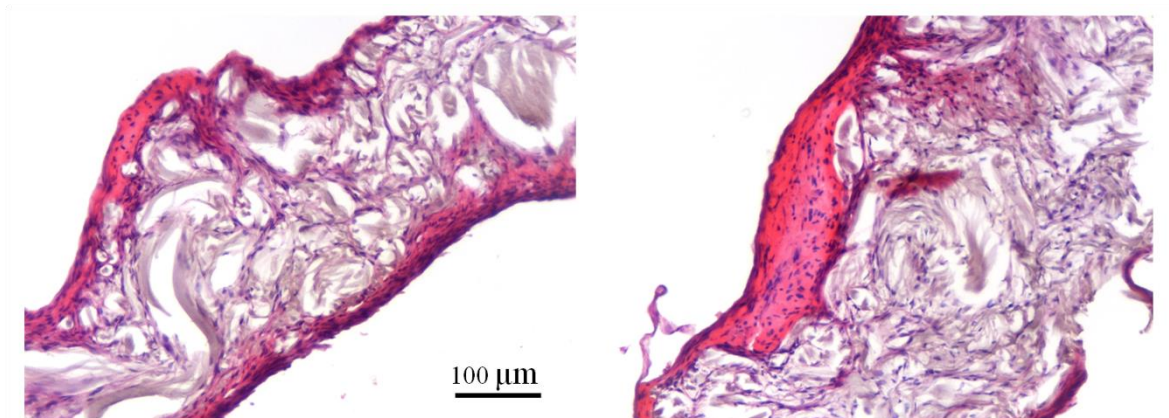


Abbildung 5.1: Histologischer Schnitt von Vollhautmodell 1. Die Schnitte wurden mit HE gefärbt. Exemplarisch sind hier zwei Schnitte zu sehen. In rot ist die Zellfläche gefärbt und die blauen Punkte entsprechen den Zellkernen. In der Mitte ist in grau die Kollagenstruktur ersichtlich.

### EpiDerm™ von MatTek

Für die Matek Modelle wurden Permeationsmessungen im 2OC durchgeführt. Als Permeat wurde FN in dem Medium für die EpiDerm™ Modelle gelöst. Es wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen angesetzt, um diese miteinander zu vergleichen. Die aus diesen Messungen ermittelten Permeationskoeffizienten liegen bei Werten von  $6,87 \times 10^{-10}$  m/s für 0,01 mg/ml FN und  $8,4 \times 10^{-10}$  m/s für 0,1 mg/ml (siehe Tabelle 5.2) mit einer Standardabweichung von  $3,02 \times 10^{-10}$  m/s und  $3,17 \times 10^{-10}$  m/s. Die prozentuale Abweichung der Werte fällt recht hoch aus mit einem Wert von 44 % und 37,7 %. Mittels eines t-Tests wurde ein P-Wert von 0,919 ermittelt. Die zwei Permeationskoeffizienten unterscheiden sich somit nicht signifikant voneinander.

Tabelle 5.2: Permeationsmessung im 2OC mit FN durch EpiDerm™.

Konzentration von FN [mg/ml]	Permeationskoeffizient [ $\times 10^{-10}$ m/s]	STABW [ $\times 10^{-10}$ m/s]	Anzahl der Proben [N]
0,01	6,87	3,02	4
0,1	8,40	3,17	8

### Vollhautmodell 2

Es wurden weitere Permeationsmessungen im 2OC mit Vollhautmodell 2 (Kultivierungszeit 13 Tagen) durchgeführt. Als Donatorsubstanz wurde FN mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml verwendet. Zusätzlich wurde eine Vollhautmodell 2 ohne Keratinozyten hergestellt. Vor dem Permeationsbestimmung wurde das Vollhautmodell 2 optisch selektiert. Modelle mit einer ausgebildeten Stratum corneum Schicht (Vollhautmodell 2+) weisen eine leicht gräuliche Färbung auf, wohingegen die Oberfläche von Modellen ohne ausgebildete Stratum corneum Schicht (Vollhautmodell 2-) eher glatt und glänzend wirken (siehe Abbildung 5.3). In der Abbildung 5.2 sind die ermittelten Permeationskoeffizienten aus diesem Versuch als Balkendiagramm aufgetragen. Die Werte, Standardabweichung und Anzahl der Proben sind in der Tabelle 5.3 aufgelistet. Es ist zu sehen, dass das Vollhautmodell 2 ohne Keratinozyten den höchsten Permeationkoeffizienten aufweist mit einem Mittelwert von  $8,11 \times 10^{-8}$  m/s. Das Vollhautmodell 2- besitzt einen Wert von  $6,34 \times 10^{-8}$  m/s. Bei dem Vollhautmodell 2+ sinken die Permeationskoeffizienten auf einen Wert von  $2,23 \times 10^{-8}$  m/s ab, was darauf hinweist, dass diese Modelle eine größere Barriere für die Substanz darstellen. Aufgrund der geringen Probenanzahl wurde für diesen Versuch keine statistische Auswertung durchgeführt. Zusammenfassend konnte beobachtet werden,

dass Vollhautmodell 2 die höchste Barriereeigenschaft besitzt. Bei den Proben ohne Keratinozyten und schlecht ausdifferenzierter Schicht lässt die Barriereeigenschaft rapide nach.

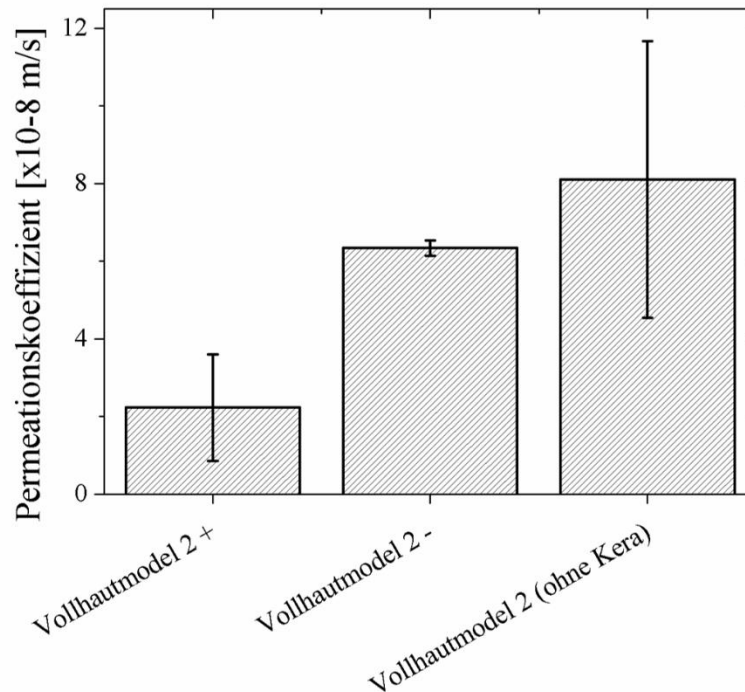


Abbildung 5.2: Darstellung der Permeationskoeffizienten als Balkendiagramm aus den Permeationsversuchen in 2OC mit FN durch Vollhautmodell 2. Vollhautmodelle mit „+“ besitzen ein gut differenziertes Stratum corneum. Vollhautmodelle mit „-“, weisen eine schlecht differenzierte Oberfläche auf.

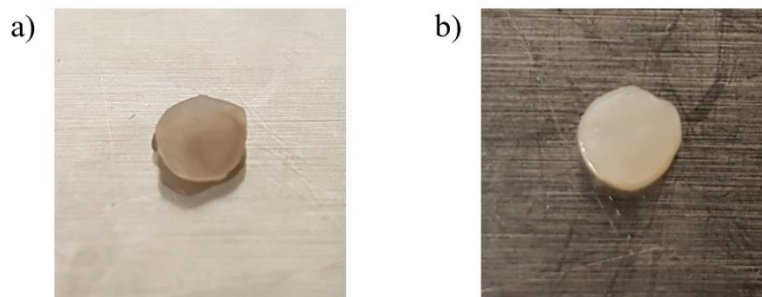


Abbildung 5.3: Makroskopische Darstellung der Vollhautmodelle. a) Vollhautmodell mit einem gut ausdifferenzierten Stratum corneum. b) Vollhautmodell mit einem weniger gut ausdifferenzierten Stratum corneum. Die Proben haben ein Durchmesser von ungefähr 4,26 cm.

## 5. Untersuchungen mit Hautmodellen

Tabelle 5.3: Permeationskoeffizienten von Vollhautmodell 2 im 2OC. Untersucht wurde FN durch die Hautmodelle:

Barriere	Permeationskoeffizient [ $\times 10^{-8}$ m/s]	STABW [ $\times 10^{-8}$ m/s]	Anzahl der Proben [N]
Vollhautmodell 2+	2,23	1,37	9
Vollhautmodell 2-	6,34	0,20	2
Vollhautmodell 2 ohne K.	8,11	3,57	3

In der Abbildung 5.4 sind exemplarisch histologische Schnitte der Hautmodelle abgebildet. Bei dem Vollhautmodell mit und ohne Keratinozyten (siehe Abbildung 5.4 a und b) ist eine Phasentrennung in der Kollagenschicht zu erkennen. Die untere, gröbere Struktur bildet das humane Kollagen von der Matriderm<sup>®</sup>-Matrix ab und die feinere, obere Struktur das Rattenschwanzkollagen. Über dem Rattenschwanzkollagen ist bei Vollhautmodell 2 mit Keratinozyten eine dünn differenzierte Zellschicht mit ausgebildetem Stratum corneum zu sehen (siehe Abbildung 5.4 b). Durch die HE Färbung konnte gezeigt werden, dass die Vollhautmodelle potenzielle eine Epidermis bilden.

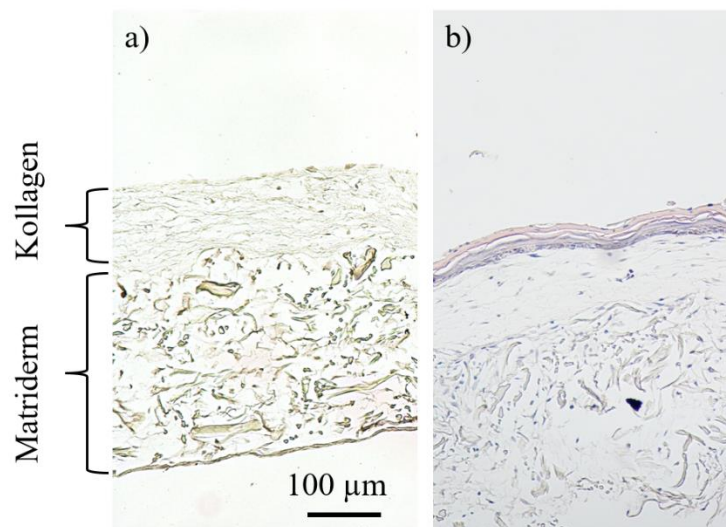


Abbildung 5.4: Histologische Schnitte der Modellkonstrukte mit HE Färbung. a) Darstellung des Vollhautmodells 2 ohne Keratinozyten: Es ist eine gute Phasentrennung zwischen der Matriderm Matrix und Kollagen zu erkennen. b) Abbildung vom Vollhautmodell 2 bestehend aus Matriderm und Kollagen mit Fibroblasten und einer dünn differenzierten Keratinozytenschicht.

### Untersuchung des Permeationsverhaltens bei verschiedenen Entwicklungsstadien des Vollhautmodells 3

Bei Vollhautmodell 3 (Kultivierungsdauer von 35 – 41 Tagen) wurde das Permeationsverhalten in MES von FN während der Kultur zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. In der Abbildung 5.5 sind die ermittelten Permeationskoeffizienten über der Kultivierungszeit aufgetragen. Zu Beginn des Tages 12 der Kultivierung liegt der Permeationskoeffizient bei einem Mittelwert von  $8,23 \times 10^{-8}$  m/s. Dieser nimmt während der *submerge*-Kultur (in Medium untergetaucht) bis Tag 19 ab auf einen Wert von  $6,45 \times 10^{-8}$  m/s. Anschließend wurde der *air lift* durchgeführt. Der Permeationskoeffizient sinkt am Tag 26 weiter auf einen Wert von  $2,88 \times 10^{-8}$  m/s und nimmt etwas zu am Tag 29 auf einen Wert von  $3,88 \times 10^{-8}$  m/s. Später am Tag 36 sinkt der Permeationskoeffizient auf den Wert  $3,36 \times 10^{-8}$  m/s und am Tag 43 auf  $2,07 \times 10^{-8}$  m/s. Auffallend ist der leichte Anstieg am Tag 29. Generell ist jedoch eine Tendenz zu erkennen, dass der Permeationskoeffizient über die Kultivierungsdauer abnimmt. Die Abnahme ist sehr eindeutig zu sehen, wenn man die Werte vor und nach dem *air lift* miteinander vergleicht (siehe Abbildung 5.5). Die Standardabweichungen der gemessenen Werte liegen im Bereich von  $1,53 \times 10^{-8}$  m/s bis  $2,83 \times 10^{-8}$  m/s (siehe Tabelle 5.4) und der systematische Fehler bewegt sich zwischen 18,6 % bis 85,1 %.

Nach dem Permeationsversuch wurden die Proben für die HE Färbung präpariert. Die gefärbten Proben sind in der Abbildung 5.6 dargestellt. Am 12. Tag sind zwei unterschiedlich strukturierte Phasen in grau zu erkennen. Die obere Phase ist das Rattenschwanzkollagen und darunter befindet sich die Matriderm<sup>®</sup>-Matrix. In lila/blau gefärbt sind die Zellkerne der Fibroblasten sichtbar, welche sich im gesamten Bereich verteilt haben. Am Tag 19 ist zu sehen, dass sich über dem Rattenschwanzkollagen eine Zellschicht gebildet hat, wobei es sich um Keratinozyten handelt. Auffällig ist, dass die Rattenschwanzkollagenschicht nahezu verschwunden ist (vergleiche Abbildung 5.6. 12. Tag und 19. Tag). Nach 29 Tagen Kultur ist zu erkennen, dass sich die Keratinozyten differenziert haben. Über der Matriderm<sup>®</sup>-Matrix sind mehrere Zellschichten in lila/blau gefärbt zu sehen (siehe Abbildung 5.6 Tag 29). Ähnlich wie bei der menschlichen Haut haben sich die Keratinozyten differenziert. Die Zellen werden in Richtung der Oberfläche flacher und verlieren ihre Zellkerne. An der Oberfläche ist eine rosafarbene Schicht als Stratum corneum zu erkennen, welches sich teilweise sogar ablöst. Große morphologische Änderungen sind in der weiteren Kultur nicht mehr zu erkennen. Das Vollhautmodell 3 weist am Tag 43 ähnliche Strukturen wie am Tag 29 auf. Leichte Änderungen sind in der Anordnung der differenzierte Keratinozyten zu sehen, diese wirkt dichter und enger.

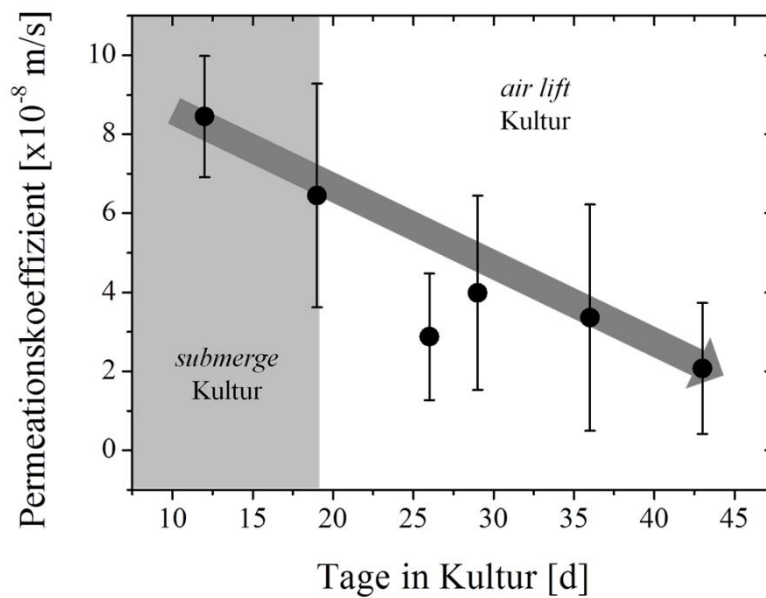


Abbildung 5.5: Darstellung der Permeationskoeffizienten über der Zeit aus der Messung mit Vollhautmodell 3. Als Permeat wurde FN verwendet. Es wurde die Permeation zu den unterschiedlichen Kultivierungszeitpunkten von der statischen Kultur im MES untersucht. Zu erkennen ist eine stetige Abnahme der Permeation über der Zeit (grauer Pfeil).

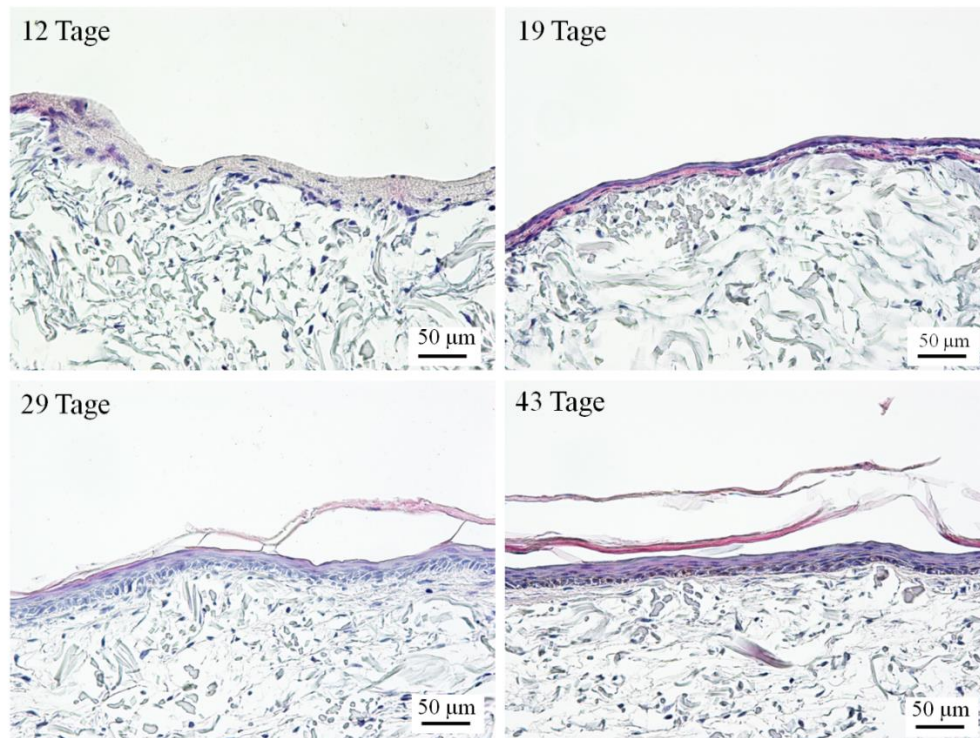


Abbildung 5.6: Histologische Schnitte des Vollhautmodells 3 nach den Permeationsuntersuchungen. Es wurde mit HE gefärbt und die Modelle stammen aus unterschiedlichen Kultivierungszeitpunkten.

Im nächsten Abschnitt soll die Kultivierung im 2OC untersucht werden. Am 10ten Tag der Kultivierung wurde ein Teil der Modelle in den 2OC eingesetzt und parallel zu den anderen kultiviert. Nach 14 Tagen und 21 Tagen (bzw. 7 Tagen und 14 Tagen im 2OC), wurde die Permeation von FN in den Modellen bestimmt. Beim Vergleich des Permeationskoeffizienten an den zwei Messpunkten (siehe Abbildung 5.7) ist zu erkennen, dass die Werte im 2OC mit  $5,01 \times 10^{-8}$  m/s und  $6,73 \times 10^{-8}$  m/s höher sind als im MES mit Werten von  $3,36 \times 10^{-8}$  m/s und  $2,07 \times 10^{-8}$  m/s. Auch scheint die Permeation von FN bei den Vollhautmodellen im 2OC mit der Zeit zuzunehmen im Vergleich zum MES, wo eine Abnahme über die Kultivierungszeit beobachtet wurde. Somit scheint die Barriere des Vollhautmodells 3 während der Kultur im 2OC über die Zeit schlechter zu werden.

Bei Betrachtung der histologischen Färbung der Vollhautmodelle ist ein Unterschied zwischen der Kultivierung im MES und 2OC zu sehen. Die differenzierte Epidermisschicht scheint in der 2OC Kultur zu verschwinden. Am Tag 36 ist noch eine ausdifferenzierte Epidermis in der 2OC Kultivierung zu sehen. Im Vergleich zu der Kultur im MES ist zu erkennen, dass keine kubisch orientierten Zellschichten existieren. Bei weiteren Kulturen im 2OC verschwindet die differenzierte Keratinozytenschicht am Tag 43 fast gänzlich

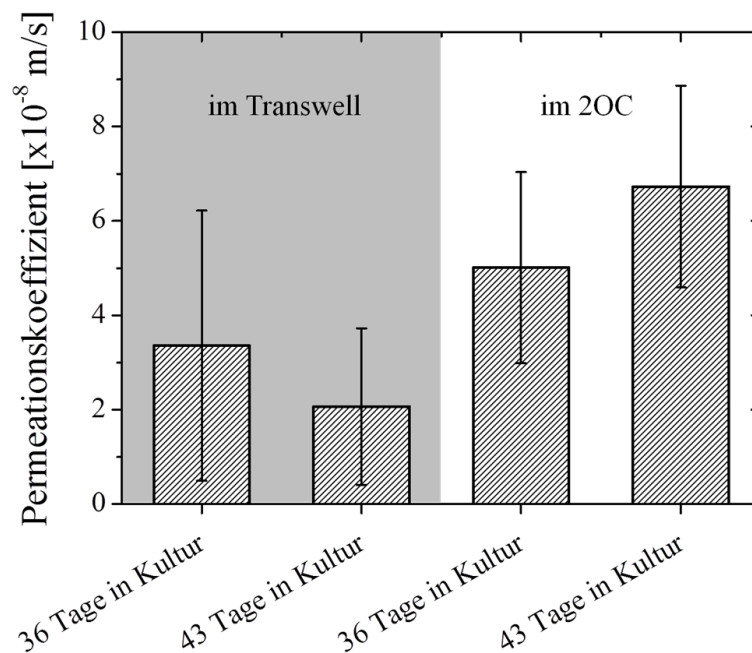


Abbildung 5.7: Darstellung des Permeationskoeffizienten von FN durch Vollhautmodell 3 in Transwell und 2OC nach 36 und 43 Tage Kultur.

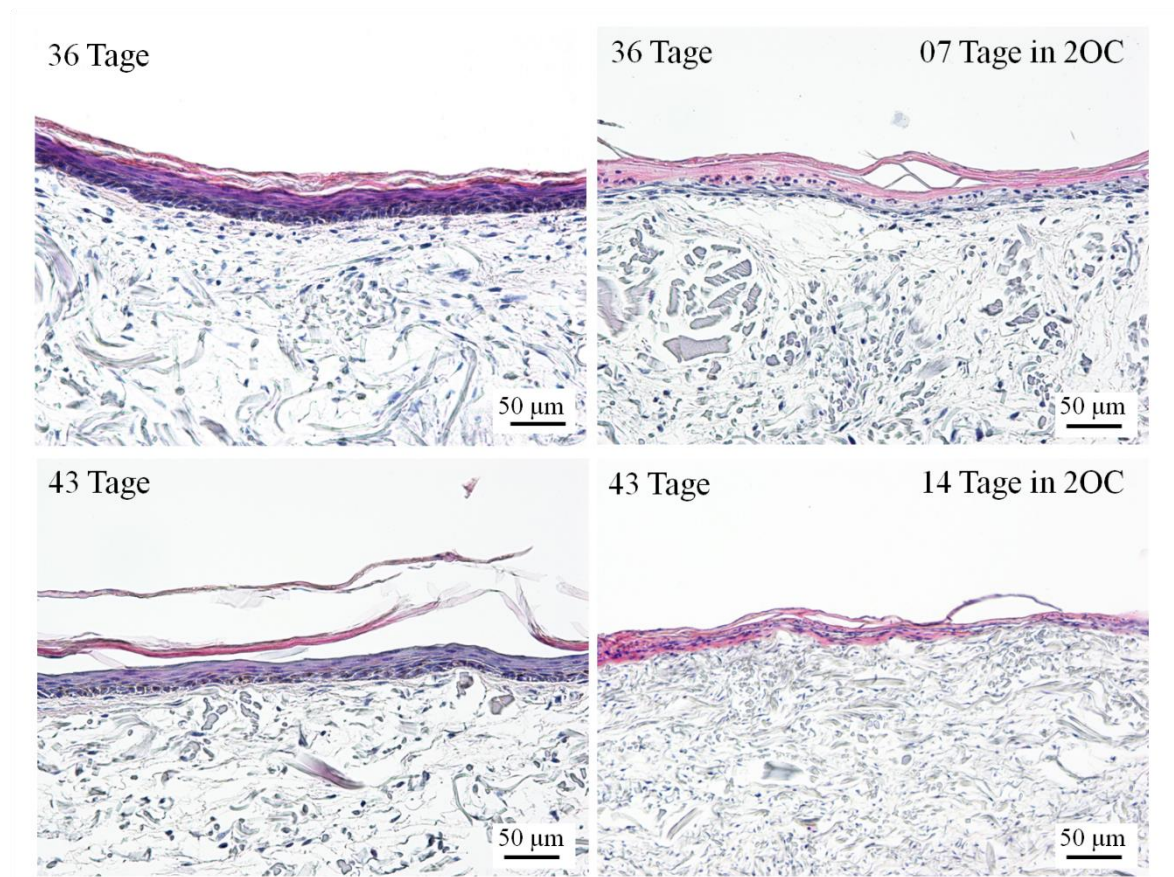


Abbildung 5.8: Histologische Schnitte mit HE Färbung des Vollhautmodell 3 zu unterschiedlichen Kultivierungszeitpunkten.

(vergleiche Abbildung 5.8 links und rechts). Bei den Modellen in Transwell<sup>®</sup> ist zwischen Tag 36 und Tag 43 kein großer Unterschied zu sehen.

In der Tabelle 5.4 sind die Permeationskoeffizienten, Standardabweichung und Anzahl der Proben über die Kultivierungszeit im Detail aufgelistet.

Es ist aus dieser Untersuchung gut ersichtlich, dass der Permeationskoeffizient mit der Kultivierungsdauer korreliert. Somit kann die Barriereeigenschaft der Hautmodelle mit Hilfe der Permeationsmessung quantifiziert werden.

## 5. Untersuchungen mit Hautmodellen

Tabelle 5.4: Ergebnis aus dem Permeationsversuch mit FN durch Vollhautmodell 3 in 2OC. Untersucht wurde die Permeation zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten.

Zeit	Permeations- koeffizient [ $\times 10^{-8}$ m/s]	STABW [ $\times 10^{-8}$ m/s]	Anzahl der Proben [N]
12 Tage ( <i>submerge</i> , ohne Fibrin)	8,23	1,53	3
19 Tage ( <i>submerge</i> )	6,45	2,83	4
26 Tage ( <i>air lift</i> )	2,88	1,60	5
29 Tage ( <i>air lift</i> )	3,99	2,46	5
36 Tage ( <i>air lift</i> )	3,36	2,86	5
36 Tage in <i>air lift</i> (7 Tage in 2OC)	5,01	2,03	6
43 Tage ( <i>air lift</i> )	2,07	1,66	5
43 Tage in <i>air lift</i> (14 Tage in 2OC)	6,73	2,14	7
Leerprobe	0,03	0,02	5

### Metabolismusbestimmung an Vollhautmodell 3

In einem weiteren Versuch wurden die Glukoseverbauchs- und Laktatproduktionsrate im Vollhautmodell 3 bestimmt. Die Messungen wurden an drei verschiedenen Punkten während der Hautmodellkultivierung im E2 Medium durchgeführt. Der erste Messpunkt erfolgte direkt am Tag vor dem *air lift*, der zweite 7 Tage nach dem *air lift* und der dritte 14 Tage nach dem *air lift*. Der Verlauf der Glukose- und Laktatkonzentration über der Zeit ist in Abbildung 5.9 dargestellt. Es ist zu sehen, dass bis auf einige Schwankungen, die Glukosekonzentration über die Zeit ab- und die Laktatkonzentration zunimmt. Ein drastischer Unterschied zwischen den verschiedenen Kultivierungszeitpunkten ist in der Glukoseverbauchsrate am Tag 14 nach dem *air lift* zu sehen. Hier nimmt der Glukoseverbrauch mit einem Wert von 0,094 g/l h drastisch zu. Davor liegt der Werte bei 0,027 g/l h direkt nach dem *air lift* und 0,017 g/l h 7 Tage nach dem *air lift*. Die Laktatproduktionsrate liegt in allen Messpunkten im ähnlichen Bereich bei einem Wert von 0,030 g/l h und 0,035 g/l h (siehe Tabelle 5.5).

Tabelle 5.5: Die ermittelte Glukoseverbrauchsrate und Laktatproduktionsrate bei Vollhautmodell 3 zur verschiedenen Kultiverungszeitpunkten.

Kultivierungszeitpunkt	Glukoseverbrauchsrate [g/l·h]	Laktatproduktionsrate [g/l·h]
direkt vor <i>air lift</i>	0,027	0,035
7 Tage nach <i>air lift</i>	0,017	0,035
14 Tage nach <i>air lift</i>	0,094	0,030

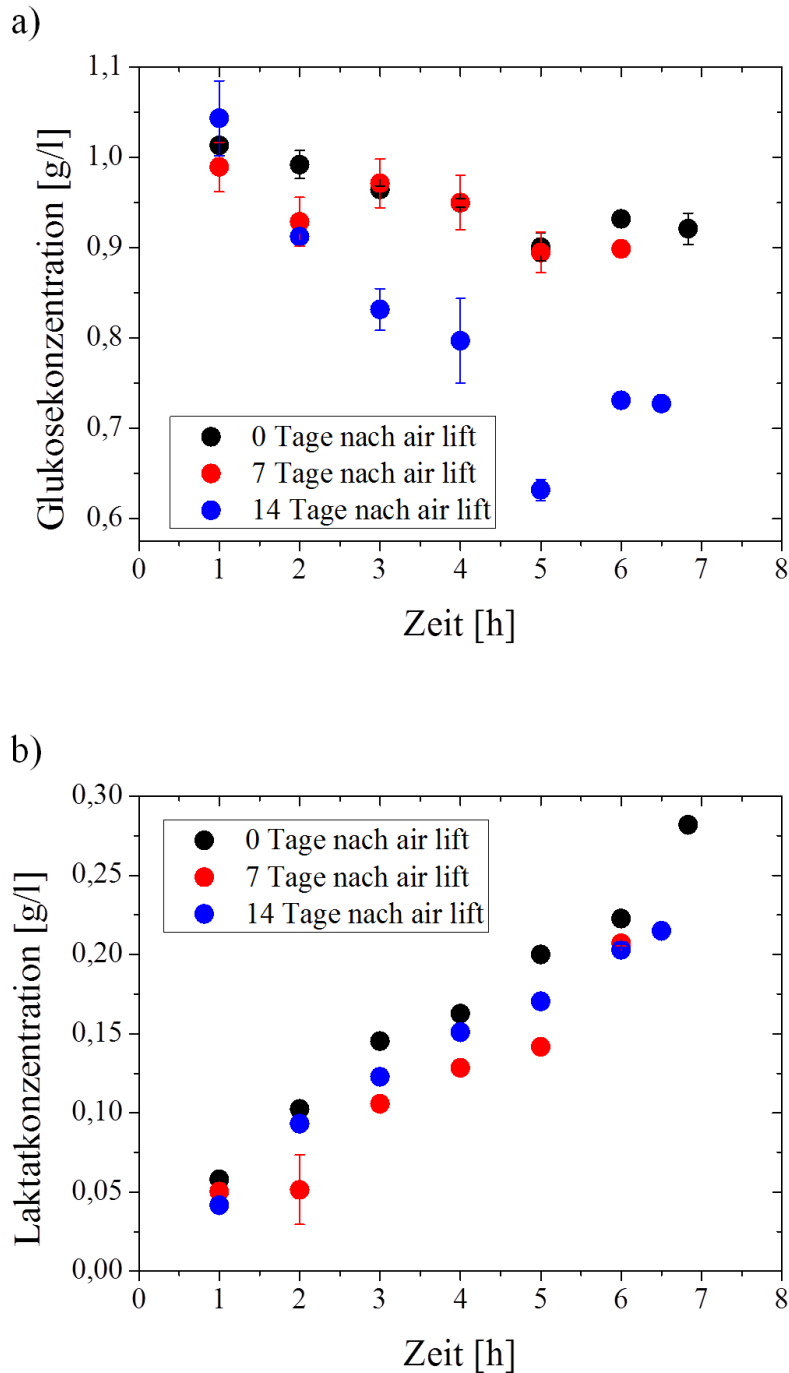


Abbildung 5.9: Glukoseverbrauch und Laktatproduktion bei Vollhautmodell 3 während verschiedener Kultivierungszeitpunkten (direkt vor dem *air lift*, 7 Tage und 14 Tage nach dem (*air lift*)). Die Bestimmung erfolgte mit E2 Medium und die Konzentration wurde enzymatisch mit YSI bestimmt (N = 3).

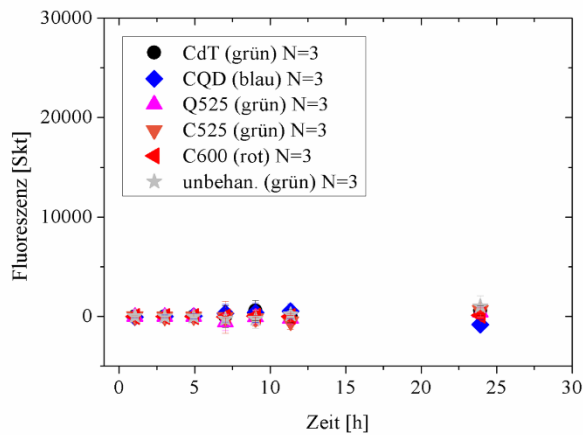
### 5.2 Permeationsmessung mit Nanopartikeln auf EpiDerm™

Im ersten Ansatz der Messung wurden fünf verschiedene Nanopartikel auf das EpiDerm™ appliziert (CdT, CQD, Q525, C525 und C600). Hierbei erfolgte erst eine einmalige Applikation, dann wiederholte Applikationen (5-mal in Abstand von 24 Stunden). Es ist zu sehen, dass bei der einmaligen Applikation die permeierte Fluoreszenz in den ersten 5 Stunden nahezu bei Null liegt. Im späteren Verlauf sind leichte Schwankungen um den Nullpunkt herum zu sehen (siehe Abbildung 5.10 a)). Im Vergleich zu der gemessenen Referenz (Fluoreszenz der Nanosubstanzen mit einer Konzentration 0,0625 bis 2 µl in 800 µl Medium) (siehe Abbildung 5.10 c)) ist zu erahnen, dass keine Permeation durch die Hautmodelle stattgefunden hat. Bei der Messung mit wiederholten Nanopartikel-Applikationen sind ebenfalls Schwankungen, um den Nullpunkt zu erkennen (siehe Abbildung 5.10 b)). Eine Ausnahme ist bei C600 (orange) zu sehen. Hier liegen die Werte recht genau auf dem Wert Null. Beim Vergleich der Messung mit wiederholten Applikationen und den Referenzwerten (siehe Abbildung 5.10 c)) lässt sich erahnen, dass auch hier keine eindeutige Permeation stattfand. Als Vergleich ist zu erwähnen, dass bei der Permeationsmessung mit wiederholten Applikationen in der Summe ein gesamtes Volumen von 10 µl Nanopartikelsubstanz auf die Hautmodelle appliziert wurde. Hingegen wurde bei der Referenz eine maximale Substanzmenge von 2 µl im Medium gemessen.

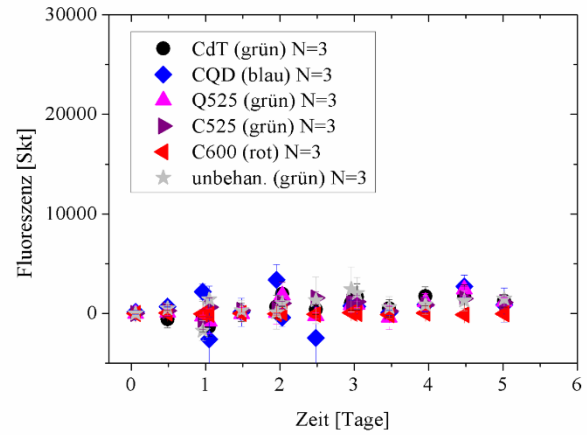
Im zweiten Ansatz sollte die erste Messung wiederholt werden. Hierfür wurde C600 und Q525 als Nanopartikel verwendet. Aus den vorangegangenen Versuchen war bekannt, dass FN durch das EpiDerm™ Modell permeiert. Aus diesem Grund wurde FN als Positivkontrolle verwendet. Der Versuch wurde mit wiederholten Applikationen (5-mal in Abstand von 24 Stunden) durchgeführt. In der Abbildung 5.11 ist das Ergebnis zu sehen.

## 5. Untersuchungen mit Hautmodellen

a) Eine Applikation



b) Wiederholte Applikationen



c) Referenz

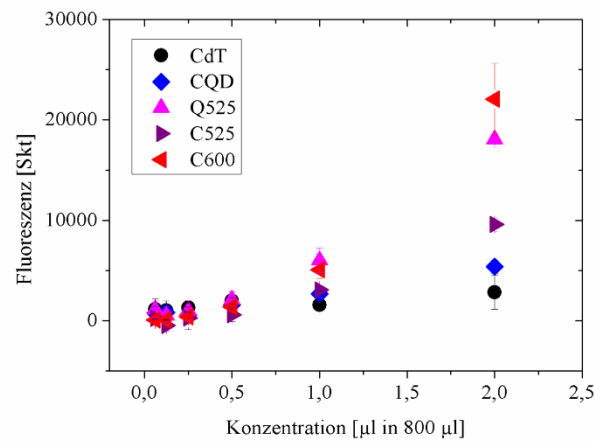


Abbildung 5.10: Erste Permeationsmessung von Nanopartikeln auf EpiDerm<sup>TM</sup>. In a) und b) wurde die gemessene Fluoreszenz über der Zeit aufgetragen. Es erfolgte ein einmaliges a) und wiederholte b) Applikation der Nanopartikel. Das Diagramm c) stellt eine Referenz dar. Die Fluoreszenz der Nanosubstanz wurde über eine Konzentration von 0,0625 bis 2 µl in 800 µl Medium aufgetragen. Die Abkürzungen der Substanzen lauten wie folgt: CdT = Cadmium Tellurid, CQD = Carbon Quantum Dots, Q525 = Qtracker<sup>®</sup> 525 Cell Labeling Kit, C525 = CANdot<sup>®</sup> qantum dot (CdSe core/shell/shell) 525 nm, C600 = CANdot quantum dot (CdSe core/shell/shell) 600 nm.

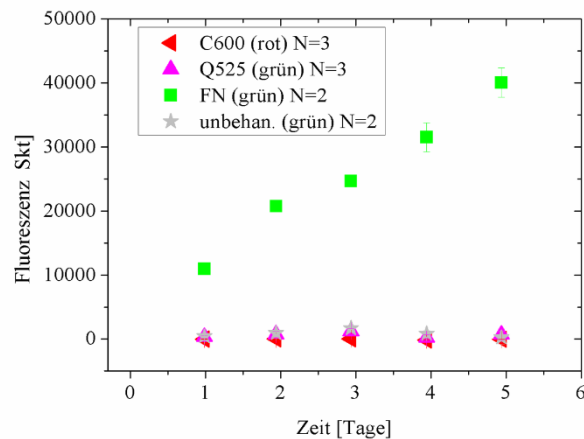


Abbildung 5.11: Zweite Permeationsmessung von Nanopartikeln auf EpiDerm<sup>TM</sup>. Aufgetragen wurde die Fluoreszenz der permeierten Substanz über der Zeit. Für die Messung wurden zwei Nanopartikel und Fluorescein Natrium (FN) als Positivkontrolle verwendet. Die Abkürzungen der Substanzen lauten wie folgt: C600 = CANdot quantum dot (CdSe core/shell/shell) 600 nm und Q525 = Qtracker<sup>®</sup> 525 Cell Labeling Kit.

Gerade durch den Einsatz einer Positivkontrolle ist gut zu sehen, dass die gemessenen Werte aus der ersten Messung nahezu Null sind (siehe Abbildung 5.10 b)). FN permeiert durch das Hautmodell und die gemessene Fluoreszenz steigt nach jeder Applikation von Tag zu Tag an (siehe Abbildung 5.11).

Da die verwendeten Nanopartikel mit Fluoreszenz anregbar sind, konnten die histologischen Schnitte unter dem Mikroskop analysiert werden. Die Ergebnisse aus den Permeationsmessungen spiegeln sich sehr gut bei der mikroskopischen Betrachtung der Proben wieder. Es ist sehr gut zu sehen, dass die Nanopartikel nahezu an der Oberfläche der Hautmodellen geblieben sind (Abbildung 5.12).

Leichte Unterschiede sind in der Menge der Substanz auf der Hautoberfläche zu erkennen. Es ist mehr Substanz auf der Oberfläche bei der Messung mit wiederholten Applikationen zu sehen als bei der einmaligen Applikation (Vergleich linke und rechte Spalte in Abbildung 5.12). Gut zu sehen ist, dass die Nanopartikel teilweise Agglomerate bildet (siehe Abbildung 5.12 a), e) und i)).

Gerade auf der Abbildung 5.12 a) sind die grün fluoreszierenden Punkte auf der Oberfläche sehr auffällig. Auf einigen Bildern ist zu sehen, dass an der Unterseite des Modells eine fluoreszierende Schicht existiert. Hierbei handelt es sich nicht um Nanopartikeln. Bei der Überlappung ist zu sehen, dass diese Sicht von allen Fluoreszenzspektren angeregt wird

## 5. Untersuchungen mit Hautmodellen

(siehe Abbildung 5.12 d) f) h)). Es handelt sich hierbei offensichtlich um eine Gelschicht auf der die Hautmodelle kultiviert werden.

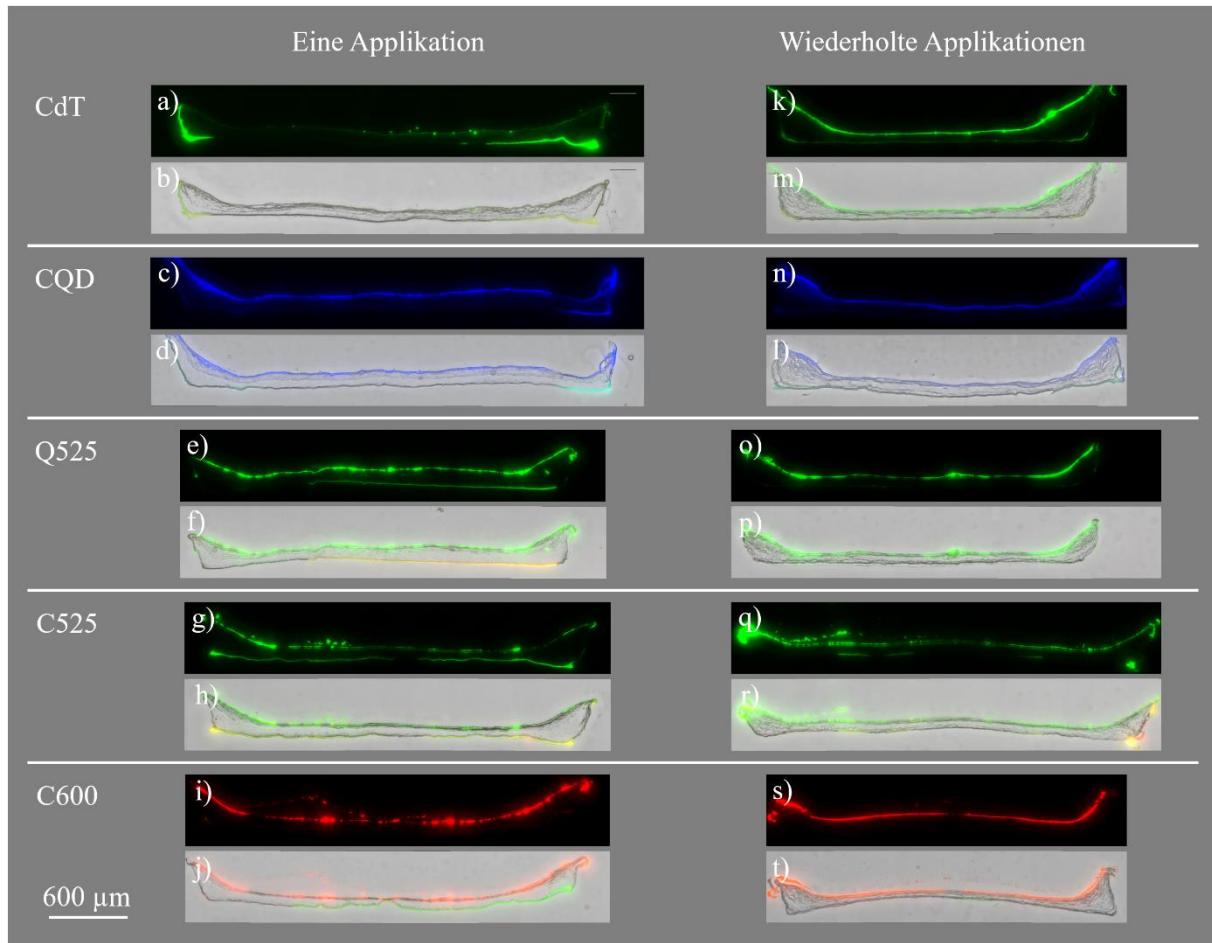


Abbildung 5.12: Fluoreszenzmikroskopische Bilder aus dem ersten Permeationsversuch mit Nanopartikeln auf EpiDerm™ Hautmodellen. Die linke Spalte stellt die Messung mit einer Applikation dar a) – j), die rechte Spalte die Messung mit wiederholten Applikationen k) – t). Die Bilder mit dem schwarzen Hintergrund stellen die reinen Fluoreszenzabbildungen dar. In grau sind die zusammengelegten Bilder aus der Fluoreszenzdarstellung und Durchlichtbild der Probe. Es wurden fünf verschiedene Nanopartikel untersucht. Diese sind: CdT = Cadmium Tellurid a) b) k) m), CQD = Carbon Quantum Dots c) d) n) l), Q525 = Qtracker® 525 Cell Labeling Kit e) f) o) p), C525 = CANdot® quantum dot (CdSe core/shell/shell) 525 nm g) h) q) r), C600 = CANdot quantum dot (CdSe core/shell/shell) 600 nm i) j) s) t).

In Abbildung 5.13 sind die Fluoreszenzbilder aus dem zweiten Permeationsversuch dargestellt. Auch hier ist zu sehen, dass die Nanopartikel hauptsächlich an der Hautoberfläche lokalisiert sind (siehe Abbildung 5.13 a) – d)). Fluorescein Natrium ist die einzige getestete Substanz, welche durch das Hautmodell permeiert. Diese ist auch sehr gut

## 5. Untersuchungen mit Hautmodellen

anhand der Fluoreszenzbilder zu erkennen. Das ganze Hautmodell fluoresziert grün und ist mit der Substanz durchtränkt (siehe Abbildung 5.13 e) f)).

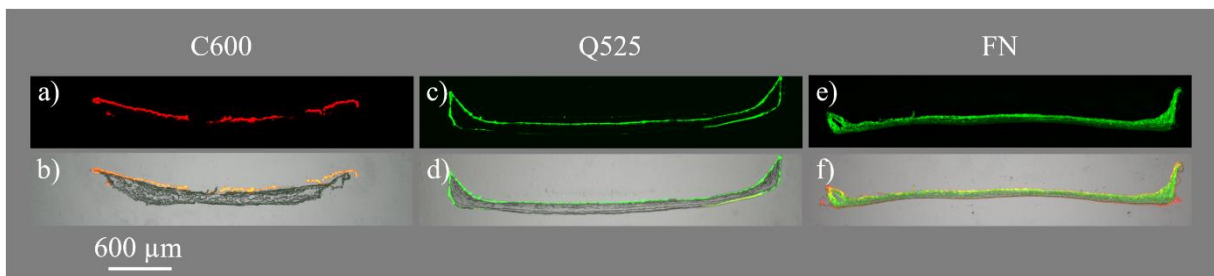


Abbildung 5.13: Fluoreszenzmikroskopische Bilder aus den zweiten Permeationsversuch mit Nanopartikeln auf EpiDerm™ Hautmodellen. Die obere Reihe a) c) und e) zeigt Fluoreszenzaufnahmen und die untere Reihe b) d) und f) zeigt die überlappten Aufnahmen der Fluoreszenz und Durchlichtmikroskopie. Es wurden drei Substanzen untersucht: C600 = CANdot quantum dot (CdSe core/shell/shell) 600 nm a) b), Q525 = Qtracker® 525 Cell Labeling Kit c) d) und FN = Fluorescein Natrium e) f).

Um die Morphologie der Hautmodelle zu beurteilen, wurden nach der Permeationsmessung HE und Immunfärbungen durchgeführt. Anhand der HE Färbung ist die Epidermis gut sichtbar (siehe Abbildung 5.14). Das Stratum Corneum ist in rosa bis rot gefärbt und bildet die oberste Außenschicht ab. Direkt unter dieser Schicht ist das Stratum Granulosum und Stratum Spinosum in dunkel bis hell lila zu erkennen. Die Schichtdicke von Stratum Spinosum ist bei der Messung mit wiederholter Applikation stark reduziert (siehe Abbildung 5.14 h) und i)) bis nicht mehr vorhanden (siehe Abbildung 5.14 g) j) k) und l)). Auf der Abbildung 5.14 g) und h) ist sehr gut ein Aufquellen des Stratum Corneum zu beobachten. Bei der dünnen, braunen, gelben Schicht auf der Modelloberfläche in der Abbildung 5.14 k) handelt es sich sehr wahrscheinlich um die Nanosubstanz, welche bei dem Färbeprozess nicht abgelöst wurde.

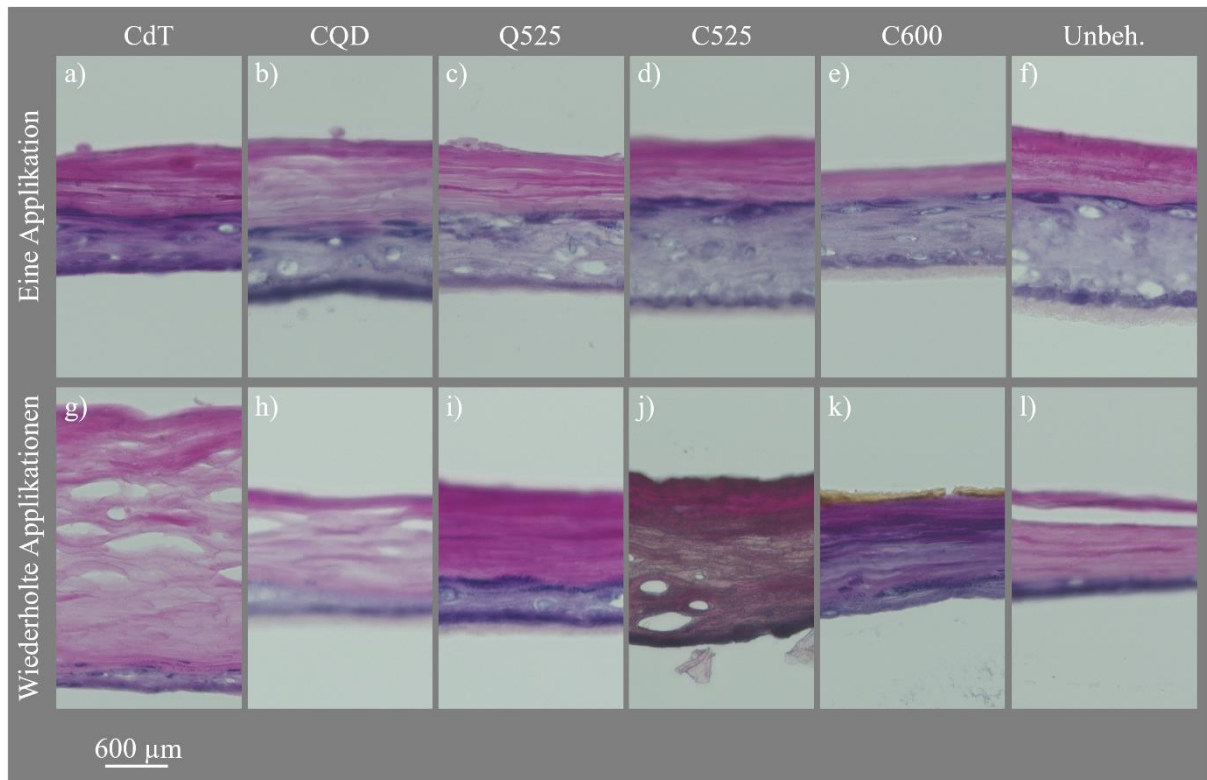


Abbildung 5.14: HE Färbung der EpiDerm™ Hautmodelle nach der Permeationsmessung. Die Bilder zeigen repräsentativ einen Abschnitt der ganzen Hautmodelle. In der oberen Reihe sind die Färbungen nach einmaliger Applikation a) – f) und auf der untere Reihe g) – l) die Färbungen nach wiederholten Applikationen dargestellt. Die Hautmodelle im Bild f) und l) wurde nicht mit Nanopartikeln behandelt. Es wurden fünf verschiedene Nanopartikel untersucht. Diese sind: CdT = Cadmium Tellurid a) g), CQD = Carbon Quantum Dots b) h), Q525 = Qtracker® 525 Cell Labeling Kit c) i), C525 = CANdot® qantum dot (CdSe core/shell/shell) 525 nm d) j), C600 = CANdot quantum dot (CdSe core/shell/shell) 600 nm e) k).

### 5.3 Diskussion der Untersuchungen mit Vollhautmodellen

Heutzutage werden humane Hautmodelle als Ersatz für Tierversuche in Medikamenten- und Toxizitätstests für die Pharmazie und Kosmetik verwendet [6,9,95]. Kommerziell sind auf dem Markt schon einige Hautmodelle wie zum Beispiel EpiSkin™ (L'Oreal), EpiDerm™ (MatTek), SkinEthik™ RHE (SkinEthic laboratories), EpiCS® (CellSystem) und SIT (Japan Tissue Engineering Co.) erhältlich. Hierbei handelt es sich um Hautmodelle bestehend aus nur einem Zelltyp, der die Epidermis darstellt. Ebenso existieren auch sogenannte Vollhautmodelle (GraftSkin®, EpiDermFT® und Pheniom®), die die Epidermis und Dermis darstellen. Die TU Berlin hat ein Vollhautmodell entwickelt [88], welches direkt in einem 96 Well MES kultiviert werden kann. Auf Grund der geringen Größe dieser Modelle werden

Materialkosten gespart und dadurch eine höhere Produktionsrate ermöglicht. In Hinblick auf die Pharma- und Kosmetikindustrie können kleine Hautmodelle mit hohen Produktionsraten von großem Vorteil sein, zumal diese in Verbindung mit den 2OC mit anderen Organen kombinierbar sind.

Die im Kapitel 3.3 beschriebenen Messmethoden zur Bestimmung der Permeation wurden hier auf kommerzielle und selbst hergestellte Hautmodelle angewendet, um deren Permeationseigenschaften, sowie die Verstoffwechslung von Glukose und Laktat zu untersuchen. Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit ist die qualitative Verifizierung von *in vitro* kultivierten Vollhautmodellen. Abgesehen von der Differenzierung der Hautmodelle zu verschiedenen Schichten und Synthese von hauteigenen Proteinen [36,96,39] spielen die Permeationseigenschaften eine große Rolle, da die Haut auch als Schutzbarriere gegen äußere Einflüsse dient [25].

Zu Beginn wurden Zellmodelle bestehend aus HaCaT-Zellen verwendet. Der Vorteil bestand darin, dass es sich hierbei um eine etablierte Zelllinie handelt und die Verfügbarkeit einfacher ist als bei primären Keratinozyten. Es wurden bereits zuvor Vollhautmodelle mit HaCaT hergestellt [38], jedoch wurde in weiteren Untersuchungen festgestellt, dass die Zelllinie zwar differenziert, aber es nicht schafft, sich gänzlich in Haut zu entwickeln [39]. Die Struktur der Hautmodelle aus HaCaT ist unorganisiert, untypischerweise wird Keratin überexprimiert und es werden keine hauttypischen Ceramide lokalisiert [97]. Aus diesem Grund wurden die Zellmodelle aus HaCaT nur für die Vorversuche verwendet.

Wie bereits erwähnt, entspricht jeder Abschnitt einer Versuchsreihe bzw. einem Versuchsansatz. Die Permeationskoeffizienten variieren von Versuchsansatz zu Versuchsansatz. Somit ist der Vergleich zwischen den Vollhautmodellen auch nicht konsistent. Leichte Abweichungen der Werte können auch durch in Kapitel 4.2 erwähnten Fehlerfaktoren entstanden sein. Nichtsdestotrotz verschafft diese Analyse einen Überblick zu den verschiedenen Vollhautmodellen.

Während des Projektzeitraums wurden drei verschiedene Protokolle vom Projektpartner entwickelt. Beim Vergleich der Permeationskoeffizienten (Versuche mit FN) stellt sich heraus, dass sich die Werte im Bereich von  $2,23 \times 10^{-8}$  m/s bis  $5,59 \times 10^{-8}$  m/s bewegen. In Anbetracht der Tatsache, dass die Abweichungen auch durch systematische Fehlerfaktoren in der Methode zwischen den Versuchsansätzen entstehen können, ist die prozentuale Abweichung von fast 40 % im angemessenen Rahmen (siehe Kapitel 4.2). Es ist eine Tendenz zu erkennen, dass Vollhautmodell 2 und 3 eine bessere Barriereeigenschaft mit einem niedrigeren Permeationskoeffizient aufweist als Vollhautmodell 1. Beim Vergleich zu den Modellen aus HaCaT aus Kapitel 4.1 liegen diese Werte auch im selben Bereich,

obwohl dort die Morphologie noch weniger der der Haut ähnelt. Permeationsuntersuchungen mit Testosteron [56], Aldosteron, Hydrokortison [98] und Corticosterone [99] bei humaner Haut weisen einen Permeationskoeffizienten in Bereich von  $0,4 \times 10^{-10}$  m/s bis  $3,76 \times 10^{-9}$  m/s auf. Diese Stoffe besitzen eine ähnliche Molekulargröße wie FN. Beim Vergleichen der Literaturwerte mit den Werten aus den *in vitro* hergestellten Vollhautmodellen lässt sich generell sagen, dass die Barriere der entwickelten Modelle sich noch stark von der realen Haut unterscheidet. Hier liegt ein Unterschied in der Größenordnung von 10 – 100 vor. Die Barriereigenschaften der Hautmodelle sind nicht so gut wie die der humanen Haut.

Es konnte bei den Untersuchungen mit Vollhautmodell 1 bestätigt werden, dass Stoffe mit einem größeren hydrodynamischen Radius langsamer durch das Modell wandern als kleinere. Die Theorie, dass größere Moleküle Poren verstopfen und den Reibungswiderstand erhöhen wird [91], könnte auch hier zutreffen. Dieses wurde auch in vorangegangenen Versuchen im Agarosegel festgestellt (siehe Kapitel 4.2).

Nun wird der Fokus auf das handelsüblichen Hautmodell EpiDerm™ gelenkt. Bei den Permeationsversuchen mit FN ist aufgefallen, dass der Permeationswert des EpiDerm™ Modells von Matek um zwei Exponenten niedriger liegt im Vergleich zu den selbst hergestellten Modellen. Dieses Hautmodell kommt somit vom Permeationsverhalten nahezu an das von richtiger Haut heran [56,98,99]. Ein möglicher Grund liegt wahrscheinlich in der Struktur der differenzierten Keratinozytenschichten. Es ist zu erkennen, dass das EpiDerm™-Modell im Vergleich zu Vollhautmodell 3 eine dichtere Keratinozyten-Struktur aufweist (vergleiche Abbildung 2.5 links mit Abbildung 5.6), welches sich im Permeationsverhalten widerspiegelt. Jedoch handelt es sich beim EpiDerm™ nicht um ein Vollhautmodell.

In einem weiteren Versuch sollte mit Vollhautmodell 3 untersucht werden, ob die Permeation sich während der Hautmodellkultur ändert. Hierbei ist gut zu sehen, dass die Permeation mit fortschreitender Kulturdauer abnimmt. Vergleicht man den abnehmenden Permeationskoeffizienten mit den histologischen Schnitten (siehe Abbildung 5.5 und Abbildung 5.6), so ist zu erkennen, dass sich die Keratinozyten zur Hornhaut differenzieren. Dadurch wird eine Barriere aufgebaut, welche die Diffusionsgeschwindigkeit von FN reduziert. Die Barriereigenschaften der Vollhautmodelle verschlechtern sich während der Kultivierung im 2OC. Bei der histologischen Auswertung war ersichtlich, dass die Epidermisschicht verschwindet. Die Ursache hierfür liegt in der Kultivierung im 2OC. Es wurde beobachtet, dass die Vollhautmodelle mit Medium überschwemmt waren, somit erfolgte die Kultivierung nicht in einer Luft-Flüssigkeitsphase. Da die Oberfläche des Vollhautmodells ständig in Flüssigkeit stand, wurde diese aufgeweicht.

Anhand dieses Versuches mit Vollhautmodellen konnte gezeigt werden, dass die Messmethode vielversprechend ist, die Permeation während der Kultivierung von Vollhautmodellen zu beurteilen. Diese könnte für die Herstellung von Hautmodellen eine mögliche zusätzliche Qualitätskontrolle darstellen. Eine derzeit häufig eingesetzte Methode, die Qualität von Hautmodellen zu prüfen, ist die TEER (*trans-epithelial electric resistance*) Messung [100–102]. Hierbei wird der elektrische Widerstand des Hautmodells bestimmt. Vom Projektpartner wurden die TEER Werte des Vollhautmodells 3 bestimmt [103] und es wurde festgestellt, dass die Streuung der Messwerte sehr hoch waren. Ein möglicher Grund liegt bei der Größe des Kultivierungssystems. Kleinere Abweichungen wurden beim MES mit größerem Durchmesser beobachtet. Hier scheint die Permeationsbestimmung eine geeignetere Lösung zu sein, da die Streuung hier geringer ist. Jedoch müssen auch bei dieser Methode die Vollhautmodelle abgeschlossen auf der Membran liegen, da die Substanz sonst vorbeidiffundiert.

Ein Problem bei der Vollhautmodell-Kultivierung war die Kontraktion. Die Modelle zogen sich im Laufe der Kultivierungszeit zusammen, wodurch die Membranfläche nicht mehr abgedeckt ist (siehe Abbildung 5.15). Eine mögliche Ursache für die Kontraktion sind die Fibroblasten in den Vollhautmodellen. Es ist ein bereits bekanntes Phänomen, dass Fibroblasten in Kollagen kontrahieren [104–106]. Diese Zellen sind in der Haut auch verantwortlich für die Narbenbildung.

Es konnte beobachtet werden, dass die Fibringelversiegelung eine leichte Verbesserung verschafft und die Kontraktion teilweise reduziert. Auch wurde herausgefunden, dass die Kontraktion abhängig ist vom Spender der Zellen.

Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass der systematische Fehler bei einige Versuchsdurchführungen mit bis zu 85 % Abweichung sehr hoch ist. Jedoch ist zu betonen, dass in der Regel der systematische Fehler sich zwischen 18 % bis 61 % bewegte. Der Grund für diese Abweichung liegt, wie schon erwähnt, bei der Kultur der Vollhautmodelle. Die Generierung der Vollhautmodelle erfolgte über eine Kultivierungszeitraum von bis zu 41 Tagen. Hierbei handelt es sich um lebendige Organismen, die die Entwicklung der Modelle beeinflussen. Angefangen bei der Aussaat der Zellen und der Beimpfung der Matrizen kann nicht garantiert werden, dass dieselbe Zellkonzentration in jedem Modell existiert. Weitere Fehlerfaktoren sind die erwähnten Kontraktionsprobleme und kleine systematische Abweichungen in dem 2OC, in dem die Permeationsversuche durchgeführt wurden.



Abbildung 5.15: Kontraktion der Vollhautmodelle in einen 96 Well MES. Dargestellt ist ein 96 Transwell® Streifen, worin die Vollhautmodelle kultiviert sind. Die Aufnahme erfolgt von unten. Zu sehen ist, dass die Vollhautmodelle nicht mehr die Membranoberfläche bedecken und sich im Laufe der Kultur kontrahiert haben. (Rote Pfeile zeigen die Kontraktionsrichtung)

Anschließend wurden der Glukoseverbrauch und die Laktatproduktion an Vollhautmodell 3 an drei verschiedenen Kultiverungspunkten bestimmt. Hierbei war auffällig, dass die Glukoseverbrauchsrate immer niedriger war als die Laktatproduktionsrate. Es wurde vermutet, dass die Zellen zusätzlich eine andere C-Quelle verbrauchen als Glukose. Bei einer weiteren Analyse des Aminosäuregehalts im Medium wurde festgestellt, dass das Glutamin während der Kultur abnimmt. Es ist möglich, dass die Energiegewinnung teilweise über die Glutaminolyse stattgefunden hat. Es ist bekannt, dass Fibroblasten auch Glutamin verstoffwechseln und es wird vermutet, dass die Epidermis bei Heilungsprozessen ebenso dieses Protein aufnimmt [83]. Eine Erklärung für den Effekt des höheren Glukoseverbrauchs am Ende der Kultivierung ist nicht trivial. Eine Begründung könnte darin liegen, dass der Metabolismus sich während der Kultur umstellt und die Zellen eher den Weg der Glykolyse bevorzugen als der Glutaminolyse. Ein anderer naheliegender Grund kann auch sein, dass diese Abweichung durch Messfehler entstanden sind. Dies benötigt noch genauere Untersuchungen. Jedoch scheint diese Methode sehr vielversprechend zu sein. Anhand der Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsdaten können sehr gute Vorhersagen getätigt werden, wann das Substrat verbraucht wird oder das Medium gewechselt werden muss. Gerade im 2OC bzw. anderen „Organ on a chip“-Systemen sind diese Information und Abschätzung sehr wichtig für die Kultur von Organismen. Des Weiteren kann man mittels dieser Messmethode auch die Konzentrationen von anderen Substanzen bestimmen, welches für die Substanzapplikation eine wichtige Rolle spielt.

Im letzten Versuch wurden Nanopartikel auf die handelsüblichen EpiDerm™ Modelle appliziert, um zu untersuchen, ob hier eine Permeation stattfindet. Die verwendeten Nanopartikeln in dieser Arbeit besitzen eine Größenordnung zwischen 2 bis 10 nm. Da diese Partikel kleiner als 20 nm sind besteht die Möglichkeit, dass sie in die Haut permeieren [15].

Anhand der Ergebnisse der Permeationsmessung konnte kein eindeutiges Durchdringen der Nanopartikel durch das Hautmodell detektiert werden. Es ist jedoch bekannt, dass QDots durch die Haut wandern können [107]. Dieses kann hier nicht eindeutig bestätigt werden. Durch die Fluoreszenzmessung mit einer Verdünnungsreihe der Nanopartikel ist zu sehen, dass die Messbarkeit ungefähr bei 1,23 % des maximal applizierten Volumens der Substanzen liegt. Das heißt die Konzentration unterhalb dieses Volumens kann nicht eindeutig detektiert werden. Somit kann es sein, dass geringe Nanopartikelmengen durch das Hautmodell permeieren, was leider nicht von der Messmethode erfasst werden kann. Ein ähnliches Phänomen ist bei der Messung von Rayman-Rasmussen et. al. in einer Franzdiffusionszelle mit QDot festgestellt worden [108]. Der Grund hierfür liegt an der zu schwachen Fluoreszenz der Substanz bei geringer Konzentration. Mit Hilfe der Kryoschnitte nach der Messung können die fluoreszierenden Nanopartikel mit dem Fluoreszenzmikroskop lokalisiert werden. Diese Methode eignet sich gut, um die Verteilung der Nanopartikel auf der Hautmodelloberfläche zu visualisieren. Auch hier konnte keine eindeutige Permeation der Nanopartikel festgestellt werden. Mit der HE Färbung können morphologische Änderungen der Hautmodelle sichtbar gemacht werden. Hier ist gut zu erkennen, dass die Hautmodelle im Langzeitversuch bei einigen Nanopartikeln stark aufquellen und morphologisch anders aussehen als die unbehandelte Probe. Auch der Vergleich zwischen einer Applikation und wiederholten Applikationen wiesen Unterschiede auf. Die lila gefärbte Zellschicht verschwindet beim längeren Versuch. Ein möglicher Grund liegt an der längeren Kulturdauer, wodurch die Zellschicht verhornt und verschwindet. Auffallend ist auch, dass das Modell bei CdT und CQD aufgequollen ist. Diese Nanopartikeln wurden in destilliertem Wasser gelöst, was vielleicht die Ursache für das Quellen ist. Die hier genutzte Methode (Fluoreszenzmikroskopie und HE Färbung) eignet sich sehr gut in Langzeitversuchen den Einfluss von Nanopartikeln auf der Haut zu untersuchen. Hier liegt der Vorteil, wie bereits erwähnt, darin, dass in einem kleinen System gearbeitet wird und somit weniger Material benötigt wird und daraus resultierend weniger Kosten anfallen.

# 6 Numerische Simulation

Mit Hilfe der numerischen Simulation soll die Messmethode unterstützt werden. Diese soll die Diffusionskoeffizienten *in situ* errechnen, welche nicht trivial rechnerisch zu ermitteln sind. Des Weiteren wird die Simulation genutzt, um Messergebnisse vorauszusagen. Verschiedene physikalische Effekte sollen mit Hilfe der Simulation numerisch quantifiziert werden.

## 6.1 Ergebnis der numerischen Simulation

Im folgenden Kapitel wird zunächst die Simulation des MES genauer analysiert. Hierbei wird die Permeation von verschiedenen Partikelgrößen simuliert und anhand von FN wird beispielhaft eine Langzeitsimulation durchgeführt. Anschließend werden die physikalischen Vorgänge bei der Permeation von verschiedenen großen MES untersucht. Es folgen dann die Simulationen der 2OC Versuche und mit Vollhautmodel 3. Zum Schluss folgt die Simulation der Verstoffwechslung von Glukose und Laktat im MES.

### Simulation des Permeationsversuchs im MES

Mit COMSOL Multiphysics wurde der Permeationsversuch im 96 Well MES simuliert. Die Diffusionskoeffizienten wurden mit dem „*Optimization*“ Modul ermittelt. In der Tabelle 6.1 sind die Parameter der optimierten Diffusionskoeffizienten, Anzahl der Proben und die daraus resultierenden Standardabweichungen aufgelistet. Es ist zu sehen, dass die Diffusionskoeffizienten die gleiche Tendenz aufweisen wie die Permeationskoeffizienten. Der Wert nimmt mit größer werdendem Molekulargewicht ab. Bei FN liegt der Diffusionskoeffizient bei einem Wert von  $1,94 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  und sinkt bis auf einen Wert von  $0,14 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  bei FD40.000 (vergleiche mit Tabelle 4.3). Da jeder Wert simuliert wurde, konnte eine Standardabweichung ermittelt werden. Diese liegt bei einem Wert zwischen 0,02 bis  $0,34 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ .

Die Anpassung der Diffusionskoeffizienten über die Simulation erfolgte mit Messdaten. Um zu prüfen, ob die ermittelten Koeffizienten mit dem Experiment übereinstimmen, wurde der Versuch aus Kapitel 4.1 c) simuliert. Die Diagramme in der Abbildung 6.1 zeigen den

Vergleich zwischen experimentellen und simulierten Ergebnissen. Zu erkennen ist, dass bei den Substanzen FN und FD 4000 noch recht gute Übereinstimmungen zwischen den experimentellen und simulierten Werten existieren (siehe Abbildung 6.1 a) und b)). Die experimentellen Werte (schwarze Punkte) liegen nahezu auf dem simulierten Graphen (rote Linie). Die Übereinstimmungen zwischen Experiment und Simulation nimmt bei Substanzen mit größeren Molekülen ab (siehe Abbildung 6.1 c) – e)). Entgegen der Annahme der Fickschen Diffusion nimmt die Permeation der experimentellen Werte im Verlauf schneller zu und flacht früher wieder ab. Die Substanzen permeieren somit anfangs schneller durch das Agarosegel und die Diffusion nimmt im Laufe des Versuches schneller wieder ab. Beim Vergleich der ermittelten Permeationskoeffizienten zwischen Experiment und Simulation gab es eine Anpassgüte von 0,99 für FN, 0,97 für FD 4000, 0,74 für FD 10 000, 0,92 für FD 20 000 und 0,78 für FD 40 000. Die Anpassgüte spiegelt hier die Beobachtungen wieder. Generell beschreibt die Simulation die experimentellen Werte bei kleineren Molekülen besser als bei großen. Eine Ausnahme ist hier FD 20.000.

Tabelle 6.1: Diffusionskoeffizient aus der Simulation mit Parameteroptimierung. Es wurden die Werte aus dem Permeationsversuch in Tabelle 4.3 verwendet.

Permeat	Diffusionskoeffizient [ $\times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ ]	STABW [ $\times 10^{-10} \text{ m/s}$ ]	Anzahl der Proben [N]
FN	1,94	0,34	1x3
FD4.000	0,65	0,12	1x3
FD10.000	0,22	0,02	1x3
FD20.000	0,29	0,04	1x3
FD40.000	0,14	0,02	1x3

Eine visuelle Darstellung der Simulation ist in der Abbildung 6.2 zu sehen. Die Konzentrationsabnahme von FN im Donator zu drei verschiedenen Zeitpunkten wurde farblich visualisiert. Zunächst befindet sich 0,1 mg/ml FN im Donator (siehe Abbildung 6.2 links, 0,28 h in rot). An den Donator grenzt das konkav geformte Gel, worin sich eine Konzentrationsbarriere bildet. In dunkel blau ist der Akzeptor, also das Volumen in der *receiver* Platte, zu sehen. Über die Zeit (siehe 10 h und 20 ) verändert sich der Farbverlauf über grün gelb auf türkis, was eine Konzentrationsabnahme von FN. visualisiert (siehe Abbildung 6.2 Farbskala). Es ist auch zu erkennen, dass die Konzentrationsbarriere im Gel sich weiter nach unten verlagert und an Kontrast abnimmt.

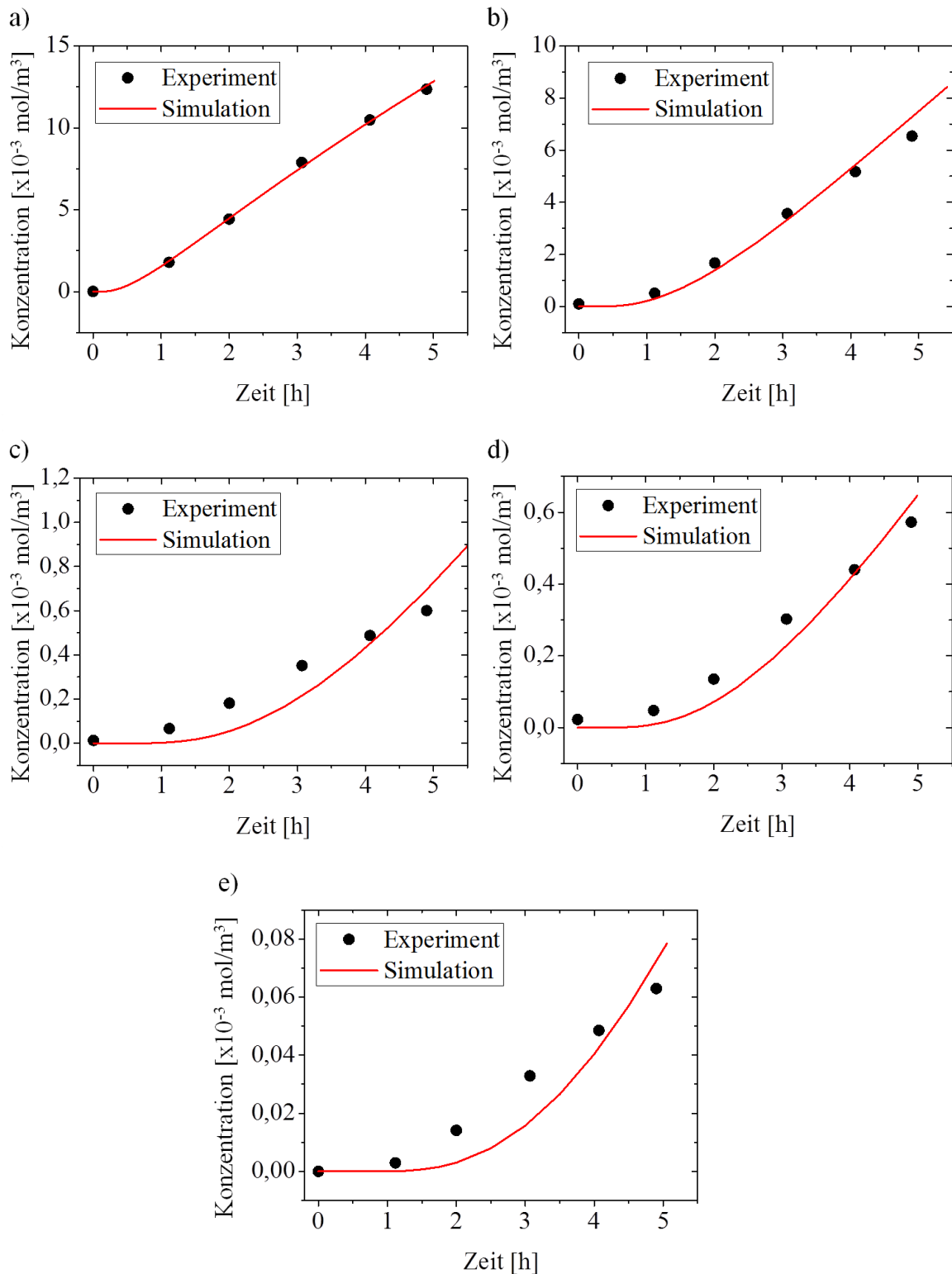


Abbildung 6.1: Vergleich der experimentellen Daten aus dem Permeationsversuch in einem 96 Well MES mit der Optimierungssimulation. Untersucht wurden verschiedene Substanzen durch 2 % Agarosegel: a) Fluorescein Natrium (0,1 mg/ml), b) FD 4 000, c) FD 10 000, d) FD 20 000 und e) FD 40 000 (4 mg/ml) (FD = fluorescein isothiocyanate-dextran).

## 6. Numerische Simulation

Eine Grundidee der Simulation bestand darin, einen Langzeitversuch vor der experimentellen Umsetzung zunächst numerisch durchzuführen. Anhand von FN wurde der Permeationsversuch in Langzeit durchgeführt, um zu prüfen, wann ein Konzentrationsausgleich eintritt. In der Simulation wurden Messsonden im Akzeptor und Donator definiert, welche die Mittelwerte der Konzentration über die Zeit ermitteln. In Abbildung 6.3 ist die Simulation der Permeation von FN durch Agarosegel in einem Zeitrahmen von bis zu 80 Stunden zu sehen. Die Donatorkonzentration liegt zum Zeitpunkt 0 h bei einem Wert von  $0,26 \text{ mol/m}^3$  ( $0,1 \text{ mg/ml}$ ) und nimmt über die Zeit kontinuierlich ab, während die Konzentration im Akzeptor zum Zeitpunkt 0 h bei  $0 \text{ mol/m}^3$  liegt und mit der Zeit zu nimmt. Bei ungefähr 80 h erreichen die Konzentrationen ein Gleichgewicht bei einem Wert von  $0,05 \text{ mol/m}^3$  ( $0,02 \text{ mg/ml}$ ).

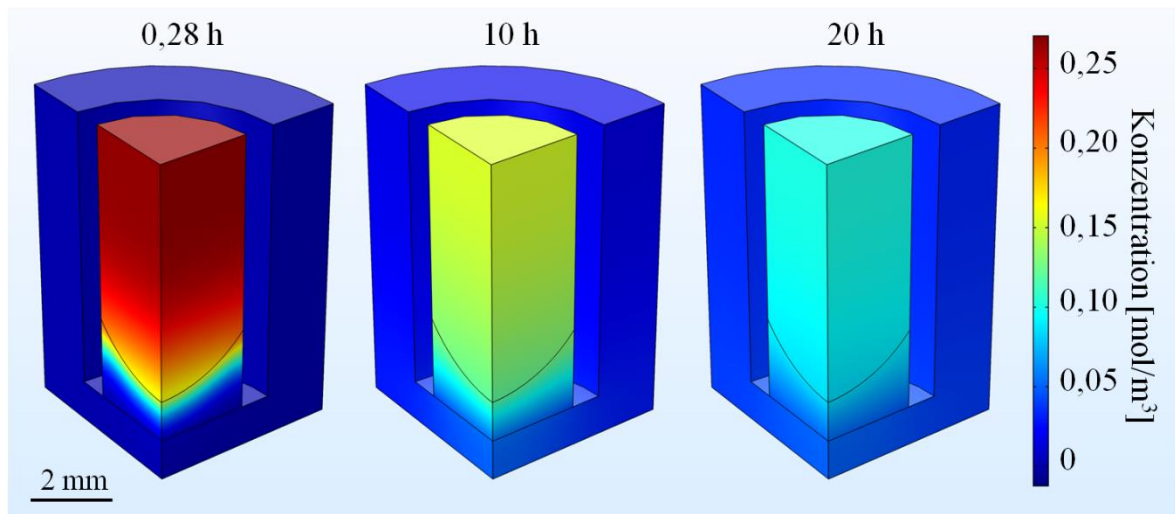


Abbildung 6.2: Simulation der Diffusion von Fluorescein Natrium ( $0,1 \text{ mg/ml}$ ) durch 2 % Agarosegel. Dargestellt ist die Konzentrationsverteilung in einem 96 Well MES (1/4 der Geometrie) zu den Zeitpunkten 0,28 h, 10 h und 20 h.

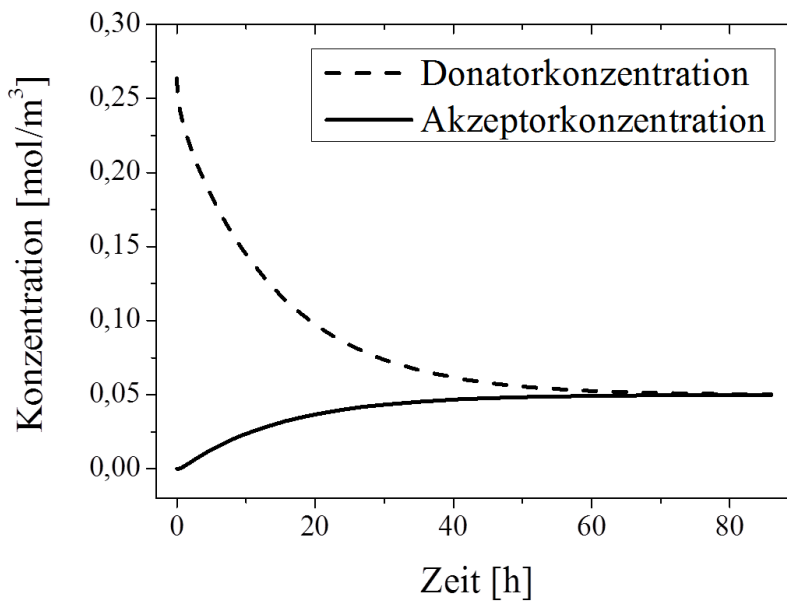


Abbildung 6.3: Donator- und Akzeptorkonzentration über die Zeit bei einer Simulation von FN (0,1 mg/ml) durch 2 % Agarosegel in einem 96 TW System.

### Simulation der Diffusion in verschieden großen MES

Im Kapitel 4 wurde festgestellt, dass die Größe des MES einen Einfluss auf die Permeationsgeschwindigkeit besitzt. Dieses Phänomen soll mit Hilfe der Simulation genauer untersucht werden. Hierfür wurde der Permeationsversuch mit FN durch 2 % Agarosegel in einem 12 und 96 Well MES simuliert. In Abbildung 6.4 ist die Konzentration im Akzeptor der beiden Well-Größen über der Zeit dargestellt.

Beide Graphen zeigen unterschiedlich steile Anstiege der Konzentration. Auf Grund verschiedener Volumina erfolgt der Ausgleich auch bei verschiedenen hohen Akzeptorkonzentrationen,  $0,057 \text{ mol/m}^3$  für 12 Well MES und  $0,047 \text{ mol/m}^3$  für 96 Well MES. Die Gleichgewichtskonzentration wird in beiden Fällen nach ungefähr 80 h erreicht. Die Permeation in dem 96 Well MES erfolgt somit mit einer leicht erhöhten Beschleunigung im Vergleich zu 12 Well MES. In Kapitel 4.2 wurde vermutet, dass ein Konzentrationsgradient im System für diesen Unterschied verantwortlich ist. In der Simulation wurde hierfür die Konzentrationsverteilung zwischen Boden und Membran untersucht.

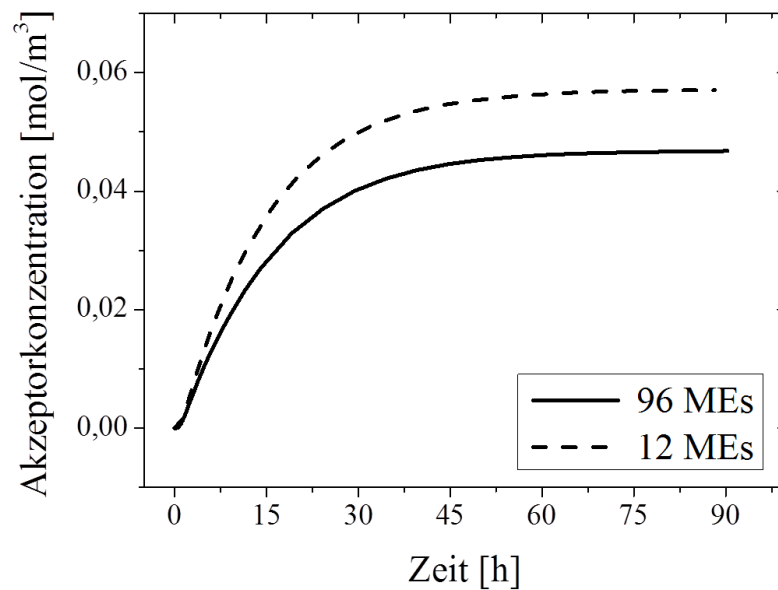


Abbildung 6.4: Simulation des Permeationsversuchs mit FN (0,1 mg/ml) durch 2 % Agarosegel in einem 12 und 96 Well MES. Die gemittelte Akzeptorkonzentration ist über der Zeit aufgetragen.

Es wurden die simulierten Konzentrationsverläufe über die Bodenlänge zu verschiedenen Zeitpunkten aufgetragen. Die Bodenlänge ist die Strecke vom Mittelpunkt des MES zum Rand. Die Höhe dieses Strahles wurde bei 0,5 mm über der Bodenfläche definiert. In beiden Diagrammen (siehe Abbildung 6.5 a) und b)) nimmt die Konzentration zu jedem dargestellten Zeitpunkt vom Mittelpunkt zum Rand ab. Der Verlauf der Kurve ist in dem 96 Well MES weniger steil im Vergleich zum 12 Well MES. Daraus resultiert ein geringerer Konzentrationsausgleich im 96 Well MES, wodurch die Diffusionsgeschwindigkeit reduziert wird. In dem 12 Well MES ist ein größerer Gradient zwischen Mitte und Rand des TWs zu sehen. Hier verteilt sich die Substanz schneller im System. Dieser Sachverhalt ist auch aus der vorangegangenen Untersuchung sehr gut ersichtlich. Der Permeationskoeffizient im 96 Well MES war niedriger als im 12 Well MES (siehe Tabelle 4.1).

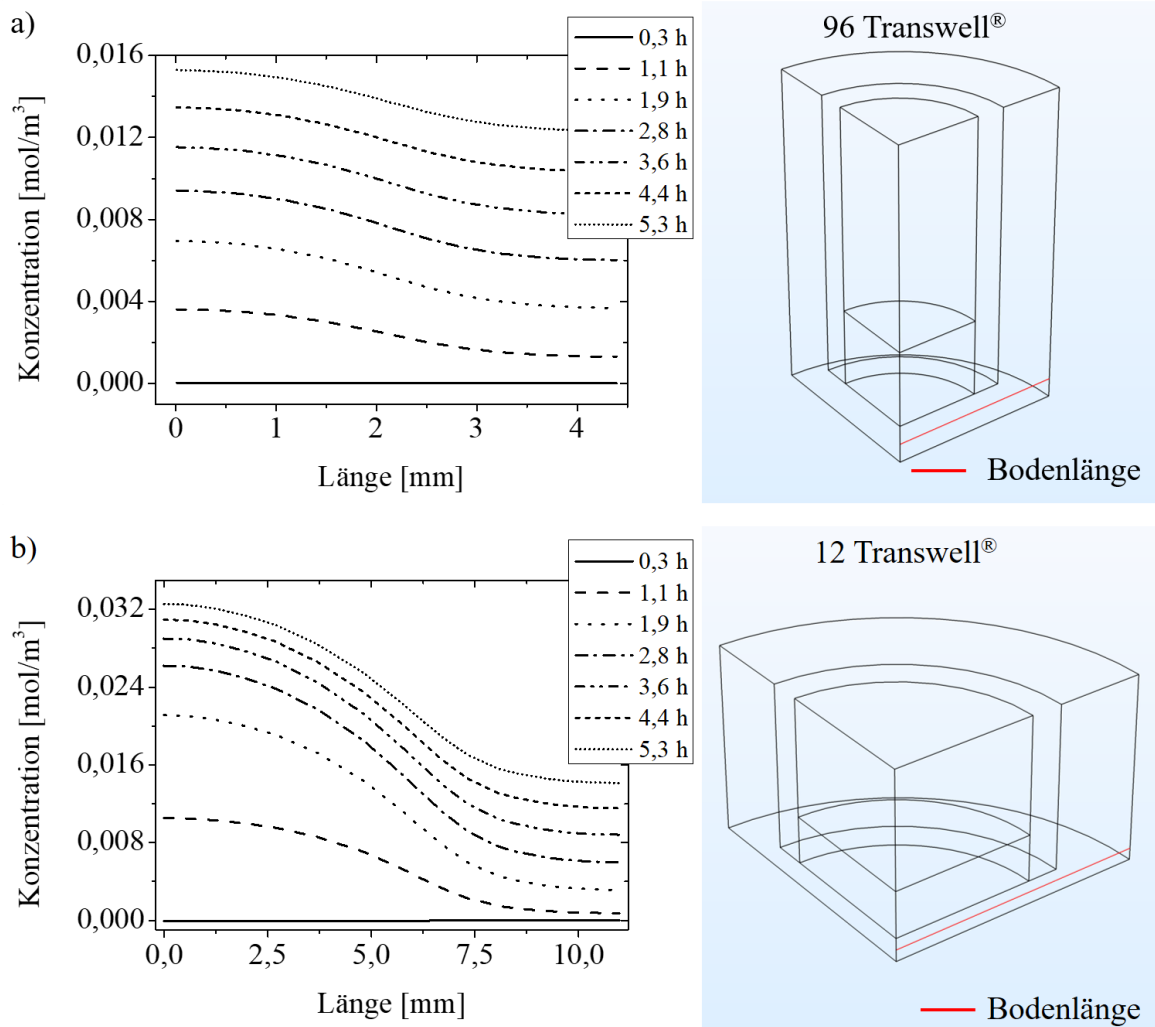


Abbildung 6.5: Konzentrationsverlauf über die Bodenlänge zu verschiedenen Zeitpunkten in einem a) 96 Well MES und b) 12 Well MES System. Der Bodenlänge ist 0,5 mm über der Bodenfläche und von Rand zu Mittelpunkt (0 mm) definiert (siehe rechts). Es wurde der Permeationsversuch mit 0,1 mg/ml FN. durch 2 % Agarose simuliert.

### Simulation der Permeationsversuche im 2OC

Im Folgenden sollen die Permeationsversuche im 2OC mittels COMSOL Multiphysics simuliert werden. Hierfür wurde die Fluidsimulation im Kanal mit der Diffusionssimulation gekoppelt. In der Abbildung 6.6 ist das Ergebnis dargestellt. Die roten Pfeile beschreiben die Richtung der Konzentrationsgradienten. Es ist zu erkennen, dass, wie erwartet, FN vom Akzeptor durch das Gel in den Flusskanal permeiert und sich in Fließrichtung (im Uhrzeigersinn) bewegt. Die Strömungslinien sind in Weiß dargestellt und veranschaulichen die Bewegung des Fluids. Zusätzlich sieht man am Boden des Flusskanals farblich die

Konzentration der Substanz. Die Konzentration sammelt sich zu Beginn der Simulation (100 s) direkt unter dem Gel, welches an Hand der Rotfärbung gut sichtbar ist.

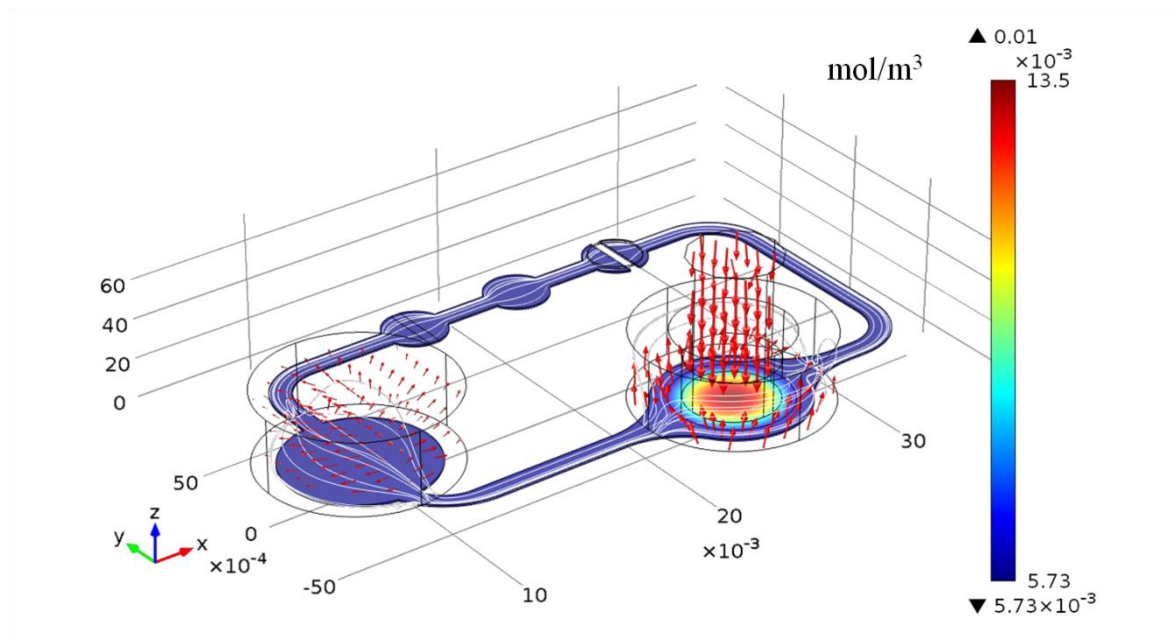


Abbildung 6.6: Simulation des Permeationsversuchs von FN durch Agarosegel in 20°C. Rote Pfeile: Diffusionsgeschwindigkeit; weiße Linien: Fluidströmung (nach 100 s).

Zur Validierung wurde die Simulation mit den Ergebnissen aus den Permeationsversuchen aus Kapitel 4.1 verglichen. In Abbildung 6.7 sind die experimentellen und simulierten Ergebnisse aus dem 20°C Versuch in einem Diagramm dargestellt. Es wurde die Konzentration über der Zeit auf einem Diagramm dargestellt, wobei die Simulation mit und ohne Fluidfluss durchgeführt wurde. Die Fläche zwischen diesen beiden Verläufen wurde grau unterlegt (siehe Abbildung 6.7). Beim Vergleich zwischen Simulation und Experiment ist zu sehen, dass fast alle Werte in der grauen Fläche liegen. Der Messwerte von 20°C 7 liegen geringfügig außerhalb des Simulationsbereiches. Nichtsdestotrotz kann gesagt werden, dass die Simulation die Diffusionsvorgänge im 20°C in einem bestimmten Bereich abdecken kann.

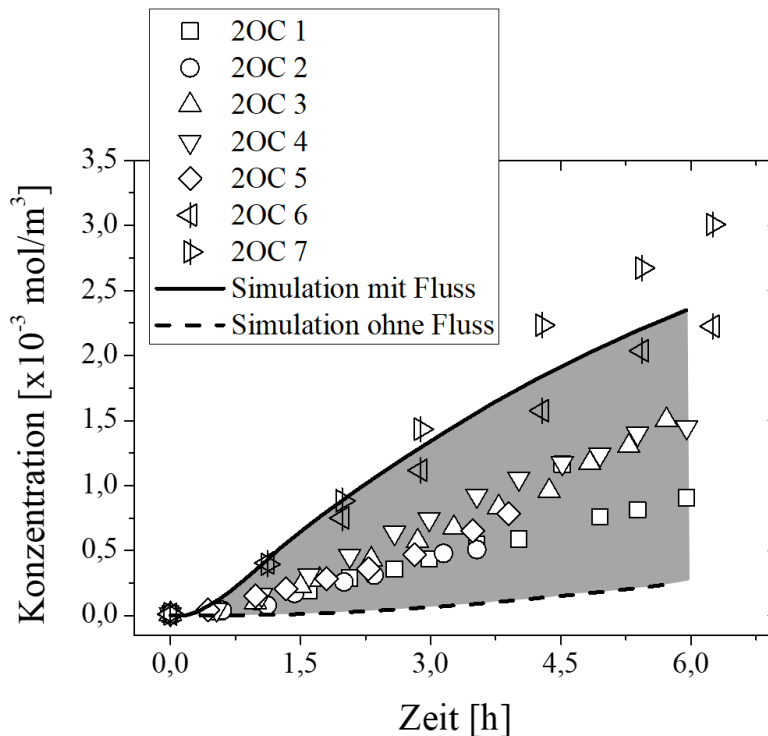


Abbildung 6.7: Simulation des Permeationsversuchs mit FN durch 2 % Agarosegel mit und ohne Fluidfluss und Vergleich zu den Versuchswerten in sieben 2OC Kreisläufen.

### Parameteroptimierung im 2OC

Es wurde nun gezeigt, dass es möglich ist, die Permeation sowie die Fluidströmung in einem 2OC zu simulieren. Des Weiteren wurde herausgefunden, dass eine Parameteroptimierung in einem 96 Well MES durchführbar ist, um die Diffusionskoeffizienten zu bestimmen. Im Folgenden sollen die Diffusionskoeffizienten aus dem Versuch mit Vollhautmodell 3 (siehe Kapitel 5.1) numerisch ermittelt und mit den experimentellen Ergebnissen verglichen werden. Im Vergleich zur Parameteroptimierung des 96 Well MES sind hier mehrere physikalische Parameter zu simulieren. Hierfür nimmt die Simulationszeit enorm zu (fast zehnfach so lang). Aus diesem Grunde wurde nur der Mittelwert aus dem Versuch im Kapitel 5.1 für die Parameteroptimierung genutzt.

Ein Diffusionskoeffizient von  $20,45 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$  wurde mit der Simulation für das Vollhautmodell in *submerge* Kultur angepasst. Der Wert sinkt am Tag 19 auf  $4,41 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$  ab. Nach einer Woche Kultur wurde ein Diffusionskoeffizient von  $2,55 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$  ermittelt, welcher am Tag 29 etwas ansteigt auf einen Wert von  $2,88 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ . Der Koeffizient sinkt weiter ab bis auf einen Wert von  $1,65 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$  am Tag 43. Ähnlich wie bei den Permeationskoeffizienten (siehe Tabelle 5.4) konnte hier ein proportionales Verhalten der Kultivierungsdauer zu den Diffusionskoeffizienten beobachtet werden. Mit zunehmender

Kultivierungsdauer nahmen die Diffusionskoeffizienten ab. Es wurden die Anpassgüten ermittelt, um die Simulation zu quantifizieren. Die Anpassgüte besitzt am Tag 12 einen Wert von -19,15. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass der Mittelwert in diesem Fall die experimentellen Werte besser beschreibt als die Simulation. Je länger die Kultur des Vollhautmodells fortschreitet, desto besser wird die Anpassgüte und der Parameterwert ist ungefähr 1. Am Tag 43 liegt der Wert bei 0,98. Somit lässt sich schlussfolgern, dass die Simulation sich an die experimentellen Werte annähert und sich immer besser an die experimentellen Werte anpasst. Der Zusammenhang zwischen Experiment und Simulation wurde auf Abbildung 6.8 beispielhaft dargestellt. Es ist gut zu erkennen, dass die Simulation im Versuch am Tag 19 die Messwerte nicht trifft. Die Kurve fängt viel flacher an und steigt rapide an. Am Tag 43 ist eine sehr gute Übereinstimmung zwischen experimentellen Messwerten und Simulation zu erkennen.

Tabelle 6.2: Diffusionskoeffizient aus der Parameteroptimierung und die Anpassgüte. Es wurden die Werte aus dem Permeationsversuch mit Vollhautmodell 3 verwendet.

Zeit	Diffusionskoeffizient [ $\times 10^{-11}$ m/s]	Anpassgüte [/]
12 Tage (submerge, ohne Fibrin)	20,45	-19,15
19 Tage (submerge)	4,41	0,32
26 Tage (air lift)	2,55	<0,01
29 Tage (air lift)	2,88	0,49
36 Tage (air lift)	2,66	0,83
43 Tage (air lift)	1,65	0,98

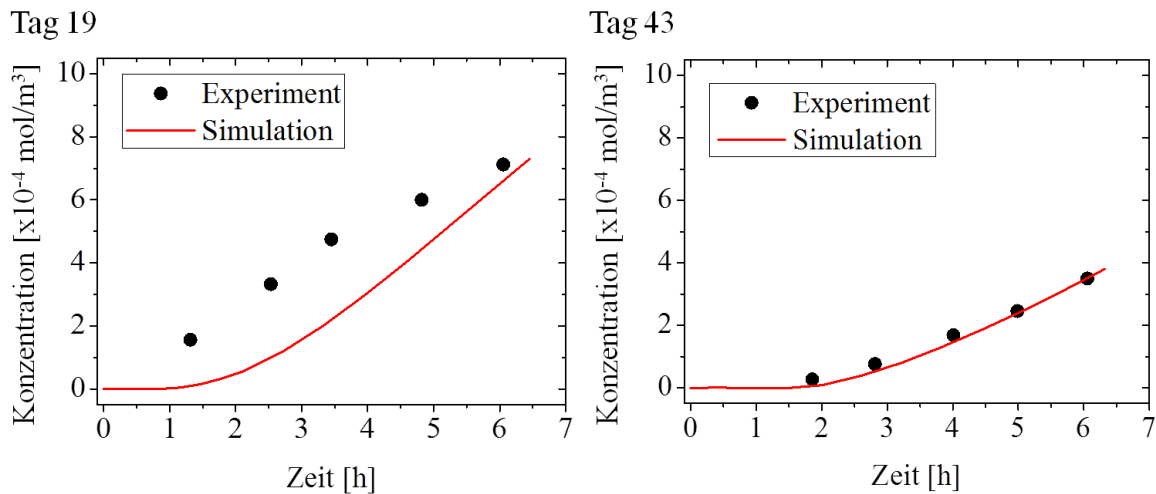


Abbildung 6.8: Vergleich der Simulation und Permeationsversuche. Das Diagramm zeigt die Donatorkonzentration über der Zeit. Die Permeation von FN durch Vollhautmodell 3 am Kultivierungstag 19 und 43 wurden beispielhaft dargestellt. Die Diffusion wurde mit der numerischen Simulation angepasst.

### Simulation des Glukoseverbrauchs und der Laktatproduktion im 96 Well MES

In vorangegangenen Experimenten wurde der Glukoseverbrauch und die Laktatproduktion von einem Zellmodell in 96 Well MES bestimmt (siehe Kapitel 4.1). Hierfür wurden die in Tabelle 4.6 dargestellte Glukoseverbrauchsrate und Laktatproduktionsrate in die chemische Reaktion integriert. In Abbildung 6.9 sind die experimentellen Werte und die Simulation in einem Diagramm aufgetragen. Es ist zu beobachten, dass der Verlauf der simulierten Graphen sich ähnlich verhält wie die experimentell ermittelten Werte. Die Glukosekonzentration nimmt über die Zeit ab und die Laktatkonzentration zu. Auffallend ist, dass die Versuchsdaten etwas höher liegen als die Simulierten. Der Offset beträgt zwischen Simulation und Experiment einen Wert ungefähr  $1,07 - 1,08 \text{ mol/m}^3$ . Letztendlich kann gesagt werden, dass die Simulation die experimentellen Werte recht gut darstellen kann.

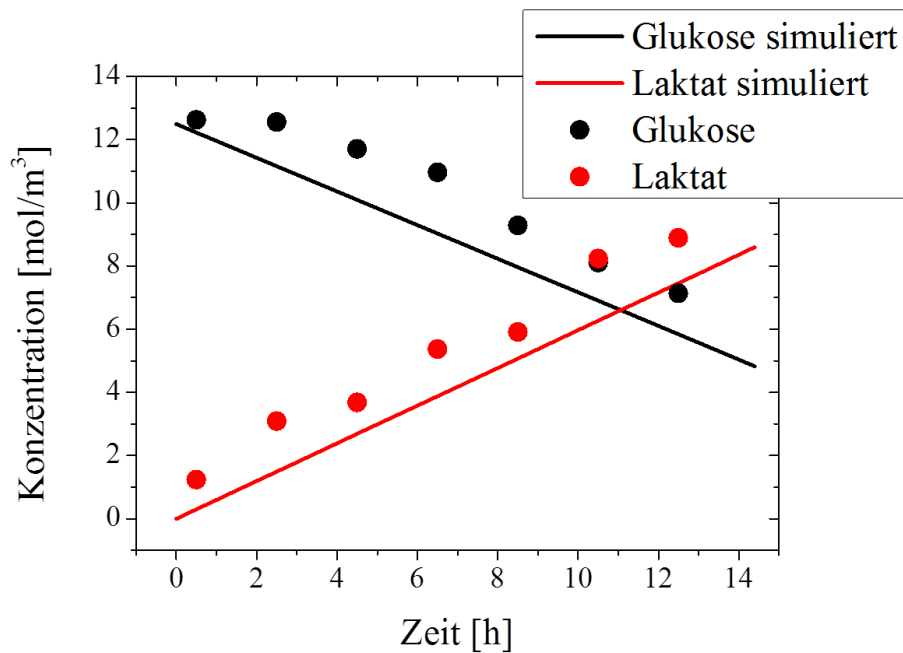


Abbildung 6.9: Simulation des Glukoseverbrauchs und Laktatproduktion eines Zellmodells in einem 96 Well MES. Für die Simulation wurden aus dem Experiment ermittelte Verbrauchs- und Produktionsraten verwendet.

## 6.2 Diskussion der Simulation

Bisher wurde in Kapitel 4 und 5 über Permeation gesprochen. Dieser Parameter ist eine vereinfachte Darstellung der Diffusion, da die Stoffwanderung nur über das gesamte System hinweg betrachtet wird. Die Diffusion wird im 2OC von mehreren Parametern beeinflusst und lässt sich nicht trivial mit einer Formel geometrisch annähern [55]. Aus diesem Grund wurde eine Simulation zum Versuch durchgeführt. Diese soll den Diffusionskoeffizienten mittels Parameteranpassung annähern. Des Weiteren soll die Simulation ermöglichen, das physikalische Verhalten des Versuches besser zu untersuchen und auch Parameter zu ändern, ohne das Experiment wiederholen zu müssen. Durch die Modularität der Simulation können die ermittelten Parameter aus dem Versuch auch auf ein komplexeres Problem übertragen werden.

Mit Hilfe der Parameteranpassung kann über die Simulation der Diffusionskoeffizient aus den Permeationsversuchen im MES ermittelt werden. Bei kleinen Molekulargewichten von 376 MW (FN) bis 4.000 MW (FD4.000) konnte eine gute Übereinstimmung von experimentellen Daten und Simulation identifiziert werden. Bei größeren Molekülen weicht die Simulation von den experimentellen Werten ab. Wie bereits in Kapitel 4.2 erwähnt, können die langkettigen Polysaccharide die Poren des Gels verschließen und damit die

Reibung erhöhen [91]. Dieser Effekt führt zu einer anormalen Diffusion [77], welche nicht mit dem herkömmlichen Fick'schen Gesetz beschrieben werden kann. Bei der Parameteranpassung von Vollhautmodell 3 konnten ähnliche Effekte beobachtet werden. Hier permeiert FN schneller durch das noch nicht voll ausgebildete Hautmodell als durch das differenzierte. Eine mögliche Ursache hierfür könnte an dem Permeationsversuch im 2OC liegen. Die Permeation wurde in einem durchströmten System gemessen. Die Fluidströmung kann die Permeation der Substanz beschleunigen, wodurch ebenso eine anormale Diffusion auftritt.

Ein Ansatz, die Simulation auch an die anormale Diffusion anzupassen, ist es, die Gleichung basierend auf dem Fick'schen Gesetz wie folgt zu erweitern:

$$D(t) = K_{\alpha} t^{\alpha-1} \quad 6.1$$

$\alpha$  ist der anormale Diffusionsexponent. Ist dieser Wert größer als Eins, so handelt es sich hier um eine Superdiffusion. Bei einem Wert kleiner als Eins ist es eine Subdiffusion (siehe Abbildung 2.10).  $K_{\alpha}$  ist eine Konstante, welche die Diffusion im normalen Zustand ( $\alpha = 1$ ) beschreibt [55,109]. Integriert man diese Gleichung in die Simulation, so kann auch die Diffusion von größeren Partikeln angepasst werden. In Abbildung 6.10 ist ein Beispiel mit FD40.000 zu sehen. Es ist zu erkennen, dass die Simulation mit anormaler Diffusion die experimentellen Daten besser beschreibt als die normale Diffusion nach dem Fick'schen Gesetz. Ein Nachteil dieses Ansatzes ist, dass zwei Parameter mit Hilfe der Simulation angepasst werden müssen, wodurch sich die Rechenzeit fast verdoppelt.

Ein weiterer interessanter Punkt für Anwendung von Simulationen ist das Analysieren von physikalischen Phänomenen im Experiment. In den Versuchen wurde festgestellt, dass die Permeation von FN im 12 Well MES schneller verläuft als im 96 Well MES (siehe Kapitel 4.1). Eine Vermutung für diesen Unterschied ist die Geometrie und damit zusammenhängende Konzentrationsverteilung im System. Mit Hilfe der Simulation konnte genau diese Vermutung bestätigt werden. Es war möglich, die Konzentrationsverteilung an verschiedenen Positionen im System zu betrachten, um dadurch festzustellen, dass die Konzentration im größeren System sich schneller verteilt als im kleineren System. Man sollte jedoch immer im Hinterkopf behalten, dass die Simulation einen Idealzustand abbildet. In der Realität könnten weitere Nebeneffekte auftauchen, die in der Simulation nicht berücksichtigt werden.

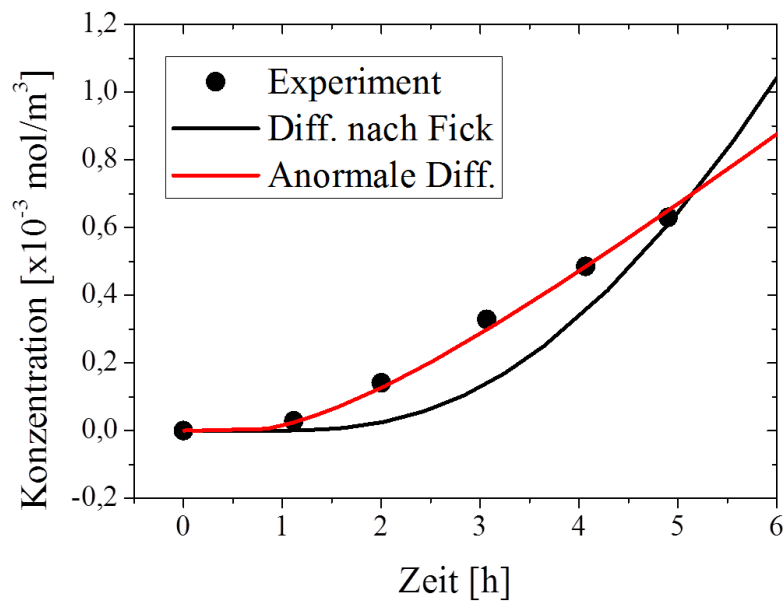


Abbildung 6.10: Simulation des Permeationsversuchs mit FD40.000 durch 2 % Agarosegel. Es wurde mit der Diffusion nach Fickschem Gesetz simuliert (schwarze Linie) und mit der anormalen Diffusion (rote Linie).

Des Weiteren ist es möglich, mit Hilfe der Simulation Langzeitergebnisse vorherzusagen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ermittelt werden, dass Permeationsuntersuchungen mit einer Versuchsdauer von 5 Stunden ausreichend waren, um die Diffusionskoeffizienten zu ermitteln. Aus einem Permeationsversuch mit 0,1 mg/ml FN durch 2 % Agarosegel hat sich ergeben, dass sich ein Gleichgewichtszustand nach ungefähr 3 Tagen einstellt. Der Versuch wurde anschließend in der Simulation durchgeführt. Hier wurde eine Zeit von 3,33 Tage ermittelt, bei einer Rechenzeit von ungefähr 20 – 30 min. Somit liegen Versuch und Simulation in ähnlicher Größenordnung. Es konnte anhand dieses Beispiels gezeigt werden, dass mit Hilfe der Simulation die Versuchsdauer reduziert werden kann. Es ist möglich, kurze Versuche durchzuführen, um Startparameter für die Simulation zu generieren und diese dann zu benutzen, um Langzeitversuche zu simulieren.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit ist die Erweiterung der Simulation auf ein komplexeres System. Auf Grund der Modularität von COMSOL Multiphysics konnte die Simulation im MES auf dem 2OC erweitert werden. Es wurden die ermittelten Diffusionskoeffizienten aus dem MES Versuch (mit FN durch 2 % Agarosegel) in die 2OC Simulation übernommen und das Ganze mit dem Fluidfluss-Modul erweitert. Hier sind Abweichungen zwischen Experiment und Simulation zu erkennen. Es wurde festgestellt, dass die experimentellen Werte generell unter dem simulierten Konzentrationsverlauf liegen (siehe Abbildung 6.7). Eine mögliche Ursache liegt darin, dass in Simulationen immer

Vereinfachungen getroffen werden. Der Fluidstrom wurde als konstant angenommen. Im 2OC Kanal fließt jedoch der Fluidstrom pulsartig und es wurde in Vorversuchen gezeigt, dass zeitweise auch ein kurzer Rückfluss existiert [45]. Diese Fluidcharakteristik kann die Ursache dafür sein, dass der Substanztransport im realen System etwas langsamer verläuft als in der Simulation. Eine zweite Ursache für die Abweichung liegt möglicherweise auch darin, dass die Simulation von einer idealen Diffusion und idealem Fluss ausgeht. In der Realität hat jeder 2OC leichte Abweichungen auf Grund der teilweise händischen Anfertigung und weicht somit von dem Idealzustand ab. Nichtsdestotrotz liegen die Versuchswerte im Bereich der Simulation.

Die Simulation der Permeationsversuche im MES wurde mit den experimentellen Werten verglichen (siehe Abbildung 6.1). Dieses stellt jedoch in diesen Fall keine direkte Validierung dar. Wegen der Parameteroptimierung wird ein Wert mittels der Simulation an das experimentelle Ergebnis angepasst. Das heißt, dass die Ausgabedaten aus der Simulation von den Eingabedaten des Versuchs abhängig sind. Würde man die Simulation mit dem Versuch vergleichen, so entsteht ein sogenanntes „*double validation problem*“ [110], wodurch man quasi die Simulation mit sich selbst validiert. In dem Fall, wo die Simulation des 2OC mit den experimentellen Werten verglichen wurde (siehe Abbildung 6.7), handelt es sich um eine indirekte Validierung. Es wurde ein Permeationsexperiment durchgeführt, mit Hilfe der Daten wurde der Diffusionskoeffizient simuliert. Diese Werte wurden dann auf eine komplexere Simulation mit 2OC übertragen und anhand eines weiteren Versuches wurde anschließend die Simulation verglichen (siehe Abbildung 6.11). Da hier eine Transformation der Simulation stattgefunden hat, welche mit einem weiteren Versuch verglichen wurde, kann hier von einer Validierung gesprochen werden.

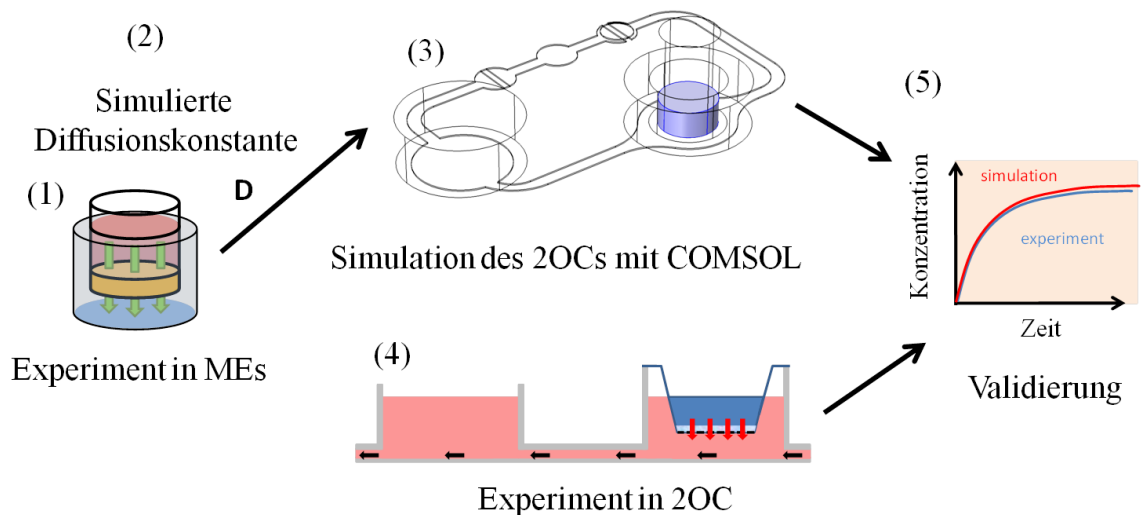


Abbildung 6.11: Indirekte Validierung der Diffusions- und Strömungssimulation im COMSOL Multiphysics. (1) Aus einem Permeationsversuch im Transwell System wurden experimentelle Daten ermittelt. (2) Mit Hilfe der Simulation wurde ein Diffusionskoeffizient optimiert. (3) Dieser Koeffizient wurde in die Simulation des 2OC übernommen. (4) Es wurden Permeationsversuche im 2OC durchgeführt. (4) Für die indirekte Validierung wurde der experimentelle Wert der 2OC mit der Simulation verglichen.

Im letzten Schritt wurde der Metabolismus im 96 Well MES simuliert. Hierfür wurden die Geometrie und die ermittelten Versuchsparameter direkt in die Simulation integriert. Der leichte *off-set* zwischen der Simulation und den experimentellen Werten kommt wahrscheinlich durch leichte Abweichungen in der Konzentration der Substanzen zustande. Ursache hierfür könnten Ungenauigkeiten beim Pipettieren oder auch Ansetzen der Substanzen sein. Außerdem können Abweichungen in den Zellmodellen bestehen, was die Schwankungen der Messergebnisse verdeutlicht. Beim Glukosegehalt des Mediums wurde die Herstellerangabe verwendet, auch hier können Ungenauigkeiten und Abweichungen auftreten. Des Weiteren kann auch die Simulation das Problem sein, da sie von einem Idealzustand ausgeht und in der Realität noch weitere unbekannte Randbedingungen existieren. Nichtsdestotrotz gibt es eine recht gute Übereinstimmung zwischen Simulation und Versuch. Im Vergleich zum 2OC wurden hier keine Werte in der Simulation generiert, womit das System auch direkt validiert ist.

## 7 Fazit und Ausblick

Es ist im Rahmen dieser Arbeit gelungen, eine Methode zu etablieren, um die Permeationskoeffizienten von Hautmodellen in kleinen 96 Well MES zu bestimmen. Aus den Voruntersuchungen ist hervorgegangen, dass die Einflussfaktoren wie Porengröße der Membran, Größe des MES und verschiedene Molekulargrößen der Applikationssubstanz einen Einfluss auf die ermittelten Permeationskoeffizienten besitzen. Beim Beachten dieser Parameter ist es möglich, reproduzierbare Ergebnisse zu erreichen. Der methodische Fehler ist mit bis zu ungefähr 11 % relativ gering. Die Methode ist sensitiv genug, um unterschiedliche Zellmodelle zu differenzieren. Somit bietet diese Methode auch eine Möglichkeit, die Permeation von anderen Zellgeweben, wie zum Beispiel Leber, Niere oder Darmwand zu untersuchen. Im Vergleich zum herkömmlichen Verfahren, wie zum Beispiel die Franz-Diffusionszelle ist diese Methode günstiger und leichter zu händeln.

Die entwickelte Methode wurde im nächsten Schritt verwendet, um die Permeation beim Vollhautmodell zu bestimmen. Hierbei stellte sich heraus, dass das EpiDerm™ Modell von Matek die besten Barriereeneigenschaften besitzt. Die Vollhautmodelle 1 bis 3 zeigen ähnliche Permeationswerte. Gerade für das Vollhautmodell ist die Methode, die Permeation in einem MES zu messen, ein praktikabler Ansatz. Hierdurch kann aufgrund der geringen Größe Material gespart werden und es sind eine hohe Anzahl an Versuchsdurchführungen möglich. Für die Kosmetikindustrie ist die 2OC Plattform ein innovatives Werkzeug für die Substanztestung. Voraussetzung für die Permeationsmessung ist, dass die Membranfläche des MES vollständig mit dem Vollhautmodell abgedeckt wird. Hierbei stellt sich die Kontraktion der Modelle als ein Problem heraus. In den ersten Versuchen mit Vollhautmodellen konnten starke Kontraktionen beobachtet werden. Erst bei Vollhautmodell 3 konnte durch den Einsatz von Fibringel das Problem reduziert werden. Das Gel erlaubt eine Kontraktion in vertikaler Richtung und reduziert die Kontraktion in horizontale Richtung.

Es konnte zusätzlich gezeigt werden, dass es möglich ist, die Permeationskoeffizienten über die Kulturzeit der Vollhautmodelle zu bestimmen. Dieser Ansatz kann in der Anwendung genommen werden, um die Barriereeneigenschaften von Hautmodellen zu beurteilen.

Des Weiteren wurde herausgefunden, dass die TEER Messmethode für so kleine Modellen nicht gut geeignet ist. Aus diesem Grunde besitzt die in dieser Arbeit etablierte Messmethode ein großes Potential zur Qualitätskontrolle für kleine Hautmodelle in MES. Somit können

zum Beispiel *in vitro* generierte Hautmodelle mittels der Permeationmessung auf deren Qualitätseigenschaft geprüft werden, bevor man diese für die Substanztestung freigibt.

Erste Permeationsmessungen mit Nanopartikel zeigen das Potential diese Methode für Langzeitversuche zu nutzen. Morphologische Änderungen der Hautmodellen lassen sich gut mit HE Färbungen analysieren. Um genau festzustellen inwiefern die Haut von der Substanz angegriffen wird, sollten Immunfärbungen zusätzlich benutzt werden.

Die Bestimmung von Glukoseverbrauch und Laktatproduktion in den Vollhautmodellen war ein Ansatz, um zu prüfen, ob man generell Mediumkomponenten in so einem kleinen System messen kann. In den Versuchen wurde gezeigt, dass es durchführbar ist. Allerdings ist die Fehleranfälligkeit sehr hoch. Für zukünftige Ansätze, gerade für die Kosmetik- und Pharmazieindustrie, ist das Prüfen von Wirkstoffen ein wichtiger Aspekt. Aus diesem Grund sollte man in weiteren Untersuchungen die Wechselwirkung von Wirkstoffen auf Hautmodelle untersuchen und prüfen, ob die Verstoffwechslung messbar ist.

Die Permeationsversuche wurden mit COMSOL Multiphysik simuliert, um die Diffusion mittels Parameteroptimierung bestimmen zu können. Eine gute Übereinstimmung gab es bei Substanzen mit geringer Molekulargröße und bei ausgereiften Vollhautmodellen. Bei anormalen Diffusionsprozessen kann die Simulation erweitert werden. Es wurde anhand eines Beispiels gezeigt, dass es gut funktioniert. Es bedarf jedoch weiterer Untersuchungen, um diese Simulation mit mehreren Parametern zu validieren.

Wie schon erwähnt, ist das Programm modular, somit konnte man die Simulation direkt auf das 2OC System übertragen. Eine Validierung zeigte, dass die Simulation mit den experimentell ermittelten Werten gute Übereinstimmungen aufweist. Des Weiteren können mit Hilfe des Programms physikalische Effekte dargestellt werden, wodurch Sachverhalte verständlicher werden. Die Simulation ist somit eine vielversprechende Möglichkeit, die experimentelle Methode zu unterstützen und auch Versuchsaufwand zu reduzieren. Des Weiteren macht die Modularität des Programms es möglich, die Simulation an andere physikalische Parameter sowie Geometrien anzupassen. Es wurde auch gezeigt, dass durch die Erweiterung der Diffusionsgleichungen auch anormale Diffusionen mit berücksichtigt werden können. Dabei handelt es sich um einen ersten Ansatz. Um die Simulation von anormaler Diffusion genauer zu beurteilen, sind noch weitere Untersuchungen erforderlich. Die Simulation von chemischen Reaktionen in Vollhautmodellen ist ein interessanter Ansatz um in Zukunft auch verschiedene Untersuchungen vor dem Versuch zu kombinieren oder abzuschätzen. Dadurch kann der Versuchsaufwand reduziert werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, Permeationseigenschaft in einem kleinen 96 Well MES zu bestimmen. Diese Methode kann benutzt werden, um Vollhautmodelle zu charakterisieren. Die Simulation ist eine vielversprechendere Methode,

die experimentellen Untersuchungen zu unterstützen und durch die Modularität kann diese an verschiedene Geometrien und physikalische Effekte adaptiert werden.

# 8 Anhang

## 8.1 Bestimmung der Reynolds- und Machzahl

### Reynoldzahl

$$h_{MOC} = 0,1 \text{ mm (Höhe des 2OC Kanals an der engsten Stelle)}$$

$$b_{MOC} = 1 \text{ mm (Breite des 2OC Kanals an der engsten Stelle)}$$

$$u = 0,01576 \text{ m/s (Mittleregeschwindigkeit bei Stufe 5)}$$

$$\nu = 0,723 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s (Dynamische Viskosität von Wasser bei 35°C) [111]}$$

$$\bar{l} = \frac{4 \cdot A}{U} = \frac{4 \cdot (h_{MOC} \cdot b_{MOC})}{(2 \cdot h_{MOC} + 2 \cdot b_{MOC})}$$

$A$ : Fläche [m]

$U$ : Umfang [m]

$\bar{l}$ : Charakteristische Länge [m]

$$Re = \frac{u \cdot \bar{l}}{\nu} = \frac{0,01576 \text{ m/s} \cdot 0,00019 \text{ m}}{0,723 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}} = 4,14 \ll 2320$$

$Re$ : Reynoldszahl [/]

$u$ : Geschwindigkeitsvektor [ $\frac{m}{s}$ ]

$\nu$ : Viskosität [ $\frac{m^2}{s}$ ]

Bei einer Geschwindigkeit von über 8,828 m/s wird die Strömung turbulent.

### Machzahl

$$\begin{aligned}u &= 0,01576 \text{ m/s (Mittlere Geschwindigkeit bei Stufe 5)} \\a &= 1423,93 \text{ m/s}^*\end{aligned}$$

$$Ma = \frac{u}{a} = \frac{0,01576 \text{ m/s}}{1423,93 \text{ m/s}} = 1,107 \cdot 10^{-5} \ll 1$$

$Ma$ : Machzahl [/]

$u$ : Geschwindigkeitsvektor [ $\frac{m}{s}$ ]

$a$ : Schallgeschwindigkeit [ $\frac{m}{s}$ ]

\*Schallgeschwindigkeit im destillierten Wasser bei einer Temperatur von 37°C und Umgebungsdruck [112].

## 8.2 Beschichtung der Zellkulturflaschen mit Kollagen A

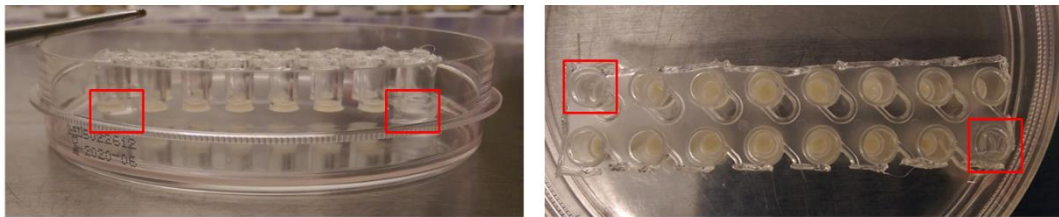
Für die Kultivierung der primären Keratinozyten wurden die Kultivierungsgefäße mit Kollagen A beschichtet. Hierfür wurden 5 ml Kollagen A (0,1 mg/ml gelöst in H<sub>2</sub>O) in einem Kultivierungsgefäß mit einer Fläche von 175 cm<sup>2</sup> gegeben und 1 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Kollagenlösung entfernt und mit 20 ml H<sub>2</sub>O ausgespült. Das Kultivierungsgefäß wurde 30 min zum Trocknen bei Raumtemperatur oder über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

## 8.3 Methode zur Kultivierung der Zell- und Vollhautmodelle

### Kultivierungssysteme für die Vollhautmodelle

Ein essentieller Schritt in der *in vitro* Kultur von Hautmodellen ist die Freilegung der Keratinozytenschicht, damit diese in Kontakt mit Luft kommt (*air lift*). Dies kann mit MES realisiert werden. In dieser Arbeit wurde das Transwell<sup>®</sup> von der Firma CORNING verwendet. Eine weitere Problematik bei diesem System ist die Mediumversorgung. Da die Well-Gefäße so klein sind, müsste für den *air lift* das Volumen in einem 96 Well MES auf 100 µl reduziert werden. Zur Abhilfe wurden während der Kultur zwei verschiedene Methoden verwendet, um dieses Problem zu umgehen.

Für die erste Methode wurden 2x8 Streifen aus dem 96 MES geschnitten. Zum Schneiden wurde ein Skalpell mit Hilfe eines Bunsenbrenners erhitzt. Unter sterilen Bedingungen wurde der Streifen herausgeschmolzen. Diese Streifen wurden in einer Petrischale platziert. Um die Mediumversorgung im unteren Bereich zu gewährleisten wurde der Streifen mit zwei PDMS Ständern angehoben (siehe Abbildung 8.1). Die Kultur erfolgt in der Petrischale. Bei der *submerge* (untertauchen) Kultivierung wurden 75 µl auf das Modell und 13 – 15 ml Medium in der Petrischale appliziert.



□ Position der PDMS Ständer

Abbildung 8.1: Herausgeschnittene 96 MES 2x8 Streifen in der Petrischale (mit Hautmodellen) und die Position der PDMS Abstandshalter (rot eingerahmt).

Im *air lift* wurde das Medium über dem Modell abgenommen. Das Medium in der Petrischale wurde auf 11 – 12 ml reduziert, so dass die Membran vom MES gerade noch benetzt ist (siehe Abbildung 8.2).

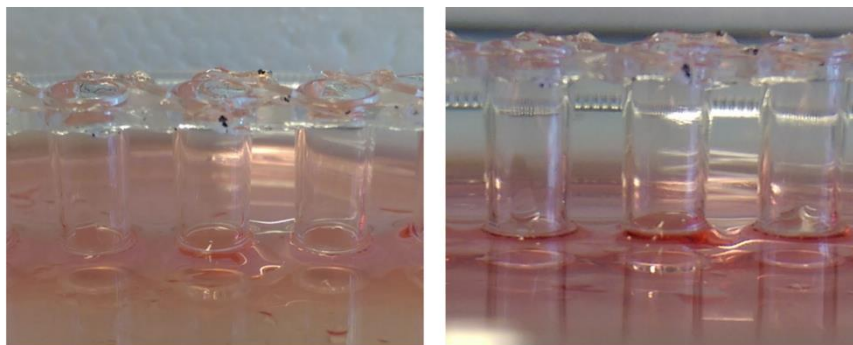


Abbildung 8.2: 96 Well MES in der Petrischale (ohne Hautmodelle) und die Benetzung der Membran mit Medium.

Für die zweite Methode wurden die MES einzeln aus der Platte geschnitten und in einer Halterung aus PC eingehängt. Die Kultur erfolgte in einer 48 Well-Platte (siehe Abbildung 8.3). Es wurden 75 µl Medium auf die Modelle gegeben und 1000 µl Medium in das Well. Für den *air lift* wurde das Medium auf dem Model entfernt und 800 µl Medium in das Well pipettiert.

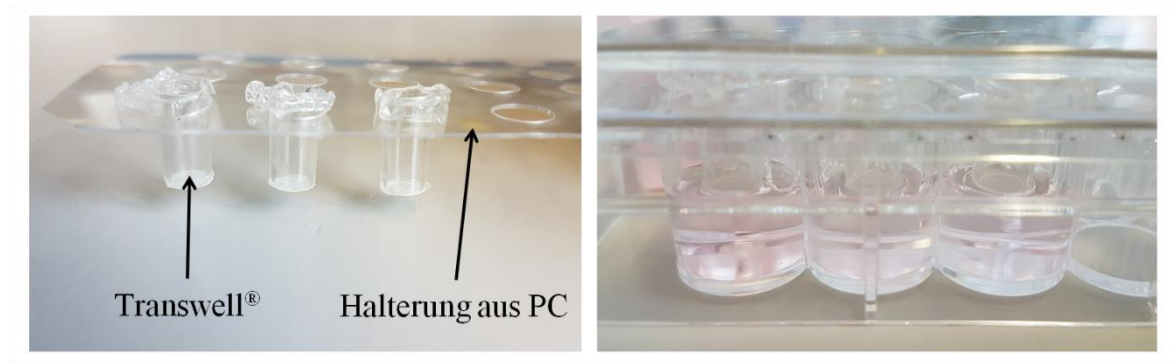


Abbildung 8.3: Darstellung der Transwell® Halterung aus Polykarbonat (links) und die Positionierung in der 48 Well-Platte (rechts).

### Fibrinversiegelung

Ein Tag vor der Besiedelung mit Keratinozyten wurden die Vollhautmodelle mit Fibringel versiegelt. Dieses Gel wird aus Fibrinogen und Thrombin zusammengesetzt, welches sich bei der Vermischung sehr schnell vernetzt. Es muss für jedes einzelne Hautmodell eine Fibrinlösung und eine Thrombinlösung in zwei verschiedenen Reaktionsgefäßen (0,5 ml) vorbereitet werden. Die Zusammensetzung ist der Tabelle 8.1 zu entnehmen.

Tabelle 8.1: Vorbereitung für das Fibringel

10 µl Fibrinlösung [10 mg/ml]	10 µl Thrombinlösung [0,8 U/ml]
8 µl Lösung mit Fibroblasten ( $0,4 \cdot 10^5$ Fibros)	8 µl CaCl <sub>2</sub> (40 mM)
1 µl D10A	2 µl Thrombin [4 U/ml]
1 µl Fibrinogen [10 mg/ml]	

### Generierung von Vollhautmodel 1

Im ersten Schritt zur Generierung des Vollhautmodells wurden 4,5 mm große Stanzen aus Matriderm™ Kollagen-Elastin-Matrix hergestellt. Diese wurden in PBS eingelegt und mit einem Exsikkator 30 min lang entgast. Anschließend wurden die Stanzen 20 min im 10A-Medium eingelegt und in 96 Well ULA (*ultra low attachment*) Platten platziert. Im nächsten Schritt wurde 50 µl Zellsuspension ( $1 \times 10^5$  Zellen/50 µl Fibroblasten in D10-Medium) vorsichtig auf die Stanzen gegeben und für 10 min zum Adhärenieren stehen gelassen. Es folgt eine Kultur der Fibroblasten in der Matriderm™-Matrix für 3 Tag im D10A-Medium. Nach

24 h wurde das Medium gewechselt. Anschließend wurden die Hautmodelle in das 96 Well MES umgesetzt. Hierfür wurden zwei 8er Reihen aus der 96 Well MES Platte herausgetrennt. Die 2x8 MES Reihen wurden in einer Petrischale positioniert. Es wurde so viel Medium (D10A) in die Petrischale gegeben, bis das Medium die Membranfläche unter dem MES benetzte. Dies entspricht ungefähr einem Volumen von 12 – 13 ml Medium. Auf die Vollhautmodelle dem MES wurden 75 µl Medium pipettiert.

Nach einer Kultivierung von 3 – 4 Tagen im Brutschrank wurde das Medium im Donator abgezogen. Es folgte eine Versiegelung mit Fibringel. Hierfür wurde 20 µl Fibringel auf das Modell pipettiert und für 1 h im Brutschrank zum Aushärten stehen gelassen. Anschließend wurde Medium auf und unter das Modell gegeben und 1 Tag lang weiter kultiviert. Am nächsten Tag wurde 75 µl Zellsuspension mit  $0,8 \times 10^5$  Zellen/50 µl primäre Keratinozyten (in 50 % D10A + 50 % DLA) auf das Modell appliziert. Das Modell wurde drei Tage lang im Brutschrank kultiviert. Im Anschluss wurde der *air lift* durchgeführt. Das Hautmodell wurde weitere 14 Tage im *air lift* kultiviert.

### **Generierung von Vollhautmodell 2**

Es wurden Matriderm™ Stanzen mit einem Durchmesser von 4,5 mm hergestellt und in PBS gelegt. Anschließend wurden die Stanzen im Exsikkator entgast und für 20 min in D10A-Medium eingelegt. Es folgt das Besiedeln der Matriderm™ Stanzen mit Fibroblasten ( $1 \times 10^5$  Zellen/50 µl Fibroblasten in D10). Im Anschluss wurden die besiedelten Stanzen 6 Tage lang in 96 Well ULA Platten mit D10A kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurde das Medium (D10A) gewechselt. Am sechsten Tag wurden die Stanzen vorsichtig in das 96 MES umgesetzt. Zum Versiegeln und Fixieren der Stanzen wurde 20 µl 60 % Kollagengel mit Fibroblasten auf die Stanzen pipettiert. Das Kollagengel mit Fibroblasten wurde wie in Kapitel 3.2 beschrieben hergestellt, die Zusammensetzung war wie folgt: 1,5 ml 60 % Kollagengel (von der TU Berlin zu Verfügung gestellt), 30 µl FBS, 120 µl 10xHBSS,  $4,8 \times 10^5$  Fibroblasten. Im Brutschrank wurde das Gel bei 37 °C für 45 min ausgehärtet. Für die Kultur wurden die MES in PC Halter positioniert und in 48 Well-Platten kultiviert. Es wurden 75 µl D10A Medium auf die Modelle und 1000 µl Medium in die Wells pipettiert. Es folgte eine Inkubation im Brutschrank für einen Tag. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Modelle mit Keratinozyten besiedelt. Hierfür wurde eine Zellsuspension mit  $1 \times 10^5$  Zellen/75 µl in E2 Medium hergestellt. 75 µl der Zellsuspension wurde auf die Modelle pipettiert. Nach zwei Tagen Kultur im Brutschrank mit E2 Medium, wurde der *air lift* durchgeführt. Die Modelle wurden anschließend 2 Wochen weiter mit E3 Medium in der 48 Well-Platte kultiviert. Um zu vermeiden, dass das Medium an die Oberfläche der Hautmodelle vordringt, wurde das Volumen auf 800 µl reduziert. Das Medium wurde dreimal die Woche gewechselt.

### Generierung von Vollhautmodel 3

Es wurden 4,5 mm große Matriderm™ Matrizen ausgestanzt, in PBS gelegt und diese anschließend im Exsikkator 30 min entgast. Die entlüfteten Stanzen wurden zunächst in D10A Medium getränkt, in die 96 ULA Platten eingesetzt und mit 50 µl Zellsuspension ( $0,4 \times 10^5$  Zellen/50 µl in D10A-Medium) beimpft. 10 min nach der Beimpfung wurden 150 µl D10A Medium auf die Stanzen gegeben und 8 – 11 Tage lang im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt kultiviert. Das Medium wurde dreimal in der Woche gewechselt. Anschließend wurden die Stanzen in die MES eingesetzt. Je nach Versuch wurden hierfür 3x8 MES Streifen ausgeschnitten und diese mit PDMS Ständern in einer Petrischale platziert (siehe Abbildung 8.1) oder in mit einer PC Halterung in einer 48 Well Platte gehängt (siehe Abbildung 8.3). Darin wurde das Model 3 – 11 Tage weiter kultiviert. Es folgt die Fibringel Versiegelung mit Fibroblasten. Nach 24 Stunden wurden das Medium über den Modellen entnommen und 50 µl ( $8 \times 10^5$  Zellen/50 µl im E2 Medium) Zellsuspension darauf pipettiert. Nach 2 Stunden wurde 15 µl E2 Medium zusätzlich auf das Modell gegeben. Die Kultivierung erfolgte für 5 Tage in E1 Medium, wobei nach 2 Tagen ein Mediumwechsel durchgeführt wurde. Anschließend erfolgte der *air lift*. Das Medium unterhalb der Membran wurde so eingestellt, dass die Modelle nicht von Medium überschwemmt werden (für ein Beispiel siehe Abbildung 8.2). Für die *air lift* Kultur wurde E3 verwendet und das Medium wurde dreimal in der Woche gewechselt. Es wurde weitere zwei Wochen kultiviert dabei wurde dreimal die Woche das Medium gewechselt.

## 9 Referenzen

1. Chuong, C.M.; Nickoloff, B.J.; Elias, P.M.; Goldsmith, L.A.; Macher, E.; Maderson, P.A.; Sundberg, J.P.; Tagami, H.; Plonka, P.M.; Therstrup-Pederson, K.; et al. What is the 'true' function of skin? *Exp Dermatol* **2002**, *11*, 159–187, doi:10.1034/j.1600-0625.2002.00112.x.
2. Prausnitz, M.R.; Langer, R. Transdermal drug delivery. *Nat Biotechnol* **2008**, *26*, 1261–1268, doi:10.1038/nbt.1504.
3. Prausnitz, M.R.; Mitragotri, S.; Langer, R. Current status and future potential of transdermal drug delivery. *Nat Rev Drug Discov* **2004**, *3*, 115–124, doi:10.1038/nrd1304.
4. Algin-Yapar, E.; Inal, Ö. Transdermal Spray in Hormone Delivery. *Trop. J. Pharm Res* **2014**, *13*, 469, doi:10.4314/tjpr.v13i3.23.
5. McNamee, P.; Hibatallah, J.; Costabel-Farkas, M.; Goebel, C.; Araki, D.; Dufour, E.; Hewitt, N.J.; Jones, P.; Kirst, A.; Le Varlet, B.; et al. A tiered approach to the use of alternatives to animal testing for the safety assessment of cosmetics: Eye irritation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **2009**, *54*, 197–209, doi:10.1016/j.yrtph.2009.04.004.
6. Asbill, C. Evaluation of a Human Bio-Engineered Skin Equivalent for Drug Permeation Studies. *Pharmaceutical Research* **2000**, *17*, 1092–1097, doi:10.1023/A:1026405712870.
7. Basketter, D.; Jírova, D.; Kandárová, H. Review of skin irritation/corrosion Hazards on the basis of human data: A regulatory perspective. *Interdisciplinary toxicology* **2012**, *5*, 98–104, doi:10.2478/v10102-012-0017-2.
8. York, M.; Griffiths, H.A.; Whittle, E.; Basketter, D.A. Evaluation of a human patch test for the identification and classification of skin irritation potential. *Contact Dermatitis* **1996**, *34*, 204–212, doi:10.1111/j.1600-0536.1996.tb02175.x.
9. Ackermann, K.; Lombardi Borgia, S.; Korting, H.C.; Mewes, K.R.; Schäfer-Korting, M. The Phenion® Full-Thickness Skin Model for Percutaneous Absorption Testing. *Skin Pharmacol Physiol* **2010**, *23*, 105–112, doi:10.1159/000265681.
10. Moraes, C.; Mehta, G.; Leshner-Perez, S.C.; Takayama, S. Organs-on-a-Chip: A Focus on Compartmentalized Microdevices. *Ann Biomed Eng* **2012**, *40*, 1211–1227, doi:10.1007/s10439-011-0455-6.
11. Baker, M. Tissue models: A living system on a chip. *Nature* **2011**, *471*, 661–665, doi:10.1038/471661a.

12. Uwe M. et. al. Multi-Organ-Chips: Developing a Human Chip-Based Plattform for Repeated Does Toxicity Testing. *Alternative Testing Strategies, Progress Report 2012* **2012**, 210–218.
13. Hoffbauer, J. Verwendung von Nanopartikeln in Lebensmitteln und Kosmetika – Statusbericht. *J. Verbr. Lebensm.* **2008**, 3, 290–293, doi:10.1007/s00003-008-0360-6.
14. Weir, A.; Westerhoff, P.; Fabricius, L.; Hristovski, K.; Goetz, N. von. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environmental science & technology* **2012**, 46, 2242–2250, doi:10.1021/es204168d.
15. Gajbhiye, S.; Sakharwade, S. Silver Nanoparticles in Cosmetics. *JCDSA* **2016**, 06, 48–53, doi:10.4236/jcdsa.2016.61007.
16. Khan, I.; Saeed, K.; Khan, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry* **2017**, doi:10.1016/j.arabjc.2017.05.011.
17. Larese Filon, F.; Mauro, M.; Adami, G.; Bovenzi, M.; Crosera, M. Nanoparticles skin absorption: New aspects for a safety profile evaluation. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP* **2015**, 72, 310–322, doi:10.1016/j.yrtph.2015.05.005.
18. Möller, J.; Pörtner, R. Model-Based Design of Process Strategies for Cell Culture Bioprocesses: State of the Art and New Perspectives. In *New Insights into Cell Culture Technology*; Gowder, S.J.T., Ed.; InTech, 2017, ISBN 978-953-51-3133-5.
19. Möller, J.; Korte, K.; Pörtner, R.; Zeng, A.-P.; Jandt, U. Model-based identification of cell-cycle-dependent metabolism and putative autocrine effects in antibody producing CHO cell culture. *Biotechnology and bioengineering* **2018**, doi:10.1002/bit.26828.
20. Chung, C.A.; Chen, C.W.; Chen, C.P.; Tseng, C.S. Enhancement of cell growth in tissue-engineering constructs under direct perfusion: Modeling and simulation. *Biotechnology and bioengineering* **2007**, 97, 1603–1616, doi:10.1002/bit.21378.
21. Fritsch, P. *Dermatologie und Venerologie für das Studium*; Springer: Heidelberg, 2009, ISBN 978-3-540-79303-8.
22. Faller, A.; Schünke, M.; Schünke, G. *Der Körper des Menschen. Einführung in Bau und Funktion*, 15., komplett überarb. Aufl.; Thieme: Stuttgart, 2008, ISBN 978-3-13-329715-8.
23. Aufbau-Haut.jpg (JPEG-Grafik, 1455 × 1094 Pixel) - Skaliert (60%). <https://iframes.bms.de/bms/img/Aufbau-Haut.jpg> (accessed on 23 February 2016).
24. 6b7ea3ee-249a-11e0-bf7c-73f5125785b0.jpg (JPEG-Grafik, 800 × 468 Pixel). <https://www.enpevita.de/site/examples/images/6b7ea3ee-249a-11e0-bf7c-73f5125785b0.jpg> (accessed on 23 February 2016).
25. Hadgraft, J. Skin, the final frontier. *International Journal of Pharmaceutics* **2001**, 224, 1–18, doi:10.1016/S0378-5173(01)00731-1.
26. Barry, B.W. Mode of action of penetration enhancers in human skin. *Journal of Controlled Release* **1987**, 6, 85–97, doi:10.1016/0168-3659(87)90066-6.

27. Valenzuela, P.; Simon, J.A. Nanoparticle delivery for transdermal HRT. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2012**, *8*, S83-S89, doi:10.1016/j.nano.2012.05.008.
28. Bouwstra, J.; Pilgram, G.; Gooris, G.; Koerten, H.; Ponec, M. New aspects of the skin barrier organization. *Skin pharmacology and applied skin physiology* **2001**, *14 Suppl 1*, 52–62.
29. Wertz, P.W. Lipids and barrier function of the skin. *Acta dermato-venereologica. Supplementum* **2000**, *208*, 7–11.
30. Tsukita, S.; Furuse, M.; Itoh, M. S.Tsukita 2001 Multifunctional strands in tight junctions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, *2*, 285–293, doi:10.1038/35067088.
31. Tsuruta, D.; Green, K.J.; Getsios, S.; Jones, Jonathan C R. The barrier function of skin: how to keep a tight lid on water loss. *Trends in cell biology* **2002**, *12*, 355–357.
32. Knorr, F.; Lademann, J.; Patzelt, A.; Sterry, W.; Blume-Peytavi, U.; Vogt, A. Follicular transport route – Research progress and future perspectives. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2009**, *71*, 173–180, doi:10.1016/j.ejpb.2008.11.001.
33. Schaefer, H.; Lademann, J. The Role of Follicular Penetration. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* **2001**, *14*, 23–27, doi:10.1159/000056386.
34. Lademann, J.; Knorr, F.; Richter, H.; Blume-Peytavi, U.; Vogt, A.; Antoniou, C.; Sterry, W.; Patzelt, A. Hair Follicles; An Efficient Storage and Penetration Pathway for Topically Applied Substances. *Skin Pharmacol Physiol* **2008**, *21*, 150–155, doi:10.1159/000131079.
35. Otberg, N.; Patzelt, A.; Rasulev, U.; Hagemester, T.; Linscheid, M.; Sinkgraven, R.; Sterry, W.; Lademann, J. The role of hair follicles in the percutaneous absorption of caffeine. *Br J Clin Pharmacol* **2008**, *65*, 488–492, doi:10.1111/j.1365-2125.2007.03065.x.
36. Asselineau, D.; Bernard, B.A.; Bailly, C.; Darmon, M.; Prunieras, M. Human Epidermis Reconstructed by Culture: Is It "Normal"? *J Invest Dermatol* **1986**, *86*, 181–186, doi:10.1111/1523-1747.ep12284237.
37. Prunieras, M.; Regnier, M.; Woodley, D. Methods for Cultivation of Keratinocytes with an Air-Liquid Interface. *J Invest Dermatol* **1983**, *81*, 28–33, doi:10.1111/1523-1747.ep12540324.
38. Schoop, V.M.; Mirancea, N.; Fusenig, N.E. Epidermal Organization and Differentiation of HaCaT Keratinocytes in Organotypic Coculture with Human Dermal Fibroblasts. *J Invest Dermatol* **1999**, *112*, 343–353, doi:10.1046/j.1523-1747.1999.00524.x.
39. Kehe, K.; Abend, M.; Ridi, R.; Peter, R.U.; van Beuningen, D. Tissue engineering with HaCaT cells and a fibroblast cell line. *Archives of Dermatological Research* **1999**, *291*, 600–605, doi:10.1007/s004030050461.

40. Cannon, C.L.; Neal, P.J.; Southee, J.A.; Kubilus, J.; Klausner, M. New epidermal model for dermal irritancy testing. *Toxicology in Vitro* **1994**, *8*, 889–891, doi:10.1016/0887-2333(94)90095-7.
41. Roberts, I. Does animal experimentation inform human healthcare? Observations from a systematic review of international animal experiments on fluid resuscitation. *BMJ* **2002**, *324*, 474–476, doi:10.1136/bmj.324.7335.474.
42. Marx, U.; Walles, H.; Hoffmann, S.; Lindner, G.; Horland, R.; Sonntag, F.; Klotzbach, U.; Sakharov, D.; Tonevitsky, A.; Lauster, R. 'Human-on-a-chip' developments: a translational cutting-edge alternative to systemic safety assessment and efficiency evaluation of substances in laboratory animals and man? *Alternatives to laboratory animals : ATLA* **2012**, *40*, 235–257.
43. Sarasu, S.; Rama, K. Design and development of organ on chip using microfluidic technology for simulation, 1–6, doi:10.1109/ICOISS.2013.6678412.
44. TissUse GmbH. Technology Information of the MOC. <http://www.tissuse.com/technology.html>.
45. M.Busek; M.Nötzel; C.Polk; F.Sonntag. Characterization and simulation of peristaltic micropumps. *Journal of Sensors and Sensor Systems* **2013**, 165–169.
46. Ataç, B.; Wagner, I.; Horland, R.; Lauster, R.; Marx, U.; Tonevitsky, A.G.; Azar, R.P.; Lindner, G. Skin and hair on-a-chip: in vitro skin models versus ex vivo tissue maintenance with dynamic perfusion. *Lab Chip* **2013**, *13*, 3555, doi:10.1039/c3lc50227a.
47. Materne, E.-M.; Maschmeyer, I.; Lorenz, A.K.; Horland, R.; Schimek, K.M.S.; Busek, M.; Sonntag, F.; Lauster, R.; Marx, U. The Multi-organ Chip - A Microfluidic Platform for Long-term Multi-tissue Coculture. *JoVE* **2015**, doi:10.3791/52526.
48. Materne, E.-M.; Ramme, A.P.; Terrasso, A.P.; Serra, M.; Alves, P.M.; Brito, C.; Sakharov, D.A.; Tonevitsky, A.G.; Lauster, R.; Marx, U. A multi-organ chip co-culture of neurospheres and liver equivalents for long-term substance testing. *Journal of Biotechnology* **2015**, *205*, 36–46, doi:10.1016/j.jbiotec.2015.02.002.
49. Materne, E.-M.; Tonevitsky, A.G.; Marx, U. Chip-based liver equivalents for toxicity testing – organotypicalness versus cost-efficient high throughput. *Lab Chip* **2013**, *13*, 3481, doi:10.1039/c3lc50240f.
50. Schimek, K.; Busek, M.; Brincker, S.; Groth, B.; Hoffmann, S.; Lauster, R.; Lindner, G.; Lorenz, A.; Menzel, U.; Sonntag, F.; et al. Integrating biological vasculature into a multi-organ-chip microsystem. *Lab Chip* **2013**, *13*, 3588, doi:10.1039/c3lc50217a.
51. Wagner, I.; Materne, E.-M.; Brincker, S.; Süßbier, U.; Frädlich, C.; Busek, M.; Sonntag, F.; Sakharov, D.A.; Trushkin, E.V.; Tonevitsky, A.G.; et al. A dynamic multi-organ-chip for long-term cultivation and substance testing proven by 3D human liver and skin tissue co-culture. *Lab Chip* **2013**, *13*, 3538, doi:10.1039/c3lc50234a.

52. Maschmeyer, I.; Hasenberg, T.; Jaenicke, A.; Lindner, M.; Lorenz, A.K.; Zech, J.; Garbe, L.-A.; Sonntag, F.; Hayden, P.; Ayehunie, S.; et al. Chip-based human liver–intestine and liver–skin co-cultures – A first step toward systemic repeated dose substance testing in vitro. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2015**, *95*, 77–87, doi:10.1016/j.ejpb.2015.03.002.
53. Wilkinson, D.S. *Mass transport in solids and fluids*; Cambridge University Press: Cambridge, New York, **2000**, ISBN 9780521624947.
54. Cussler, E.L. *Diffusion. Mass transfer in fluid systems*, 2. ed; Cambridge Univ. Press: Cambridge [u.a.], **1997**, ISBN 0-521-45078-0.
55. Crank, J. *The mathematics of diffusion*, 2d ed; Clarendon Press: Oxford, [Eng], **1975**, ISBN 0-19-853411-6.
56. Netzlaff, F.; Kaca, M.; Bock, U.; Haltner-Ukomadu, E.; Meiers, P.; Lehr, C.-M.; Schaefer, U.F. Permeability of the reconstructed human epidermis model Episkin® in comparison to various human skin preparations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2007**, *66*, 127–134, doi:10.1016/j.ejpb.2006.08.012.
57. Jayakrishna, A.; Christina S., C.; Joan W., M.; Evangelos S., G.; Aurelie, E.; David J., W.; Ivana, K.; Francois C., D.; Anthony P., A. Diffusion of High Molecular Weight Compounds through Sclera. *IOVS* **2000**, *2000*, 1181–1185.
58. Bonferoni, M.C.; Rossi, S.; Ferrari, F.; Caramella, C. A Modified Franz Diffusion Cell for Simultaneous Assessment of Drug Release and Washability of Mucoadhesive Gels. *Pharmaceutical Development and Technology* **1999**, *4*, 45–53, doi:10.1080/10837459908984223.
59. Ng, S.-F.; Rouse, J.J.; Sanderson, F.D.; Meidan, V.; Eccleston, G.M. Validation of a Static Franz Diffusion Cell System for In Vitro Permeation Studies. *AAPS PharmSciTech* **2010**, *11*, 1432–1441, doi:10.1208/s12249-010-9522-9.
60. SES Franz Cells. [http://www.ses-analysesysteme.de/SES-Franz\\_Cell\\_uk.htm](http://www.ses-analysesysteme.de/SES-Franz_Cell_uk.htm).
61. Pluen, A.; Netti, P.A.; Jain, R.K.; Berk, D.A. Diffusion of Macromolecules in Agarose Gels: Comparison of Linear and Globular Configurations. *Biophysical Journal* **1999**, *77*, 542–552, doi:10.1016/S0006-3495(99)76911-0.
62. Leddy, H.A.; Awad, H.A.; Guilak, F. Molecular diffusion in tissue-engineered cartilage constructs: Effects of scaffold material, time, and culture conditions. *J. Biomed. Mater. Res.* **2004**, *70B*, 397–406, doi:10.1002/jbm.b.30053.
63. Leddy, H.A.; Guilak, F. Site-Specific Molecular Diffusion in Articular Cartilage Measured using Fluorescence Recovery after Photobleaching. *Annals of Biomedical Engineering* **2003**, *31*, 753–760, doi:10.1114/1.1581879.
64. Seiffert, S.; Oppermann, W. Systematic evaluation of FRAP experiments performed in a confocal laser scanning microscope. *J Microsc* **2005**, *220*, 20–30, doi:10.1111/j.1365-2818.2005.01512.x.

65. F. Pirot, Y. N. Kalia, A. L. Stinchcomb, G. Keating, A. Bunge, R. H. Guy. Characterization of the permeability barrier of human skin in vivo. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1997**, 1997, 1562–1567.
66. Tetteh, J.; Mader, K.T.; Andanson, J.-M.; McAuley, W.J.; Lane, M.E.; Hadgraft, J.; Kazarian, S.G.; Mitchell, J.C. Local examination of skin diffusion using FTIR spectroscopic imaging and multivariate target factor analysis. *Analytica chimica acta* **2009**, 642, 246–256, doi:10.1016/j.aca.2009.03.002.
67. Guldbrand, S.; Kirejev, V.; Simonsson, C.; Goksor, M.; Smedh, M.; Ericson, M.B. Two-photon fluorescence correlation spectroscopy as a tool for measuring molecular diffusion within human skin. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* **2013**, 84, 430–436, doi:10.1016/j.ejpb.2012.10.001.
68. Berland, K.M.; So, P.T.; Gratton, E. Two-photon fluorescence correlation spectroscopy: Method and application to the intracellular environment. *Biophysical Journal* **1995**, 68, 694–701, doi:10.1016/S0006-3495(95)80230-4.
69. Ghosn, M.G.; Sudheendran, N.; Wendt, M.; Glasser, A.; Tuchin, V.V.; Larin, K.V. Monitoring of glucose permeability in monkey skin in vivo using Optical Coherence Tomography. *J. Biophoton.* **2010**, 3, 25–33, doi:10.1002/jbio.200910075.
70. Tanaka, H.; Matsumura, M.; Veliky, I.A. Diffusion characteristics of substrates in Calcium alginate gel beads. *Biotechnol. Bioeng.* **1984**, 26, 53–58, doi:10.1002/bit.260260111.
71. Teichmann, A.; Jacobi, U.; Ossadnik, M.; Richter, H.; Koch, S.; Sterry, W.; Lademann, J. Differential stripping: determination of the amount of topically applied substances penetrated into the hair follicles. *The Journal of investigative dermatology* **2005**, 125, 264–269, doi:10.1111/j.0022-202X.2005.23779.x.
72. Surber, C.; Schwarb, F.P.; Smith, E.W. Tape-stripping technique. *Journal of Toxicology: Cutaneous and Ocular Toxicology* **2002**, 20, 461–474, doi:10.1081/CUS-120001870.
73. Weigmann, H.-J.; Lademann, J.; Meffert, H.; Schaefer, H.; Sterry, W. Determination of the Horny Layer Profile by Tape Stripping in Combination with Optical Spectroscopy in the Visible Range as a Prerequisite to Quantify Percutaneous Absorption. *Skin Pharmacol Physiol* **1999**, 12, 34–45, doi:10.1159/000029844.
74. Jacobi, U.; Weigmann, H.-J.; Ulrich, J.; Sterry, W.; Lademann, J. Estimation of the relative stratum corneum amount removed by tape stripping. *Skin research and technology : official journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS) [and] International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) [and] International Society for Skin Imaging (ISSI)* **2005**, 11, 91–96, doi:10.1111/j.1600-0846.2005.00094.x.
75. Amsden, B. Solute Diffusion within Hydrogels. Mechanisms and Models. *Macromolecules* **1998**, 31, 8382–8395, doi:10.1021/ma980765f.

76. Fatin-Rouge, N.; Starchev, K.; Buffle, J. Size Effects on Diffusion Processes within Agarose Gels. *Biophysical Journal* **2004**, *86*, 2710–2719, doi:10.1016/S0006-3495(04)74325-8.
77. Metzler, R.; Klafter, J. The random walk's guide to anomalous diffusion: A fractional dynamics approach. *Physics Reports* **2000**, *339*, 1–77, doi:10.1016/S0370-1573(00)00070-3.
78. Sanvicens, N.; Marco, M.P. Multifunctional nanoparticles--properties and prospects for their use in human medicine. *Trends in biotechnology* **2008**, *26*, 425–433, doi:10.1016/j.tibtech.2008.04.005.
79. Lorenz, C.; Goetz, N. von; Scheringer, M.; Wormuth, M.; Hungerbühler, K. Potential exposure of German consumers to engineered nanoparticles in cosmetics and personal care products. *Nanotoxicology* **2011**, *5*, 12–29, doi:10.3109/17435390.2010.484554.
80. Müller-Esterl, W.; Brandt, U.; Anderka, O.; Kerscher, S. *Biochemie. Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*, Korr. Nachdr. der 2. Aufl.; Spektrum Akad. Verl.: Heidelberg, 2010, ISBN 978-3-8274-2003-9.
81. Berg, J.M.; Stryer, L.; Tymoczko, J.L. *Biochemie*, 7. Aufl.; Springer Spektrum: Berlin [u.a.], **2013**, ISBN 978-3-8274-2988-9.
82. Decker, R.H. Nature and Regulation of Energy Metabolism in the Epidermis. *Journal of Investigative Dermatology* **1971**, *57*, 351–363, doi:10.1111/1523-1747.ep12292707.
83. Nguyen, D.T.; Keast, D. Energy metabolism and the skin. *International Journal of Biochemistry* **1991**, *23*, 1175–1183, doi:10.1016/0020-711X(91)90213-7.
84. Ronquist, G.; Andersson, A.; Bendsoe, N.; Falck, B. Human epidermal energy metabolism is functionally anaerobic. *Exp Dermatol* **2003**, *12*, 572–579, doi:10.1034/j.1600-0625.2003.00018.x.
85. Freinkel, R.K. Metabolism of Glucose-C-14 by Human Skin In Vitro\*\*From the Dermatological Research Laboratories of the Department of Dermatology, Harvard Medical School at the Massachusetts General Hospital, Boston 14, Massachusetts. *Journal of Investigative Dermatology* **1960**, *34*, 37–42, doi:10.1038/jid.1960.7.
86. Horn, F. *Biochemie des Menschen. Das Lehrbuch für das Medizinstudium*, 2., korrigierte Aufl.; Thieme: Stuttgart, New York, 2003, ISBN 3-13-130882-6.
87. Gillies, G.T.; Wilhelm, T.D.; Humphrey, J.A.C.; Fillmore, H.L.; Holloway, K.L.; Broaddus, W.C. A spinal cord surrogate with nanoscale porosity for in vitro simulations of restorative neurosurgical techniques. *Nanotechnology* **2002**, *13*, 587–591, doi:10.1088/0957-4484/13/5/308.
88. Schimek, K.; Hsu, H.-H.; Boehme, M.; Kornet, J.J.; Marx, U.; Lauster, R.; Pörtner, R.; Lindner, G. Bioengineering of a Full-Thickness Skin Equivalent in a 96-Well Insert Format for Substance Permeation Studies and Organ-On-A-Chip Applications. *Bioengineering (Basel, Switzerland)* **2018**, *5*, doi:10.3390/bioengineering5020043.

89. Bao, H.; Hao, N.; Yang, Y.; Zhao, D. Biosynthesis of biocompatible cadmium telluride quantum dots using yeast cells. *Nano Res.* **2010**, *3*, 481–489, doi:10.1007/s12274-010-0008-6.
90. Zhang, H.; Cui, Z.; Wang, Y.; Zhang, K.; Ji, X.; Lü, C.; Yang, B.; Gao, M. From Water-Soluble CdTe Nanocrystals to Fluorescent Nanocrystal–Polymer Transparent Composites Using Polymerizable Surfactants. *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 777–780, doi:10.1002/adma.200304521.
91. Laurent, T.; Sundelof, L.-O.; Warmegard, B.; WIK, K.O. Diffusion of Dextran in Concentrated Solutions. *Eur J Biochem* **1976**, *68*, 95–102, doi:10.1111/j.1432-1033.1976.tb10767.x.
92. Alberti, M.; Dancik, Y.; Sriram, G.; Wu, B.; Teo, Y.L.; Feng, Z.; Bigliardi-Qi, M.; Wu, R.G.; Wang, Z.P.; Bigliardi, P.L. Multi-chamber microfluidic platform for high-precision skin permeation testing. *Lab on a chip* **2017**, *17*, 1625–1634, doi:10.1039/c6lc01574c.
93. Sriram, G.; Alberti, M.; Dancik, Y.; Wu, B.; Wu, R.; Feng, Z.; Ramasamy, S.; Bigliardi, P.L.; Bigliardi-Qi, M.; Wang, Z. Full-thickness human skin-on-chip with enhanced epidermal morphogenesis and barrier function. *Materials Today* **2017**, doi:10.1016/j.mattod.2017.11.002.
94. Schimek, K. *Towards a vascularized skin-on-a-chip Towards a vascularized skin-on-a-chip. Strategies to integrate human skin and vasculature equivalents into a multi-organ-chip platform.*
95. Dreher, F.; Patouillet, C.; Fouchard, F.; Zanini, M.; Messenger, A.; Roguet, R.; Cottin, M.; Leclaire, J.; Benech-Kieffer, F. Improvement of the Experimental Setup to Assess Cutaneous Bioavailability on Human Skin Models: Dynamic Protocol. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* **2002**, *15*, 31–39, doi:10.1159/000066683.
96. Casasco, A.; Casasco, M.; Zerbinati, N.; Icaro Cornaglia, A.; Calligaro, A. Cell proliferation and differentiation in a model of human skin equivalent. *The Anatomical record* **2001**, *264*, 261–272.
97. Boelsma, E.; Verhoeven, M.C.; Ponc, M. Reconstruction of a human skin equivalent using a spontaneously transformed keratinocyte cell line (HaCaT). *The Journal of investigative dermatology* **1999**, *112*, 489–498, doi:10.1046/j.1523-1747.1999.00545.x.
98. Johnson, M.E.; Blankschtein, D.; Langer, R. Evaluation of solute permeation through the stratum corneum: Lateral bilayer diffusion as the primary transport mechanism. *J. Pharm. Sci.* **1997**, *86*, 1162–1172, doi:10.1021/js960198e.
99. Mitragotri, S.; Edwards, D.A.; Blankschtein, D.; Langer, R. A mechanistic study of ultrasonically-enhanced transdermal drug delivery. *J. Pharm. Sci.* **1995**, *84*, 697–706, doi:10.1002/jps.2600840607.
100. Guth, K.; Schäfer-Korting, M.; Fabian, E.; Landsiedel, R.; van Ravenzwaay, B. Suitability of skin integrity tests for dermal absorption studies in vitro. *Toxicology in*

- vitro* : an international journal published in association with *BIBRA* **2015**, 29, 113–123, doi:10.1016/j.tiv.2014.09.007.
101. Knott, A.; Koop, U.; Mielke, H.; Reuschlein, K.; Peters, N.; Muhr, G.-M.; Lenz, H.; Wensorra, U.; Jaspers, S.; Kolbe, L.; et al. A novel treatment option for photoaged skin. *Journal of cosmetic dermatology* **2008**, 7, 15–22, doi:10.1111/j.1473-2165.2008.00356.x.
102. Kuo, I.-H.; Carpenter-Mendini, A.; Yoshida, T.; McGirt, L.Y.; Ivanov, A.I.; Barnes, K.C.; Gallo, R.L.; Borkowski, A.W.; Yamasaki, K.; Leung, D.Y.; et al. Activation of epidermal toll-like receptor 2 enhances tight junction function: implications for atopic dermatitis and skin barrier repair. *The Journal of investigative dermatology* **2013**, 133, 988–998, doi:10.1038/jid.2012.437.
103. Katharina Schimek. *Towards a vascularized skin-on-a-chip. Strategies to integrate human skin and vasculature equivalents into a multi-organ-chip platform*; Berlin, **2017**.
104. Freyman, T.M.; Yannas, I.V.; Pek, Y.S.; Yokoo, R.; Gibson, L.J. Micromechanics of fibroblast contraction of a collagen-GAG matrix. *Experimental cell research* **2001**, 269, 140–153, doi:10.1006/excr.2001.5302.
105. Freyman, T.M.; Yannas, I.V.; Yokoo, R.; Gibson, L.J. Fibroblast contraction of a collagen–GAG matrix. *Biomaterials* **2001**, 22, 2883–2891, doi:10.1016/S0142-9612(01)00034-5.
106. Tomasek, J.J.; Haaksma, C.J.; Eddy, R.J.; Vaughan, M.B. Fibroblast contraction occurs on release of tension in attached collagen lattices: dependency on an organized actin cytoskeleton and serum. *The Anatomical record* **1992**, 232, 359–368, doi:10.1002/ar.1092320305.
107. Wang, L.; Qin, G.; Geng, S.; Dai, Y.; Wang, J.-Y. Preparation of zein conjugated quantum dots and their in vivo transdermal delivery capacity through nude mouse skin. *Journal of biomedical nanotechnology* **2013**, 9, 367–376.
108. Ryman-Rasmussen, J.P.; Riviere, J.E.; Monteiro-Riviere, N.A. Penetration of intact skin by quantum dots with diverse physicochemical properties. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **2006**, 91, 159–165, doi:10.1093/toxsci/kfj122.
109. Saxton, M.J. Anomalous Subdiffusion in Fluorescence Photobleaching Recovery: A Monte Carlo Study. *Biophysical Journal* **2001**, 2226–2240, doi:10.1016/S0006-3495(01)75870-5.
110. Balci, O. Principles and techniques of simulation validation, verification, and testing, 147–154, doi:10.1145/224401.224456.
111. Kestin, J.; Sokolov, M.; Wakeham, W.A. Viscosity of liquid water in the range –8 °C to 150 °C. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* **1978**, 7, 941, doi:10.1063/1.555581.

112. Martin Greenspan; Carroll E. Tschiegg. Tables of the Speed of Sound in Water. *The Journal of the Acoustical Society of America* **1959**, 75–76. *The Journal of the Acoustical Society of America* **1958**, 31, 75.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

---

Name:	Hao-Hsiang Hsu	Geburtsort:	Berlin
Geburtsdatum:	04.09.1986	Nationalität:	deutsch

## Berufserfahrung

---

01/13 – 04/18	Technische Universität Hamburg Institut für Bioprozess- und Biosystemtechnik Wissenschaftlicher Mitarbeiter
---------------	---

## Bildungsweg

---

01/2013 - jetzt	Promotion zum Thema: Simulation und Charakterisierung von Diffusionsvorgängen in Hautmodellen in einem Multi-Organ-Chip
09/2010 - 09/2012	Technische Universität Hamburg Abschluss: Master of Science Studiengang: Medizingenieurwesen Thema: Untersuchung reaktionstechnischer Parameter zur Vermehrung glandulärer Stammzellen
09/2006 - 11/2010	Technische Universität Hamburg Abschluss: Bachelor of Science Studiengang: Allgemeine Ingenieurwissenschaft Vertiefungsrichtung: Medizingenieurwesen Thema: Biochemische und mikroskopische Methode zur Analyse von Internalisierung und Recycling eines Somatostatinrezeptors
08/2003 - 06/2006	Abschluss: Abitur