

**Lokale Ultraschall-vermittelte Zytostatika-Applikation
zur Behandlung von Hirntumoren**



**Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von
Ellina Schulz

Würzburg, 2022

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Dandekar

Gutachter: Prof. Dr. Carsten Hagemann

Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Schatzschneider

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis	6
2. Zusammenfassung	9
3. Abstract	10
4. Einleitung	11
4.1. Glioblastoma	11
4.1.1. Molekulare Ursachen zur Entstehung des GBM	11
4.1.2. Therapiemöglichkeiten bei GBM	12
4.1.3. Drug Delivery	15
4.1.4. Chemotherapeutika	18
4.2. Die Rolle der BHS beim GBM	20
4.2.1. Ultraschall	21
4.3. Microbubbles	23
4.3.1. Öffnung der BHS mittels Microbubbles und Ultraschall	23
4.3.2. Microbubbles als Drug Delivery Systeme	25
4.4. 3D-Zellkulturmodelle	26
4.5. Zielsetzung	29
5. Material und Methoden	30
5.1. Material	30
5.1.1. Geräte	30
5.1.2. Chemikalien und Medien	32
5.1.3. Verbrauchsmaterialien	35
5.1.4. Antikörper	37
5.1.5. Zelllinien	37
5.1.6. KITS	38
5.1.7. Software	38
5.1.8. Lösungen und Medien	38
5.1. Methoden	42
5.1.2. Microbubbles	42
5.1.2.1. MB-Synthese und Aufreinigung mittels Dialyse und Ionenaustausch- Chromatografie	42
5.1.2.2. Dox-Konzentrationsbestimmung in MBDOx mittels HPLC	45
5.1.3. 2D-Zellkultur	45
5.1.3.1. Kultivierung von GBM-Zelllinien	45

5.1.3.2.	Kultivierung von PZ.....	46
5.1.4.	3D-Zellkulturmodelle	46
5.1.4.1.	3D-SiSser-Modell.....	47
5.1.4.2.	Perfusionskammer.....	47
5.1.4.3.	Brain Slice Kulturen.....	49
5.1.4.3.1.	Präparation und Kultivierung	49
5.1.4.3.2.	Mikrotumoren.....	51
5.1.4.4.	Organoide	52
5.1.4.4.1.	Präparation und Kultivierung von Organoiden	52
5.1.4.4.2.	Markierung der Organoide mit Fluoreszenzfarbstoff.....	53
5.1.4.5.	Patientenkohorte.....	53
5.1.5.	Behandlungsschemata.....	54
5.1.5.1.	Behandlung mit MBDox + LIFU	54
5.1.5.2.	Behandlung mittels TTFields	56
5.1.6.	Analysemethoden.....	57
5.1.6.1.	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolimbromid (MTT)-Assay	57
5.1.6.2.	Proliferations- und Adhäsionsmessungen im xCELLigence® -System.....	58
5.1.6.3.	Lebend-Tod-Färbung	59
5.1.6.4.	Immunhistochemische Fluoreszenzfärbung.....	59
5.1.6.4.1.	Immunhistochemische Fluoreszenzfärbung von 2D-GBM-Zellkulturen.....	60
5.1.6.4.2.	Immunhistochemische Fluoreszenzfärbung von 3D-Zellkulturen	61
6.	Ergebnisse.....	64
6.1.	Microbubbles und deren Wirkung auf GBM-Zellen	64
6.2.	Wirkung von LIFU auf GBM-Zellen und MB	67
6.3.	Wirksamkeit von verschiedenen Chemotherapeutika auf GBM-Zellen und ihre Eignung zur Beladung von Microbubbles	68
6.4.	Beladung der Microbubbles mit Dox und Evaluierung der erfolgreichen Aufreinigung mittels HPLC.....	70
6.5.	Wirksamkeit von MBDox auf GBM Zellen in 2D-Zellkultur.....	73
6.6.	Wirksamkeit von MBDox auf GBM-Zellen in 3D SISser-Kultur	77
6.7.	Wirksamkeit von MBDox auf GBM-Zellen im Bioreaktor	78
6.8.	Etablierung von OHSC	80
6.9.	Humane GBM Slice-Kulturen	85
7.	Diskussion.....	87

7.1.	Wirksamkeit von MBDox auf 2D- und 3D-GBM-Modelle	89
7.2.	Eignung von Tumorschnitten als <i>ex vivo</i> Modell	94
7.3.	Ausblick auf die MBDox-Therapie	97
8.	Anhang	99
8.1.	Semiautomatisches Makro für immunhistochemische Färbung 2D-Zellkultur	99
8.1.1.	DAPI	99
8.1.2.	γ H2AX	99
8.2.	Semiautomatisches Makro für immunhistochemische Färbung der SISser	100
8.2.1.	DAPI	100
8.2.2.	γ H2AX	100
8.3.	Semiautomatisches Makro für Lebend-Tod-Färbung von GBM-Zellen in Perfusionskammer	101
8.4.	Semiautomatisches Makro zur Auswertung der humanen Tumorschnitte nach TTFields Applikation	102
8.4.1.	DAPI	102
8.4.2.	Ki67	103
8.5.	Bestätigung der Veröffentlichungs- und Lizenzierungsrechte	104
9.	Abbildungsverzeichnis	111
10.	Tabellenverzeichnis	117
11.	Literaturverzeichnis	118
12.	Danksagung	147
13.	Eidesstaatliche Erklärungen nach §7 Abs. 2 Satz 3,4,5 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie	148

1. Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional
BCNU	Bis-Chlorethyl-Nitroso Urea
BSA	Bovine Serum Albumin
BHS	Bluthirnschranke
CAR	Chimeric antigen receptor
CED	Convection-enhanced delivery
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DCS	Antikörperverdünnungspuffer
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPC	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3- phosphocholine
DSB	Doppelstrangbruch
DSPE-PEG2000	1,2-distearoyl-sn-glycero-3- phosphoethanolamine-N- [amino(polyethylene glycol)-2000]
DSPE-PEG5000	1,2-distearoyl-sn-glycero-3- phosphoethanolamine-N- [amino(polyethylene glycol)-5000]
EC₅₀	Mittlere effektive Konzentration
ECM	Extrazelluläre Matrix
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPR-Effekt	Permeabilitäts- und Retentions-Effekt
FCS	Fetal Calf Serum

FDA	Fluoresceindiacetat
FUS	Focused ultrasound
GBM	Glioblastoma
GelMA	Gelatin-methacryloyl
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GFP	Green Fluorescent Protein
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HIFU	High intensity focused ultrasound
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IC	Inhibitorische Konzentration
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
JAM	Junction adhesion protein
LAP	Lithium-Phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinat
LIFU	Low intensity focused ultrasound
LRP	Low density lipoprotein
NEAA	Non essential aminoacids
MB	Microbubble
MEM	Minimal Essential Medium
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-Methyltransferase
MHC II	Major histon complex II
MR	Magnetresonanz
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolimbromid
MW	Molekulargewicht
OHSC	Organotypic Hippocampal Slice Culture
OS	Overall survival
PBS	Phosphate Buffered Saline
PD-1	Programmed cell death protein 1
PEG	Polyethylenglykol
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd

PZ	Primärzellen
rpm	Revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
S1P	Sphingosine-1-Phosphat
SISser	Small intestine submucosa and serosa
TERT	Telomerase-reverse-Transkriptase
TTFields	Tumor Treating Fields
TME	Tumormicroenvironment
TMZ	Temozolomid
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling Assay
US	Ultraschall
UTMD	Ultrasound triggered microbubble destruction
UV	Ultraviolett
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZO	Zonula occludens
γH2AX	Phosphoryliertes Histon Familienmitglied X

2. Zusammenfassung

Glioblastoma (GBM) sind bösartige hirneigene Tumore, deren schlechte Prognose einer innovativen Therapie bedarf. Aus diesem Grund wurde ein neuer Therapieansatz entwickelt, der auf einer lokalen Ultraschall-vermittelten Zytostatika Applikation beruht. Hierfür wurden stabile Microbubbles (MB) bestehend aus Phospholipiden synthetisiert. Es konnte gezeigt werden, dass MB als auch fokussierter Ultraschall niedriger Intensität (LIFU) keinen negativen Einfluss auf GBM-Zellen hat. MB hingegen konnten mittels LIFU destruiert werden, wodurch das in den MB eingeschlossene Chemotherapeutikum freigesetzt werden kann. Es wurden verschiedene Platin(II)- und Palladium(II)-Komplexe auf GBM Zellen getestet. Zur Beladung der MB wurde Doxorubicin (Dox) verwendet. Es konnte eine Beladungseffizienz der MB mit Dox von 52 % erreicht werden, auch eine Aufreinigung dieser mittel Ionenaustausch-Chromatographie und Dialyse war erfolgreich. Die Austestung der mit Dox beladenen MB (MBDox) erfolgte auf GBM-Zellen in 2D- und 3D-Zellkulturmodellen. Dabei zeigte sich, dass die Behandlung mit MBDox und LIFU für 48 h eine zytotoxische Wirkung hatte, die sich signifikant von der Behandlung mit MBDox ohne LIFU unterschied. Zur Austestung der MBDox in 3D-Zellkulturmodellen wurden zwei Scaffold-Systeme eingesetzt. Es zeigte sich in den Versuchen, dass MBDox mit LIFU im Vergleich zu MBDox ohne LIFU Applikation einen zytotoxischen Effekt auf GBM-Zellen haben. Somit konnte die Wirksamkeit der Zytostatika Applikation mittels MB und LIFU in 2D- und 3D-Zellkulturmodellen erfolgreich etabliert werden. Als weiterer Schritt wurden zwei 3D *in vitro* Modelle erarbeitet. Dabei wurden zunächst organotypische hippocampale Slice Kulturen (*organotypic hippocampal brain slice cultures*, OHSC) aus der Maus hergestellt und anschließend mit fluoreszent-markierten Mikrotumoren aus GBM-Zelllinien, Primärzellen (PZ) und aus Patienten generierten GBM-Organoiden hergestellt. Diese GBM-Modelle wurden mit Tumor Treating Fields (TTFields) behandelt. Dabei war eine Abnahme der Tumorgröße von Mikrotumoren aus GBM-Zellen und PZ unter TTFields-Behandlung für 72 h messbar. Als weiteres *in vitro* Modell wurden humane Tumorschnitte aus intraoperativ entferntem GBM-Patientenmaterial hergestellt. Die Schnitte wiesen ein heterogenes Ansprechen nach 72 h TTFields-Applikation auf. Dies spiegelt die Heterogenität des GBM sehr gut wider und bestärkt die Eignung des Modelles zur Untersuchung von neuen Therapieansätzen zur Behandlung von GBM.

3. Abstract

Glioblastoma (GBM) are malignant brain tumor with a poor prognosis requiring innovative therapy. For this reason, a new therapeutic approach based on local ultrasound-mediated cytostatic application is now being established. For this purpose, stable microbubbles (MB) consisting of phospholipids were synthesized. It could be shown that MB as well as focused low intensity ultrasound (LIFU) had no negative effect on GBM cells. MB, on the other hand, could be destroyed by LIFU, allowing the release of the chemotherapeutic agent entrapped in MB. Different platinum(II) and palladium(II) complexes were tested on GBM cells. Doxorubicin (Dox) was used to load the MB. Loading efficiency of MB with Dox of 52% was achieved, and purification of these by ion-exchange chromatography and dialysis was also successful. Dox-loaded MB (MBDox) was tested on GBM cells in 2D and 3D cell culture models. This showed that treatment with MBDox and LIFU for 48 h had a cytotoxic effect that was significantly different from treatment with MBDox without LIFU. Two scaffold systems were used to test MBDox in 3D cell culture models. It was shown in the experiments that MBDox with LIFU had a cytotoxic effect on GBM cells compared with MBDox without LIFU application. Thus, the efficacy of cytostatic drug application using MB and LIFU was successfully established in 2D and 3D cell culture models. As a further step, two 3D in vitro models were developed. Here, organotypic hippocampal brain slice cultures (OHSC) were first prepared from mice and then with fluorescent-labeled microtumors from GBM cell lines, primary cells (PZ), and GBM organoids generated from patients. These GBM models were treated with tumor treating fields (TTFields). Thereby, a decrease in tumor size of microtumors derived from GBM cells and PZ was measurable under TTFields treatment for 72 h. As another in vitro model, human tumor sections were prepared from intraoperatively removed GBM patient material. The sections showed heterogeneous responses after 72 h of TTFields application. This reflects the heterogeneity of GBM very well and reinforces the suitability of the model to investigate new therapeutic approaches for the treatment of GBM.

4. Einleitung

4.1. Glioblastoma

Das Glioblastoma (GBM), ist der am häufigsten vorkommende hirneigene Tumor des zentralen Nervensystems (ZNS) bei Erwachsenen (Louis et al. 2016). Die molekularen Ursachen sowie Klassifizierung und mögliche Therapieansätze werden im Folgenden näher beschrieben.

4.1.1. Molekulare Ursachen zur Entstehung des GBM

Die 5. Edition der World Health Organisation (WHO) zur Klassifizierung von Tumoren des ZNS wurde 2021 veröffentlicht. Die Zuordnung erfolgt anhand von histologischen und molekularen Parametern. Ein Parameter stellt die Isocitrat-Dehydrogenase (IDH) dar, dabei spielen somatische Mutationen der Gene IDH1 und IDH2 eine entscheidende Rolle. Die Unterteilung erfolgt in IDH-Wildtyp und IDH-Mutante, wobei Tumoren mit einem IDH-Wildtyp häufig *de novo* bei vorwiegend älteren Patienten entstehen und mit einer schlechteren Prognose einhergehen (Louis et al. 2016; Villanueva-Meyer et al. 2018). Das pathologische Bild von Patienten mit IDH-Mutation zeigt eine geringere Proliferationsrate und weniger Nekrosen auf (Ohgaki und Kleihues 2013). Die Prognose fällt in diesem Fall besser aus (Louis et al. 2016). Das GBM fällt unter den „Erwachsenen-Typ der diffusen Gliome“ und wird dann als GBM bezeichnet, wenn es IDH-Wildtyp ist. Bei einem IDH-mutierten Tumor liegt ein Astrozytom vor, bei zusätzlicher Deletion im Chromosom 1p/19q handelt es sich um ein Oligodendrogliom. Als weitere diagnostische Faktoren werden Mutationen im Telomerase-reverse-Transkriptase (TERT)-Promotor, Aberationen in Chromosom 7 und 10 und EGFR-Amplifikationen herangezogen. Laut WHO liegt also dann ein GBM Grad 4 vor, wenn der Tumor IDH-Wildtyp ist und wenn mindestens einer oder mehr der folgenden Faktoren zutreffend sind: Mutation im TERT-Promotor, Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-Genamplifikation und/oder Zugewinn von Chromosom 7 und Verlust von Chromosom 10 (+7/-10) (Louis et al. 2016).

Insgesamt zeigt das GBM eine hohe Heterogenität, nicht nur inter- sondern auch intrapersonell (Aum et al. 2014).

4.1.2. Therapiemöglichkeiten bei GBM

Die Standardtherapie umfasst eine maximal mögliche chirurgische Resektion des Tumors, gefolgt von Radiotherapie in Kombination sowie folgender adjuvanter Behandlung mit Temozolomid (TMZ) (Stupp et al. 2005). Die operative Entfernung wird durchgeführt, um zum einen das Tumolvolumen zu verringern und zum anderen eine histologische Diagnose und Genotypisierung vorzunehmen (Tan et al. 2020). Folgend erhält der Patient eine Bestrahlung mit 60 Gray für 6 Wochen zusammen mit einer TMZ-gabe von 75 mg/m^2 und anschließender adjuvanter Monotherapie mit $150\text{-}200 \text{ mg/m}^2$ für 6 Zyklen (Stupp et al. 2005). Während bei der Bestrahlung ionisierende Strahlen die DNA der Tumorzellen beschädigen (Schmid und Multhoff 2012; Bouquet et al. 2006), methyliert TMZ die DNA und induziert so die Apoptose. TMZ wird vor allem bei Patienten mit methyliertem O⁶-Methylguanin-Methyltransferase (MGMT) eingesetzt (Mansouri et al. 2019; Hegi Monika E. et al. 2005). Unter der Standardbehandlung beträgt das Gesamtüberleben (*overall survival*, OS) 14,6 Monate, unter TMZ allein 12,1 Monate (Stupp et al. 2005). Allerdings hat die Behandlung mit TMZ auch systemische Nebenwirkungen, insbesondere hämatologische Toxizität unter denen die Patienten leiden (Perry et al. 2017). Für Rezidive hingegen gibt es keine Standardtherapie, hier wird patientenindividuell eine Behandlung mit Bestrahlung und/oder eine systemische Behandlung mit Bevacizumab und Lomustin angesetzt (Tan et al. 2020). Auch andere Chemotherapeutika wie Procarbazin und Vincristin werden eingesetzt, allerdings sind hier die toxischen Effekte sehr hoch (Carvalho et al. 2015; Schmidt et al. 2006).

Als zweite sehr gängige Therapie werden Tumor Treating Fields (TTFields) eingesetzt. Das Behandlungsprotokoll wird gemäß der EF14- Studie aus dem Jahr 2017 durchgeführt (Stupp et al. 2017). TTFields sind elektrische Wechselfelder mit mittlerer Frequenz (100-400 kHz) und niedriger Intensität (1-3 V/cm) (Giladi et al. 2015). Ionen, polare oder geladene Moleküle, Membranen und Organellen sind Hauptbestandteile von Zellen, diese sind sensitiv gegenüber elektrischen Feldern und Strömen (Kirson et al. 2007). Unter TTFields-Behandlung tritt Aneuploidie auf. Des Weiteren wird eine Reduktion der polymerisierten Mikrotubuli und Zerstörung von mitotischen Spindelstrukturen beobachtet, was letztendlich zu Chromosomenfehlverteilungen und zum Zelltod führt (Giladi et al. 2015). Der Zellarrest während der Proliferation als auch die Zerstörung der Zellen während der Zellteilung sind frequenzabhängig und finden in der Mitose statt (Kirson et al. 2004). Auch die Studie von Giladi et al. zeigte, dass die Wirkung von TTFields auf die Lebensfähigkeit und das klonogene Überleben von der Zellteilungsrate abhängig ist, somit kann die Wirksamkeit auf sich langsam teilenden Zellen durch eine verlängerte TTFields-Exposition erhöht werden (Giladi et al. 2015).

In der klinischen Anwendung wird das Optune System von Novocure Ltd. genutzt. Dieses umfasst einen 1,3 kg schweren Generator, der vom Patienten ständig mitgetragen werden muss. An diesem sind zwei Transducer-Arrays angeschlossen, die auf den rasierten Kopf des Patienten geklebt werden. Jeder dieser Transducer besteht aus 9 Keramikelektroden, über die das elektrische Wechselfeld appliziert wird. Mit einer Frequenz von 200 kHz wird einmal pro Sekunde das Feld zwischen den beiden Transducern gewechselt. Die Applikation sollte für mindestens 18 h am Tag erfolgen (Fonkem und Wong 2012; Wenger et al. 2018). Die Nebenwirkungen während der TTFIELDS-Behandlungen umfassen weitestgehend Hautirritationen aufgrund der Transducer-Arrays als auch Wärmeempfinden und neurologische Störungen (Mrugala et al. 2014). Zusätzlich gibt es auf Grund von Stigmatisierung auch Einschränkungen im sozialen Bereich, die die Lebensqualität von GBM-Patienten mindern (Onken et al. 2019). Die Behandlung von GBM-Patienten mit TTFIELDS in Kombination mit TMZ zeigte ein OS von 20,9 Monaten. Dies entspricht einer Verbesserung im Vergleich zur Monotherapie mit TMZ bei der das OS 16 Monate beträgt (Stupp et al. 2017). Die nicht-invasive TTFIELDS-Therapie wird zwar bereits erfolgreich in der Klinik eingesetzt, allerdings sprechen nicht alle Patienten gut darauf an. Auch wenn TTFIELDS einen Benefit erbracht haben, so war die Verbesserung der Überlebensrate bei GBM-Patienten in den letzten Jahren eher gering (Rominiyi et al. 2021) und die Prognose von Patienten mit GBM ist im Vergleich zu anderen Tumorentitäten eher schlecht (Buckner 2003; Stupp et al. 2005), Langzeitüberlebende sind die Ausnahme (Rabab'h et al. 2021).

Die Immuntherapie wird bereits bei vielen Tumorentitäten wie zum Beispiel zur Behandlung von Melanomen genutzt (Larkin et al. 2019). Hierbei wird das eigene Immunsystem genutzt, um die Tumorzellen zu erkennen und anzugreifen, dabei sollte eine Inflammation vermieden werden. Das GBM hingegen hat eine immunsupprimierte Umgebung, was die Immuntherapie erschwert, da die Antigenpräsentation herunterreguliert wird und infiltrierende Immunzellen ausgeschaltet werden (Liu et al. 2020). Um das Ziel, die Immunantwort gegen GBM-Zellen zu stimulieren, zu erreichen, gibt es mehrere Möglichkeiten: Checkpointinhibitoren werden eingesetzt, um Immuncheckpoints wie zum Beispiel cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4 (CTLA-4) und programmed cell death protein 1 (PD-1) zu hemmen und so einer Immunevasion der Tumorzellen entgegenzuwirken und die Immunantwort zu steigern (Wei et al. 2019). Erste Versuche bei der Behandlung von GBM zeigten eine hohe Toxizität (Omuro et al. 2018), jedoch keinen Benefit im progressionsfreien Überleben (NCT02667587) (Liu et al. 2020). Vakzine sollen die Immunantwort durch Stimulierung von antigenspezifischen Effektor-T-Zell-Reaktionen gegen Tumorantigene erleichtern. Allerdings scheiterte eine Phase-II-Studie

am fehlenden progressionsfreien Überleben aufgrund von Antigenescape innerhalb des Tumors (Weller et al. 2017). Auch virale Therapien hatten bislang keinen Erfolg (Liu et al. 2020). Ein vielversprechender Ansatz ist die *Chimeric antigen receptor* (CAR) T-Zell Therapie. Bei dieser personalisierten Krebstherapie werden T-Zellen genetisch verändert, sodass sie spezifisch an ein Antigen auf den Tumorzellen binden und dadurch eine Immunantwort auslösen (Thibodeaux und Milone 2019). Problematisch dabei ist das spezielle Tumormicroenvironment (TME) bei GBM-Patienten. Das TME ist definiert als komplexes Netzwerk aus verschiedenen Zelltypen, löslichen Faktoren, Signalmolekülen und Komponenten der extrazellulären Matrix, welche Einfluss auf die Tumorprogression haben (Catalano et al. 2013). Der *human epidermal growth factor receptor 2* (HER2) ist in vielen Tumorentitäten hoch exprimiert und gilt auch als geeignetes Tumorantigen zur CAR-T-Zell-Therapie bei GBM (Bagley et al. 2018). In Phase I Studien konnten erste Erfolge verzeichnet werden (Zhang et al. 2016). Als vielversprechendste Option gilt der *epidermal growth factor receptor* (EGFR), der in 40% der GBM exprimiert wird, wobei davon 50% der EGFR Variante III (EGFRvIII) entsprechen (Ekstrand et al. 1992). Einige Phase I als auch Phase II Studien laufen zur Behandlung von GBM-Patienten mit CAR-T-Zellen gegen EGFRvIII mit überwiegend positivem Output (Bagley et al. 2018). Doch auch bei diesem Therapieansatz gibt es Erschwernisse, die einer erfolgreichen Therapie im Wege stehen. Das immunsuppressive TME wurde bereits ausführlich erklärt, ebenso tragen die im Tumor herrschende Hypoxie (Wei et al. 2011), der Nährstoffmangel (Bagley et al. 2018), die geringe Verfügbarkeit an Aminosäuren (Howie et al. 2014) und die intrapersonelle Tumorheterogenität (Qazi et al. 2017) zum Misserfolg bei. Auch wenn die CAR-T-Zell-Therapie bei GBM noch in frühen klinischen Studien steckt, so sind die Ergebnisse in Bezug auf Durchführbarkeit, Sicherheit und Wirksamkeit vielversprechend (Bagley et al. 2018). Als letzte Möglichkeit wäre noch die Targeted Therapy anzubringen. Bei dieser personalisierten Therapie werden in GBM häufig mutierte Signalwege, wie RTK/Ras/PI3K, p53 und Retinoblastom Protein, direkt mit *small molecule Inhibitors* oder monoklonalen Antikörpern angegriffen (Bagley et al. 2018). Allerdings stellt für die meisten Inhibitoren die Bluthirnschranke ein unüberwindbares Hindernis dar.

4.1.3. Drug Delivery

Eine neue Perspektive zur Behandlung von GBM bieten etwas unkonventionellere Drug Delivery Systeme. Diese überzeugen durch ihre teils nicht invasive Verabreichung und geringere Nebenwirkungen (Cha et al. 2020).

Konventionelle Chemotherapeutika haben in der Regel eine geringe Biostabilität, eine niedrige Zirkulationsrate und wirken unspezifisch, zudem stellt die Bluthirnschranke (BHS) eine Hürde dar. Nanomaterialien können diese Hürde überwinden und in höherer Konzentration am Zielort wirken (Nam et al. 2018). Insbesondere *nanoscale carrier* können die Permeabilität der BHS vergrößern. Ein Beispiel hierfür sind Gold-Nanopartikel, die mit verschiedenen Funktionsliganden gekoppelt werden können. Die Liganden werden im GBM vorliegenden sauren pH enzymatisch gespalten. Durch diese chemische Reaktion (*click-cycloaddition*) entsteht ein Endprodukt, welches die BHS überwinden kann und nicht exozytiert wird. Zusätzlich kann Doxorubicin (Dox) als weiterer pH-sensitiver Linker an die Nanopartikel gekoppelt werden (Ruan et al. 2016). Ein weiteres Beispiel ist die Kombination von *brain-tumor-targeted* Peptiden und *cell membrane targeted* Peptiden. Diese Tandem-Nanomicellen sorgen für einen synergistischen Effekt, indem sie zum einen auf ein im GBM hoch exprimiertes Protein, z.B. *low density lipoprotein 1* (LRP1), zielen und zeitgleich die BHS mittels dem zellpenetrierenden Peptid TAT überwinden können. Zusätzlich konnte in *in vitro* Versuchen Docetaxel in die Mizellen als Chemotherapeutikum integriert werden (Zhu et al. 2018). Neben Nanomaterialien werden auch *cellular carrier* verwendet. Dabei werden Chemotherapeutika von Zellen oder Membranen eingeschlossen und zum Tumor befördert. Hierfür können Leukozyten, Erythrozyten, Plättchen, Stammzellen oder extrazelluläre Vesikel genutzt werden (Cha et al. 2020). In einem *in vivo* Versuch wurde liposomales Paclitaxel in isolierte Neutrophile integriert und als „trojanisches Pferd“ Mäusen intravenös verabreicht (Xue et al. 2017).

Auch Drug Delivery Systeme müssen die BHS überwinden können. Hierzu gibt es mehrere Möglichkeiten, eine davon ist die Öffnung mittels Ultraschalles, wie sie in 4.3. beschrieben wird. Darüber hinaus gibt es auch die osmotische Öffnung mittels Mannitol (Lesniak et al. 2019) oder die Verwendung von biochemischen Signalmolekülen (Wen et al. 2020). Hyperosmolare Lösungen wie Mannitol führen zu einem schnellen Schrumpfen der Endothelzellen, wodurch die Barriere der Tight Junction (TJ) beschädigt wird und die Permeabilität der BHS erhöht wird. Dies ermöglicht ein schnelles Öffnen der BHS (Burks et al. 2021). Der endotheliale Sphingosine-1-Phosphat (S1P) Rezeptor 1 ist an ein G-Protein

gekoppelt und trägt zur Permeabilität der BHS bei. Ein defekter Rezeptor te in Mausexperimenten eine durchlässige BHS. Somit besteht die Möglichkeit durch gezielte Inhibition des S1P-Rezeptors die BHS zu öffnen (Yanagida et al. 2017)

Die lokale Drug Delivery Applikation versucht die weiten Wege von Injektionsstelle zum Tumor zu verkürzen und so den Abbau oder die Aufnahme von nicht spezifischen, aber besonders gut durchbluteten Organen wie Herz, Niere und Leber zu vermeiden, um somit die Nebenwirkungen zu minimieren (Cha et al. 2020; Han et al. 2017; Nam et al. 2018). Ein möglicher Weg ist die intranasale Verabreichung und Aufnahme von Chemotherapeutika über die olfaktorische Mukosa (Zhang et al. 2020b). Zwar kann so die BHS umgangen werden, allerdings ist das Volumen der zu verabreichenden Lösung stark begrenzt. Zudem zeigten sich Nebenwirkungen wie die Schädigung der Mukosa (Cha et al. 2020).

Feste Implantate stellen eine invasive Methode zur Behandlung von GBM dar. Eine bekannte Technik sind die *Gliadel Wafer*. Diese implantierbaren Plättchen sind etwa 1 cm im Durchmesser und bestehen aus semi-flexiblem, biologisch-degradierbarem Polymer. Die Chemotherapeutika Carmustin bzw. Bis-Chlorethyl-Nitroso Urea (BCNU) lassen sich prozentual, je nach Körpergewicht, integrieren (Bregy et al. 2013). Die Beladungseffizienz ist sehr hoch und entspricht bei BCNU dem 100-fachen im Vergleich zur systemischen Applikation (Bregy et al. 2013). Das Chemotherapeutikum wird entlang des Konzentrationsgradienten langsam freigesetzt (Han und Park 2020). Der Vorteil hierbei ist, dass die systemische Toxizität gering ist und die Halbwertszeit des Chemotherapeutikums vernachlässigt werden kann (Dyke et al. 2007; Prager et al. 2000). Die Nachteile sind, neben den hohen Kosten, vor allem die Nebenwirkungen wie Krämpfe, zerebrale Ödeme und Infektionen. Zwar konnte das mittlere Überleben erhöht werden, allerdings finden die *Gliadel Wafer* in der Klinik nur selten eine Anwendung, da es zu Artefakten im MRT kommt, die Wundheilung gestört ist und das rigide Material sich nicht der Resektionshöhle des Tumors anpasst (Gallego et al. 2007). Alternativ können auch Polyester-Nanofaser-Kompositionen (Ramachandran et al. 2017) oder Hydrogele (Lim et al. 2019; Bastiancich et al. 2016) verwendet werden. Als weitere invasive Methode wird die direkte intratumorale Injektion von *drug-loaded* Vesikeln genutzt. Hierbei können hohe Konzentrationen direkt appliziert werden, wodurch die Toxizität zu Nicht-Tumorzellen minimiert wird (Kim et al. 2016). Allerdings ist diese Anwendung klinisch limitiert, da sie Blutungen, Entzündungen und neuronale Schäden hervorrufen kann (Cha et al. 2020). Um ein größeres Volumen injizieren zu können, wird der Konvektions-beschleunigte Transport (*convection-enhanced delivery*, CED) genutzt. Dabei wird mit einem Mikrokatheter,

der an einer Pumpe angeschlossen ist, das Medikament tief und ohne Rückfluss in die Tumorzelle injiziert. Zwar bestätigte die klinische Anwendung die Sicherheit und Durchführbarkeit, allerdings zeigte sich hierbei kein Benefit im Überleben (Kunwar et al. 2010; Vogelbaum und Aghi 2015). Zur Verbesserung dieser Methode wurden liposomale Verbindungen eingesetzt. Eine Ummantelung der Nanopartikel bzw. Chemotherapeutika mit Polyethylenglykol (PEG) führte zu einer verbesserten Aufnahme, Verteilung und Retention bei der CED auf (Han und Park 2020).

Allgemein wird vermehrt an liposomalen Chemotherapeutika gearbeitet. Per Definition sind Liposome nicht toxische, sich selbstorganisierende Strukturen aus Phospholipiden, die innerhalb ihrer uni- oder multilamellaren Schicht hydrophobe oder hydrophile Wirkstoffe einschließen können (Amoabediny et al. 2018; Pencer et al. 2001). Sie reichen von einer Größe von 20 nm bis hin zu mehreren μm (Zhang und Lemay 2019). Unter dem Begriff der Liposomen fallen auch Nanobubbles (NB) und Microbubbles (MB). NB sind etwa 200-300 nm groß und können extravasieren. Dadurch werden sie gerne zur Bildgebung bei Ultraschall eingesetzt (Exner und Kolios 2021). Aber auch in Drug Delivery Systemen werden sie vermehrt verwendet. Pilotstudien in der Maus zeigten den Erfolg von NB als Vesikel zum Transport von Dox mittels Eisenplatinum. Durch Einsatz von High Intensity Ultrasound konnten die NB die BHS passieren und zerplatzen, wodurch sie das Dox frei setzen konnten (Chan et al. 2021). Der Vorteil von NB ist, dass sie aufgrund ihrer Größe den Tumorzellenraum erreichen und sich dort anlagern können (Permeabilitäts- und Retentions-Effekt, EPR-Effekt) (Maeda 2015; Shen et al. 2019). Dadurch eignen sie sich besonders gut für die Bildgebung von Tumoren. MB, die bislang Standard bei der Ultraschallabbildung waren, sind größer als 1 μm und fallen nicht unter den EPR-Effekt (Shen et al. 2019). Dafür lassen sie sich jedoch gut als Drug-Delivery-System nutzen.

4.1.4. Chemotherapeutika

Als Chemotherapeutika werden verschiedene Substanzen eingesetzt, welche sich in alkylierende Agenzien, Antimetabolite, Anthracycline und Topoisomerase-Inhibitoren unterteilen lassen (Tacar et al. 2013). Das in der Standardtherapie beim GBM eingesetzte TMZ ist mit einem Molekulargewicht von 194,154 g/mol ein kleines, lipophiles alkylierendes Agens, welches unter physiologischen Bedingungen die Purinbasen O⁶-Guanin, N⁷-Guanin und N³-Adenin der DNA methyliert (Ortiz et al. 2021). Die Methylierung von O⁶-Guanin führt zu einem Mismatch mit der Pyrimidinbase Thymin. Diese Fehlpaarung kann während des Zellzyklus von DNA-Reparaturmechanismen erkannt und beseitigt werden (Pawlowska et al. 2018). MGMT ist ein solches DNA-reparierendes Protein und kann Guanin wieder demethylieren (Belanich et al. 1996; Pawlowska et al. 2018; Raghavan et al. 2020). Wird der Mismatch jedoch nicht erkannt, so geht die Zelle aufgrund der geschädigten DNA in die Apoptose (Pawlowska et al. 2018). MGMT wirkt der Methylierung von TMZ entgegen und kann eine Resistenz gegenüber dem Chemotherapeutikum aufbauen (Raghavan et al. 2020; Belanich et al. 1996). Der Methylierungsstatus von MGMT hat somit einen entscheidenden Einfluss auf die Therapie und wird als prognostischer Marker eingesetzt (Mansouri et al. 2019). Patienten mit einem methylierten MGMT-Promotor profitieren von einer TMZ-Verabreichung, Patienten mit unmethyliertem MGMT-Promotor hingegen nicht, da das aktive MGMT die alkylierende Wirkung von TMZ aufhebt (Hegi Monika E. et al. 2005). Die durch TMZ verursachte Fehlpaarung in der DNA kann nicht erkannt und repariert werden, da der MGMT-Promotor methyliert und somit inaktiv ist. Dies führt zum Zelltod der GBM-Zellen und zu einer erfolgreichen Therapie (Raghavan et al. 2020).

Dox, ein rot pigmentierter Stoff aus *Streptococcus peuvetius* (Arcamone et al. 1969), ist ein Anthracyclin, welches derzeit eines der am häufigsten eingesetzte Chemotherapeutika in der Krebstherapie ist und in der Klinik auch unter dem Namen Adriamycin bekannt ist (Tangpong et al. 2006). Es interkaliert mit der DNA und hemmt die Topoisomerasen I und II, was schließlich zur Apoptose führt. Es zählt zu den nicht selektiven Anthracyclinen und besteht aus einem heterozyklischen Ring mit Chinin-Hydrochinon benachbarten Gruppen und kurzen Methoxy-Substituentenseitengruppen gefolgt von einer Carbonylgruppe. Die Zuckergruppe ist durch glykosidische Bindungen (3-Amino-2,3,4,-trideoxy-L-fucosyl) an einem der Ringe befestigt (Tacar et al. 2013). Die Interkallation mit der DNA erfolgt über die Bindung der Topoisomerase-Enzyme I und II (Bodley et al. 1989). Die Apoptose wird ausgelöst, wenn der Versuch der DNA-Reparatur misslingt oder wenn die DNA- und RNA-Polymerasen aufgrund der Interkalation geblockt werden (Tewey et al. 1984; Zhang et al. 2012b). Dox hat eine hohe

Affinität zu cytoplasmatischen Proteasomen und bindet es an die 20S-Untereinheit des Proteasoms. Dies führt zur Translokation über die Nukleoporen zum Zellkern. Die Bindungsaffinität zur DNA ist höher als zu Proteasomeinheiten, sodass Dox bevorzugt an die großen Furchen der DNA bindet (Yang et al. 2014). Es liegt auch eine leichte Bindungsaffinität zu mitochondrialer DNA vor (Ashley und Poulton 2009) sowie zu cytoplasmatischen Proteinen, wodurch es zur enzymatischen Reduktion von Dox kommt, was die Freisetzung von Radikalen verursacht. Dies ist der Grund für die toxischen Nebenwirkungen von Dox. Der exakte Wirkmechanismus ist abhängig von der Konzentration, Therapiedauer und der zu behandelnden Krebsart (Cutts et al. 2005). Doxorubicinol, der Metabolit von Dox, kann an Plasmaproteine binden und so über passive Diffusion in den Zellkern gelangen (Tacar et al. 2013). Der Abbau von Dox erfolgt über die Leber. Die Biotransformation von Dox und Doxorubicinol erfolgt über die stereospezifische Reduktion der Ketone an der C-13 Bindung. Dafür sind zwei Enzyme wichtig, zum einen die Aldoketoreduktase und zum anderen die ubiquitäre zytoplasmatische Carboxyl-Reduktase. Diese führen eine Reihe von Reaktionen durch: hydrolytische glykosidische und reduktive Spaltung, O-Sulfatierung, O-Demethylierung, O-Glucuronidierung. Dabei wird die glykosische Bindung des Zuckers durch säurekatalytische Hydrolyse eliminiert (Tacar et al. 2013).

Da Dox kein tumorspezifisches Target hat, können auch andere Nicht-Tumorzellen angegriffen werden. Dies hat zur Folge, dass das Immunsystem unterdrückt wird und der Patient so anfälliger für Infektionen ist. Besonders Herz (Al-Malky et al. 2020), Niere (Yemm et al. 2019), Leber (Prasanna et al. 2020) und Gehirn (Tangpong et al. 2006) sind von den toxischen Nebenwirkungen betroffen. Der Effekt auf das Gehirn kommt nur indirekt zustande, da Dox die BHS aufgrund seines Molekulargewichts und seiner lipophilen Unlöslichkeit nicht passieren kann (Geldenhuis et al. 2015).

Dox wird in erster Linie in der Therapie gegen Brustkrebs eingesetzt, findet seine Anwendung aber auch in der Behandlung von Lymphomen, Leukämie, Lungenkrebs und pädiatrischen Tumoren (Rivankar). In der Klinik wird es auch als Doxil oder Myocet, einer liposomalen Form von Dox eingesetzt, um eine unspezifische Organtoxizität zu vermeiden (Abraham et al. 2005).

4.2. Die Rolle der BHS beim GBM

Die BHS ist eine selektiv durchlässige Schranke zwischen dem zirkulierenden Blut und dem Hirn-Microenvironment und reguliert streng den Austausch von Molekülen (Profaci et al. 2020). Sie ist geformt aus einem Endothelmonolayer, welcher von Pericyten und perivaskulären Astrocyten umhüllt und durch TJ verlinkt ist (Greene et al. 2019). TJs schließen den parazellulären Zwischenraum der Endothelzellen und erhalten deren Integrität in der Vaskulatur des Gehirns aufrecht (Angelow et al. 2008). Sie limitieren die Diffusion zwischen Hirn und Blut (Anderson und van Itallie 2009). So können ungewollte und potenziell schädliche Substanzen ferngehalten werden (Abbott et al. 2006). Zeitgleich stellt diese schützende Barriere auch eine Hürde für Therapeutika dar. Rund 95 % aller small therapeutics können die BHS nicht passieren (Greene et al. 2019). Verantwortlich dafür sind die Proteine der TJ (Furuse 2010). Die Integral-Komponenten der TJ sind Claudin 1, 3, 5, und 12, sowie Occludin (Greene et al. 2019) und funktionelle Adhäsionsproteine (junctional adhesion protein, JAMs). Besonders Claudin 5 ist in Endothelzellen hoch exprimiert (Ohtsuki et al. 2007). Claudin und Occludin sind durch ihre Interaktion direkt verantwortlich für die Permeabilität der TJ (Abbott et al. 2006). Claudin und Occludin liegen apical und werden durch Zonula Occludens (ZO)-1 am Aktin-Cytoskelett verankert (Greene et al. 2019; Branca et al. 2019). PECAM-1 und VE-Cadherin hingegen sitzen an der basolateralen, dem Gehirn zugewandten Seite (Greene et al. 2019) (Abbildung 1). Durch die TJ werden also Moleküle ab einer Größe von 800 Da zurückgehalten (Nitta et al. 2003). Allerdings gibt es auch Möglichkeiten die BHS zu durchbrechen und kurzzeitig zu öffnen:

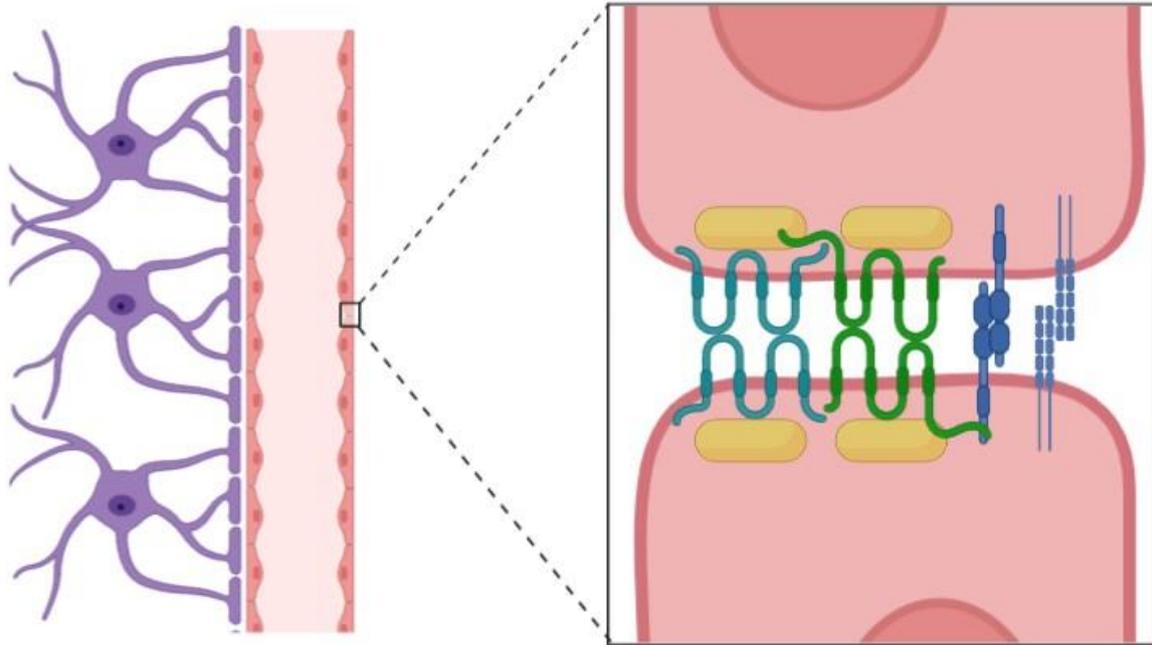


Abbildung 1: Aufbau der BHS. In der Vergrößerung sind die TJ-Proteine Occludin (blau), Claudin (grün) als auch JAM (dunkelblau) mit ZO-1 (gelb) und Cadherin (violett) zu sehen. BHS= Blut-Hirn-Schranke, JAM= junctional adhesion protein, TJ= Tight Junction, ZO-1= Zonula Occludens-1. Quelle: Created with Biorender 2022, eigene Darstellung

Lange Zeit herrschte die Auffassung, dass die BHS in der Nähe von Hirntumoren geschädigt ist (Long D. M. 1970) und das Tumorwachstum die Vaskulatur und somit auch die Integrität der BHS verändert (Kane 2019). Dabei konnte eine erniedrigte Expression von Claudin 5 und Occludin in den Tumormikrogefäßen nachgewiesen werden (Liebner et al. 2000). Allerdings zeigen neuere Aufnahmen im Bereich von malignen Gliomen mehrere Gefäße mit erhaltener BHS, welche umgeben sind von Tumorzellen (Pacioni et al. 2019). Dies erklärt auch die limitierte Aufnahme von Chemotherapeutika durch Tumorzellen (Etame et al. 2012).

4.2.1. Ultraschall

Mechanische Wellen, die durch Kompression und Refraktion von Molekülen in einem Medium (z.B. Luft, Wasser, Gewebe) entstehen und in der Lage sind eine Welle auszubreiten, werden als Schall definiert (O'Brien 2007; Darrow 2019). Als Ultraschall bezeichnet man Schall ab einer Frequenz von 20 kHz, was außerhalb des Hörvermögens des menschlichen Ohres liegt. Ultraschallwellen werden zur Bildgebung im menschlichen Körper genutzt. Treffen Ultraschallwellen auf Gewebsgrenzen, so werden sie reflektiert und können zu einem Bild ausgewertet werden. Die Reflektion der Wellen ist abhängig von der akustischen Impedanz an den Gewebsgrenzen. Die akustische Impedanz ist definiert als Produkt aus der Dichte des

Mediums und der Schallgeschwindigkeit des Mediums, d.h. die Widerstände in Form von Medium, Übergänge zwischen Medien und Flächen haben Einfluss auf die Ausbreitung der Schwingungen und somit auf die Reflexion und Bildgebung. Blut und Wasser besitzen eine ähnliche Impedanz, die akustische Impedanz von Gas hingegen unterscheidet sich von diesen. Die Ausbreitung und Reflektion der Ultraschallwellen bieten ein großes Echo zwischen den Grenzübergängen von Blut/Wasser zu Gas. Mit Gas gefüllte Vesikel (MB) eignen sich daher gut als Kontrastmittel und ermöglichen ein Monitoring in Echtzeit. Ultraschall kann auch verwendet werden, um das in den MB befindliche Gas freizusetzen (Fix et al. 2015).

Es gibt zwei Arten von akustischer Kavitation. Während die stabile akustische Kavitation eine persistierende Oszillation der MB auslöst und durch den anliegenden Druck das Gas langsam aus den MB diffundieren kann (Bader und Holland 2013), sind MB unter transienter Kavitation durch die hohe Amplitude der Schallwellen einem hohen Druck ausgesetzt, woraufhin sie kollabieren und fragmentieren (Chomas et al. 2001).

Neben der Bildgebung und zur Öffnung der BHS wird fokussierter Ultraschall (FUS) auch zur Therapie eingesetzt. Bei FUS wird die Energie auf einen Punkt konzentriert. Zur genaueren Applikation wird er oft mit der Magnetresonanz (MR) kombiniert (MR-guided FUS therapy) und zur Öffnung der BHS, Therapeutika-Applikation, Neuromodulation und Thrombolyse verwendet (Harary et al. 2018). Bei höheren Intensitäten, sprich beim *high-intensity focused ultrasound* (HIFU), können höhere Temperaturen generiert werden, welche Proteine denaturieren und Gewebe koagulieren (Darrow 2019). Diese hohe Temperatur kann zur Ablation von Nierensteinen und cranialen Tumoren, aber auch zum Zufügen von irreversiblen funktionalen Hirnläsionen genutzt werden (Elias et al. 2013; Evans et al. 2007). Bei Ultraschall mit niedrigen Intensitäten (*low-intensity focused ultrasound*, LIFU) sind die Temperaturschwankungen eher gering (Wahab et al. 2012). LIFU wird zur Neuromodulation ohne pathologische Veränderungen eingesetzt (Darrow 2019).

4.3. Microbubbles

MB werden durch ihren Gaskern und der Hülle aus Proteinen, Phospholipiden oder Polymeren definiert (Park et al. 2012). Die historische Entwicklung der MB unterteilt sich in drei Generationen. MB der ersten Generation sind einfache Luftbläschen, in der zweiten Generation wird der Luftkern von einer Schicht aus Proteinen, Tensiden oder Polymeren umhüllt. Die dritte Generation besitzt einen Gaskern, der physiologisch inert ist und sich in Blut nur schlecht lösen lässt (Zhao et al. 2013). MB mit einer Phospholipidhülle bilden in wässriger Umgebung einen dünnen und flexiblen Monolayerfilm aus, d.h. die hydrophoben Schwänze der Lipide zeigen in das Innere der MB, während die Köpfe dem Medium zugewandt sind (Pal et al. 2018). Die Stabilität wird durch die stark kondensierte Struktur aus gesättigten Fettsäuren gewährleistet. Gesättigte Fettsäuren weisen keine Doppelbindungen zwischen den Kohlenstoffatomen in der langen Kette auf, anders als bei ungesättigten Fettsäuren, welche aus mindestens einer Doppelbindung bestehen. 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC), als auch 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol)] (DSPE-PEG) zählen zu den gesättigten Fettsäuren. DSPE-PEG erhöht zusätzlich die Blutzirkulationsdauer von Liposomen (Zhang et al. 2012a).

4.3.1. Öffnung der BHS mittels Microbubbles und Ultraschall

Die Öffnung der BHS mittels US und MB kann auf drei Mechanismen zurückgeführt werden (Dasgupta et al. 2016). Der erste Mechanismus zur Öffnung der TJ wird als *push-pull mechanism* zusammengefasst. Beim Schrumpfen der MB während der Kompressionsphase kann es zur Einstülpung der Gefäßauskleidung kommen (Abbildung 2A). Die Expansion der MB in der Nähe von Gefäßen kann die endotheliale oder zelluläre Auskleidung der Gefäße auseinander drücken (Abbildung 2B). Der zweite Mechanismus beschreibt die Entstehung von Mikroströmen, die durch das schnelle Zusammenziehen und die Expansion der MB entstehen. Die sogenannten *fluid flow patterns* induzieren höhere Scherkräfte bis zu mehreren tausend Pascal, wodurch die Integrität der Endothelschleimhaut gestört werden kann. Unter den letzten Mechanismus fallen zwei biophysikalische Effekte, die die Zellmembran perforieren und eine vaskuläre Permeabilität induzieren. Die Absorption von US-Energie führt zu einem Druckgradienten und akustischen Strahlungskräften, welche die MB in Richtung der US-Wellen verschieben. Dadurch werden die MB gegen das Endothelium gedrückt, wobei die vaskuläre Permeabilität erhöht wird (Abbildung 2C). Andererseits kommt es bei der Kollabierung der MB zur Fragmentierung. Bei diesem Vorgang wird Energie in Form von

Wärme sowie ein hoher Druck in unmittelbarer Umgebung freigesetzt. Im Zusammenspiel mit den Stoßwellen kommt es zu einem Mikro-Jet Effekt, der die BHS öffnet (Abbildung 2D). Die BHS Permeabilisierung mittels US und MB hängt von verschiedenen Parametern ab. So spielt neben der Größe auch die Hülle der MB eine Rolle. MB mit einer Albuminhülle rufen einen größeren Schaden der Gefäßwände hervor als MB, die aus Lipiden bestehen. Der Schwellenwert der BHS-Permeabilität steigt linear mit der US-Frequenz. US mit einer niedrigen Frequenz zeigten in einer Studie weniger Gefäßschäden (Lentacker et al. 2014; Dasgupta et al. 2016; Wu und Nyborg 2008).

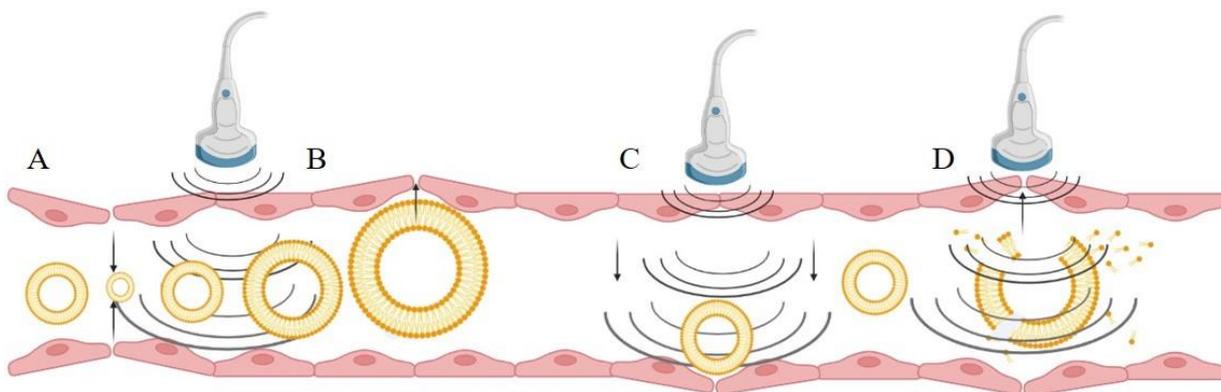


Abbildung 2: Prinzipien zur Öffnung der BHS mittels MB und Ultraschall. A) Kompression der MB führt zur Einstülpung der Gefäßauskleidung. B) Expansion der MB drückt Auskleidung der Gefäße nach außen. C) Vaskuläre Permeabilität wird durch die Verschiebung von MB aufgrund von Druckgradienten und Strahlungskräfte erhöht. D) Kollabierung der MB führt zu Freisetzung von Wärme, hohem Druck und zur Öffnung der BHS durch Mikro-Jet Effekte. BHS= Blut-Hirnschranke, MB= Microbubbles. Quelle: Created with Biorender 2022, eigene Darstellung

In einer präklinischen Studie konnte in einem *proof of principle* Experiment an Rhesus Affen gezeigt werden, dass die Verabreichung des Kontrastmittels Gaudolinium mittels MRT-gerichteter US-Applikation in spezifische Hirnregionen geleitet werden kann (McDannold et al. 2012).

In einer weiteren Studie wurde Ratten mit GBM Dox verabreicht und simultan US mit MB appliziert, sodass es lokal zur Öffnung der BHS kam. Dox, welches die BHS im Normalfall nicht passieren kann, konnte so zum Tumor gelangen (Treat et al. 2007).

4.3.2. Microbubbles als Drug Delivery Systeme

Unter Ultraschallapplikation oszillieren MB und können kollabieren, dieser Effekt ist in der Literatur unter *ultrasound triggered microbubble destruction* (UTMD) zu finden (Tinkov et al. 2009). UTMD hat zwei Effektebenen, zum einen wirkt es auf zellulärer Ebene. Zellen, in der Umgebung von UTMD entwickeln aufgrund von Mikrostromwirbelungen (Marmottant, P., & Hilgenfeldt, S. 2003), Mikrostrahlungen und Bildung von hydrodynamischen Stoßwellen Sonoporen (Miller und Quddus 2000; Guzmán et al. 2003), die 30 nm bis 100 nm groß sein können. Diese sind jedoch nur in der Zellmembran vorzufinden und reichen nicht in den Zellkern (Schlicher et al. 2006). Zum anderen ist ein Effekt auf die Mikrovaskulatur erkennbar, da die Permeabilität von Kapillaren erhöht wird (Tinkov et al. 2009). Bei zu langer Ultraschallapplikation und zu hoher MB-Konzentration kann es unter Umständen zu Blutungen kommen. So können polare Makromoleküle (Stieger et al. 2007), pDNA (Shimamura et al. 2004) oder Liposome (Treat et al. 2007), bis zu einer Größe von 9 nm durch die Wände der Blutgefäße transportiert werden. Moleküle bis zu 100 nm können sogar die BHS passieren (Tinkov et al. 2009). MB werden somit nicht nur zur Bildgebung eingesetzt, sondern werden auch als Drug Delivery System benutzt. Die Beladung der MB erfolgt via elektrostatischen oder hydrophoben Interaktionen, van der Waals Kräften oder durch physikalische Einkapsulierung, dies ist abhängig von der Syntheseart der MB (Tinkov et al. 2009). Generell unterscheidet man zwischen zwei Arten der Beladung. Beim *surface loading* erfolgt die Beladung auf der Oberfläche der äußeren Hülle. Dies ist bei MB aus Phospholipiden oder Proteinen der Fall (Lin et al. 2021). Beim *entire volume loading* wird der Hohlraum innerhalb der Hülle beladen (Tinkov et al. 2009). Der Vorteil der Beladung von MB mit Chemotherapeutika oder anderen Medikamenten liegt in der Abschirmung von der Umgebung (Jablonowski et al. 2017). So können Nebenwirkungen als auch Interferenzen fernab vom Zielgewebe minimiert werden. Trotz niedrigerer Dosierung kann die therapeutische Effektivität im Vergleich zu frei zirkulierendem Medikamenten gesteigert werden (Shi et al. 2021). Trotz der Vorteile gibt es auch limitierende Faktoren wie die begrenzte Beladungskapazität der MB als auch der geringe Anteil an MB, der tatsächlich am Zieltarget zerplatzt (Tinkov et al. 2009).

4.4. 3D-Zellkulturmodelle

Durch die intra- und interpersonelle Heterogenität von GBM, die sich nicht nur genetisch, auf Transkriptionsebene, zellulär und im Gewebeverband sondern auch in der Lokalisation des Tumors zeigt, ist es besonders herausfordernd, ein geeignetes Model zur Entwicklung von neuen Therapieansätzen und Medikamenten Screenings zu finden (Perrin et al. 2019). Bei der Standard 2-dimensionalen (2D) Zellkultur werden adhärenente Zellen auf einem meist aus Plastik bestehendem Untergrund in Medium mit Zusätzen als Monolayer kultiviert (Paolillo et al. 2021). 2D-Kulturen sind kommerziell verfügbar, sehr preiswert, einfach in der Handhabung, unbegrenzt vermehrbar und ethisch nicht verwerflich. Durch die Kultivierung von nur einem Zelltyp als Monolayer fehlt der Crosstalk von Tumorzellen zu umliegendem Gewebe und die Interaktion des TME (Paolillo et al. 2021). 3-dimensionale (3D) Zellkulturen sollen dieses Defizit ausräumen.

Das GBM Microenvironment besteht aus verschiedenen Zelltypen, die miteinander interagieren und so das einzigartige Mileu des GBM schaffen. Astrocyten sind hierbei am häufigsten vertreten und übernehmen wichtige Aufgaben wie die Diffusion von Substraten oder die Regulierung der Bioverfügbarkeit und Funktionalität von Neurotransmittern. Sie beeinflussen das GBM durch die Bereitstellung von perivaskulären Räumen, welche für die Invasion und Ausbreitung der Tumoren wichtig sind (Guan et al. 2018). Auch hirneigene Mikroglia, T-Zellen und infiltrierende Makrophagen, insbesondere Tumor-assoziierte Makrophagen, sind Bestandteile des GBM Microenvironment (Takenaka et al. 2019; Paolillo et al. 2021; Chen et al. 2017). Auch die extrazelluläre Matrix (*extra cellular matrix*, ECM), ein parazellulärer Raum, ist ein wichtiger Faktor bei der Untersuchung von GBM, da sie durch ihr physiologisches Gerüst und biochemische Signale das Wachstum und die Invasion reguliert (Sood et al. 2019).

Um diese Aspekte miteinbeziehen zu können, wurden multizelluläre 3D-Modelle entwickelt. Die Herstellung von Kokulturen ist ein sehr einfaches Modell. Dabei werden zwei verschiedene Zelltypen in der gleichen Kultur gehalten. Beispielsweise können GBM-Zellen und Mikroglia gemeinsam als 3D-tissue-like *in vitro* Modell gehalten werden (Leite et al. 2020). Die Kultivierung kann dabei in einer Gelmatrix, einem Hydrogel oder als Tropfen erfolgen, wobei die Zelltypen durch Selbstorganisation gewebeähnliche Strukturen ausbilden können (Paolillo et al. 2021). Sphäroide sind heterogene Aggregate aus verschiedenen Zelltypen, die nicht an einer Oberfläche gebunden sind, sondern in Suspension gehalten werden. Eine Kokultur aus GBM-Zellen mit Stroma-, Immun- oder Endothelzellen bildet eine gute physiologische Grundlage für ein *in vitro* Modell (Suvà und Tirosh 2020). Der Zell-Zell-Kontakt und die

Langzeitkultivierung sind hierbei von Vorteil für Hoch-Durchsatz Experimente (Akay et al. 2018).

Der Einsatz von starren oder nicht-starren Gerüsten ist ebenfalls beliebt. Hierbei soll eine gewebeähnliche Struktur mit definierter Porendichte und Größe erzeugt werden. Chitin ist ein beliebtes Gerüst für die Herstellung von Sphäroiden. GBM-Zellen lassen sich unter diesen Bedingungen gut kultivieren (Florczyk et al. 2013). Dabei konnten bislang Veränderungen im Expressionsmuster von Stammzellgenen, als auch eine erhöhte Resistenz gegenüber TMZ oder Dox beobachtet werden (Kievit et al. 2014). Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von biologischen Gerüsten, wie es in der Arbeit von Nietzer et al. als *small intestine submucosa and serosa* (SISser) beschrieben ist (Nietzer et al. 2016). Hierbei wurde ein dezellularisierter Schweinedarm verwendet, der zwischen zwei Metallkronen gespannt als starres Gerüst für kolorektale Tumorzellen diente. Die Tumorzellen wachsen in die Membran ein und bilden zusammen mit Fibroblasten eine Metastase-ähnliche Formation aus (Nietzer et al. 2016). Dieses Modell wurde bereits für vestibularis Schwannome, einem gutartigen Hirntumor des Gehörnervs, adaptiert und für ein Drug-Screening verwendet (Breun et al. 2020). Hydrogele werden meist als nicht-starres Gerüst verwendet. Sie bestehen aus wassergefüllten Materialien aus natürlichen oder synthetischen kreuz-verbundenen Polymeren und können mit Komponenten, die das Microenvironment widerspiegeln, supplementiert werden (Paolillo et al. 2021). Es konnte gezeigt werden, dass Hydrogele aus PEG, supplementiert mit Metalloproteasen als auch Hyaluronsäure die extrazelluläre Hirnmatrix gut imitieren können. Die GBM-Zelllinie U87 wurde in diesem Hydrogel kultiviert und analysiert. Dabei zeigte sich, dass Wachstum, Ausbreitung und Migration der U87-Zellen gefördert wurden und sich die Genexpression bezüglich der ECM-Proteine veränderte. Auch die Festigkeit des Hydrogels hatte einen Einfluss auf die GBM Proliferation, Morphologie und Migration (Wang et al. 2014). Neben einfachen Zelllinien können Hydrogele auch für GBM-Stammzellen verwendet werden (Truong et al. 2019).

Organoide stellen ein sehr vielversprechendes 3D-Modell dar. Zumeist werden sie aus selbstorganisierenden GBM-Stammzellen generiert und bilden die Tumorheterogenität und das Microenvironment ab (Jin et al. 2018). Eine Weiterentwicklung stellte Jacob et al. in seiner Arbeit vor, in der er ein aus Patientenmaterial generiertes Organoid-Modell beschreibt. Die Organoide stammen direkt aus intraoperativ entfernten GBM und reflektieren die histologischen Merkmale, zelluläre Diversität und das Mutationsprofil des jeweiligen Patienten. Das Modell bietet neben dem Drug Screening auch die Möglichkeit von Xenograft-Modellen,

da die Organoide sich in das Gehirn von Nagetieren einsetzen lassen und dort ein infiltratives Wachstum zeigen. Auch die Eignung zur Austestung von personalisierter Therapie wie zum Beispiel Immuntherapie und/oder CAR-T-Zellen konnte bestätigt werden (Jacob et al. 2020), da Organoide die Zellheterogenität und das TME gut imitieren (Paolillo et al. 2021).

Organotypische Hirnschnitte sind wie Organoide ein patientennahes 3D-Modell. Wobei es auch hier mehrere Möglichkeiten der Herstellung, Kultivierung und Gestaltung als GBM-Modell gibt (Paolillo et al. 2021). Hirnschnitte aus der Maus können für mehrere Wochen in Kultur gehalten werden und anschließend mit GBM-Stammzellen oder GFP-gekoppelten GBM-Zellen besiedelt werden, sodass Tumordinvasion untersucht werden kann (Marques-Torrejón et al. 2018; Pencheva et al. 2017). Integration von Mikrotumoren auf Basis von GBM-Zellen auf organotypischen hippocampalen brain slice Kulturen (OHSC) ermöglicht die Untersuchung von Gen- oder Proteinexpressionsmustern, Medikamenten Screening oder kann zur Analyse von Metastasen genutzt werden (Hagemann et al. 2013; Schulz et al. 2021). Auch humane Hirnschnitte, die aus intraoperativ gewonnenen Tumorproben hergestellt werden, stellen ein 3D-Modell dar, welches den *in vivo* Bedingungen sehr nahe kommt und nicht nur Heterogenität, sondern auch das Microenvironment widerspiegeln kann und so als Screeningtool für mögliche Therapieansätze dienen kann (Schulz et al. 2022 in Vorbereitung; Merz et al. 2013).

Als letztes 3D-Modell soll das Bioprinted Chip System vorgestellt werden. Die Methode ist an dem üblichen 3D-Druckersystem angelehnt. Dabei werden biologische Strukturen durch das zeitlich und räumlich verschiedene Anreihen von diversen lebensfähigen Zelltypen, Biomaterialien und biologischen Molekülen auf einer Matrix aufgedruckt. So kann man die gewünschte Mikroarchitektur und Umgebung erhalten (Yi et al. 2019). Durch das Einfügen und die spezielle Anordnung von Endothelzellen können auch pre-vaskuläre Strukturen aufgebaut werden, die den Transport von z.B. Nährstoffen nachbilden. Trotz der vielen, teils sehr gut adaptierten, 3D-*in vitro* Modelle, stellt die Integration der BHS in jedem der vorgestellten Modelle ein Problem dar, an dem gearbeitet werden muss (Paolillo et al. 2021).

4.5. Zielsetzung

Zur Behandlung von GBM-Patienten soll ein neuer Therapieansatz etabliert werden. Dabei handelt es sich um ein innovatives Drug Delivery System, welches MB aus Phospholipiden (Abbildung 3A) als Drug Carrier verwendet, die Chemotherapeutika einschließen (Abbildung 3B). Die beladenen MB sollen zukünftig dem Patienten intravenös injiziert werden und dann über den Blutfluss zum Ort des GBMs gelangen (Abbildung 3C). Dort werden mittels LIFU-Applikation die MB zum Oszillieren gebracht, wodurch sich nicht nur die BHS öffnet, sondern auch das Chemotherapeutikum aus den MB freigesetzt wird (Abbildung 3D). Auf diesem Wege kann die Behandlung von GBM lokal und gezielt erfolgen. Zusätzlich können durch die Abschirmung der Chemotherapeutika in den MB von der Umwelt systemische Nebenwirkungen minimiert werden.

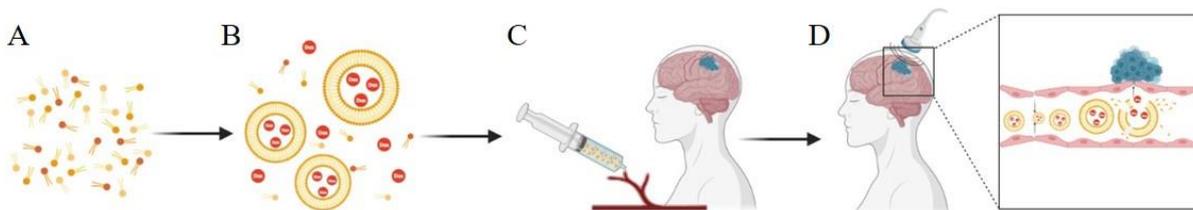


Abbildung 3: Prinzip und Ablauf der MB-Therapie. A) Phospholipide werden zur MB-Synthese genutzt. B) Bei der Synthese lagern sich die Lipide zu MB verschiedener Größen mit einem C_3F_8 -Kern an, dabei wird das frei liegende Dox (rot) in die MB integriert. C) Die MBDox-Lösung soll dem GBM-Patienten zukünftig intravenös injiziert werden. D) Mittels LIFU zerplatzen die im Blutkreislauf zirkulierenden MBDox im Tumor, öffnen die BHS und setzen Dox frei, sodass der Tumor lokal behandelt werden kann. GBM= Glioblastoma, LIFU= Low intensity focused ultrasound, MB= Microbubbles, MBDox= mit Dox beladene MB. Quelle: Created with Biorender 2022, eigene Darstellung

Ziel dieser Arbeit war es, stabile MB zu synthetisieren und zu charakterisieren. Zudem wurden die MB mit Chemotherapeutika beladen und anschließend aufgereinigt. Der Fokus lag dabei in der Austestung der beladenen MB auf GBM-Zellkulturmodellen. Hierzu wurden neben herkömmlichen 2D-Zellkulturmodellen auch neue 3D-Zellkulturmodelle etabliert und deren Eignung getestet. Diese Arbeit soll die Grundlage zur Überführung des Systems in den Tierversuch darstellen.

5. Material und Methoden

5.1. Material

5.1.1. Geräte

Tabelle 2: Verwendete Geräte

Name	Hersteller/Vertreiber
Agaroseform	Eigenbau
Benchtop pH Meter Lab 855	SI Analytics
CO₂-Inkubator HeraCell 240i	Thermo Fisher Scientific
Countess II Zählkammer	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific
Compresstome (Slicer)	Precisionary Instruments Inc
Countess™ II FL	Thermo Fisher Scientific
Cryocontainer	Nalgene®
Dampfgarer MultiGourmet	Braun
Drahtbügel	A. Hartenstein
Färberahmen	A. Hartenstein
Feinwaage	Sartorius/Kern
Feuchtkammer	Eigenbau
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr-International
Gewebeeinbettautomat mit Abschleudfunktion STP 120	Thermo Fisher Scientific
Glasschale	A. Hartenstein
Gummistopfen	A. Hartenstein
Homogenisator	A. Hartenstein
HPLC (LC-20AT)	Shimadzu
HPLC Autosampler (SIL-20AC)	Shimadzu
Inkubator	Thermo Scientific
Inovitro System	Novocure
Kamera: <ul style="list-style-type: none">• Leica DFC450 C• Leica DFC3000 G	Leica Mikrosystems
Kassetten mit Deckel Biopsie weiß	Resolab

Kühlblock /Eiszange	Precisionary Instruments
Kühlschrank (4 °C)	Liebherr-Deutschland
Laborflaschen <ul style="list-style-type: none"> • 100 ml • 500 ml • 1.000 ml 	A. Hartenstein
Magnetrührer mit Heizung MR 3001 K	Heidolph
Mappe für 20 Objektträger	Ceesem
Mechanischer Handzähler (Klicker)	A. Hartenstein
Messpipetten aus Glas <ul style="list-style-type: none"> • 5 ml • 10 ml 	A. Hartenstein
Metall-Einbettformen	Thermo Fisher Scientific
Mikroskop: <ul style="list-style-type: none"> • Hellfeldmikroskop • Mikroskop DMI3000 B 	Helmuth Hund Leica Microsystems
Mikrotom SM2000R	Leica Microsystems
Multipipette	Eppendorf
Neubauerzählkammer	A. Hartenstein
Nucleofector	Lonza
Objektträger-Kasten	neoLab
Orbitalshaker	fisherbrand
Paraffineinbettssystem	Medite
Pinsel	Stylex
Pinzetten	A. Hartenstein
Pipetten <ul style="list-style-type: none"> • Discovery Comfort und autoclavable • Eppendorf Reference • Eppendorf Research 	HTL Lab Solutions (PZ HTL) Eppendorf Eppendorf
Pipettierhilfe Akku-Jet-Pro	Brand
Präzisionswaage	Kern
Precision GP 20	Thermo Fisher Scientific
Reaktionsgefäßständer	A. Hartenstein

Ringe/Kronen	Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin, Universität Würzburg
Rührfisch	A. Hartenstein
Schüttler Rotamax 120	Heidolph
Schüttler	Heidolph
Sonikator (Vibra Cell)	Sonics&Materials
Sterilbank Herasafe	Heraeus Instruments
Stereolupe	
Stickstofftank	Messer-Griesheim
Tecan ELISA-Reader	Tecan
TTFields-Keramikscha	Novocure
Ultraschall Steuergerät und Verstärker	MRC Systems
Ultraschallkopf	MRC Systems
Vialmix	Eppendorf
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad HI 1210	Leica Mikrosystems
Wasserbad WTE	A. Hartenstein
Wärmebad	Thermo Scientific
Wärmeplatte mit Rührfunktion	Heidolph
xCELLigence® Real Time Cell Analyzer (RTCA)	OLS OMNI Life Science

5.1.2. Chemikalien und Medien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Medien

Name	Hersteller/Vertrieb
1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DPPC)	avanti
1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-[amino(polyethylen glycol)-5000] (DPSE-PEG5000)	avanti

1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-[amino(polyethylen glycol)-2000] (DSPE-PEG2000)	avanti
2'-[4-Ethoxyphenyl]-5-[4-methyl-1-piperazinyl]-2,5'-bi-1H-benzimidazol trihydrochlorid (Hoechst 33324)	Thermo Scientific
Agar Agar	Sigma-Aldrich Chemie
Agarose	Sigma-Aldrich Chemie
Amphotericin	Gibco/Life Technologies
Antikörper-Verdünnungspuffer (DCS)	Innovative Diagnostik-Systeme (Labiline)
B27 ohne Vitamin A (50x)	Gibco/Life Technologies
β-Mercaptoethanol	Gibco/Life Technologies
Bovine serum albumin (BSA) Fraktion V Solution (7,5 %)	Gibco/Life Technologies
Cell Proliferation KIT (MTT 1)	Roche
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie
Citronensäure	Merck
Destilliertes Wasser (Aqua dest.)	Gibco/Life Technologies
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie
Dowex50WX8	Sigma-Aldrich Chemie
Doxorubicin	Sigma-Aldrich Chemie
Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM) 31885 low glucose, pyruvate	Thermo Fisher Scientific (gibco)
Ethanol (70 %), denaturiert	Carl Roth
Ethanol (≥ 99,8 %)	Carl Roth
Fetal Calf Serum (FCS)	Thermo Fisher Scientific (gibco)
Fluorescein diacetat (FDA)	Sigma-Aldrich Chemie
Fluoroshield Mounting Medium mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	abcam
Formaldehyd (30 %)	Carl Roth
DMEM/F12	Gibco/Life Technologies
GelRed	Linaris

Gelatine	Serva
GFP-Vektor für Nucleofektion	Lonza
Glukose (45%)	Sigma-Aldrich Chemie
Glutamax	Gibco/Life Technologies
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie
Hank's Balances Salt Solution (HBSS)	Gibco/Life Technologies
Hibernate A	Gibco/Life Technologies
Humanes Insulin	Sigma-Aldrich Chemie
L-Glutamin	Gibco/Life Technologies
Minimal Essential Medium (MEM)	Gibco/Life Technologies
N2 Supplement	Gibco/Life Technologies
Natriumchlorid	Chemsolute
Natriumchlorid Lösung (0,9 %)	Fresenius Kabi
Neurobasal	Gibco/Life Technologies
Non-Essential Amino Acids (NEAA) Solution (100 x)	Gibco/Life Technologies
Normal Horse Serum	Gibco/Life Technologies
Normal Goat Serum (10 %)	Gibco/Life Technologies
Octafluorpropangas	Linde Gas
Parafin (Paraplast)	Leica
Paraformaldehyd (PFA) (Pulver)	Merck
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) (10.000 u/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin)	Thermo Fisher Scientific (gibco)
Phosphate Buffered Saline (PBS) PBS, Dulbecco w/o Ca²⁺, w/o Mg²⁺	Sigma-Aldrich Chemie
RBC Lysis Puffer	Invitrogen/ThermoFisher
Salzsäure (25 %)	Merck
Stickstoff (flüssig)	Riesner-Gase
Stickstoff (gasförmig)	Riesner-Gase
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie
Trypan Blue Solution (0,4 %)	Sigma-Aldrich Chemie

Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Solution 0,25 %/0,02 % (w/v) in PBS w/o Ca ²⁺ w/o Mg ²⁺	Biosell/Carl Roth
Tween®20	Carl Roth
Vitamin C	Sigma-Aldrich Chemie
Xylol (Isomerengemisch)	VWR Chemicals

5.1.3. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller/Vertreiber
Combitips® advanced <ul style="list-style-type: none"> • 100 µl • 500 µl • 5 ml 	Eppendorf
Crazy Glue	Empathy
Cryogefäß	Nalgene®
Deckgläser <ul style="list-style-type: none"> • rechteckig (24 x 50 mm) • rund (12 mm) 	A. Hartenstein A. Hartenstein
Dermagrip Nitrilhandschuhe (Ultralong)	WRP
E-Plates	OLS OMNI Life Science
Einbettkassetten	Langenbrinck
Filterblock für Einbettkassetten TISSUETEK II	A. Hartenstein
Histoacrylkleber	Braun
Kanüle (SupraKanüle)	Braun
Labor- und Hygienetücher	zetBox®
Lab-Tek™ Chamber Slide™ System 8 Well Permanox®Slide	LAB-TEK®
Microtome Blades S35	Feather
Objektträger	R. Langenbrinck
Objektträger SuperFrost	A. Hartenstein
Octafluorpropangas	Linde-Gas

Parafilm	Bemis
Pasteurpipetten zum Einmalgebrauch	VWR
Petrischale (10 cm)	TPP®
Pipettenspitzen <ul style="list-style-type: none"> • 20 µl, 200 µl, 1.000 µl • 2,5 ml, 5 ml 	Sarstedt Eppendorf
Rasierklingen	Wilkinson Sword
Reaktionsgefäße <ul style="list-style-type: none"> • Safe-Lock (1,5 ml, 2 ml) • Safe-Seal (5 ml) • Cellstar (15 ml, 50 ml) • 13 ml MB-Reaktionsgefäß 	Eppendorf Sarstedt Greiner Bio-one Greiner Bio-one
Rollrandglas	A. Hartenstein
Skalpell Disposable	Feather
Slide-A-Lyzer™ Dialysis Cassettes (Molekulargewicht cut off: 10K, 3ml)	Thermo Fisher Scientific
Small intestine submucosa and serosa (SISser)	Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin, Universität Würzburg
Super PAP Pen Liquid Blocker Mini	Science Services
Waageschalen	A. Hartenstein
Zellkultureinsätze <ul style="list-style-type: none"> • 24 Well • 6 Well 	Greiner bio-one Falcon
Zellkulturplatte <ul style="list-style-type: none"> • 6 Well • 12 Well • 24 Well • 96 Well 	Corning® Costar Corning® Costar Corning® Costar Falcon
Zellkulturschale (60 mm x 15 mm)	Corning® Incorporated
Zellkulturschale 100 (60,1 cm ²)	TPP®

5.1.4. Antikörper

Tabelle 5: Verwendete Antikörper

Name	Hersteller
Alexa Fluor™ Plus 488 Goat anti-Mouse IgG (H+L) Highly CrossAdsorbed Secondary Antibody (Ref: A32723; Lot: VC300588)	Thermo Fisher Scientific
Alexa Fluor™ Plus 555 Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly CrossAdsorbed Secondary Antibody (Ref: A32732; Lot: SC243839)	Thermo Fisher Scientific
Anti-γ H2AX (phospho S139) (Ref: 2893; Lot: GR3270858-1)	Abcam
GFAP Monoclonal Antibody (GA5) (Ref: 14-9892-82; Lot: 2172509)	Invitrogen eBioscience™
Ki67 (SP6) (Ref.: ab16667)	Abcam

5.1.5. Zelllinien

Tabelle 6: Verwendete Zelllinien. DSMZ= German Collection of Authenticated Cell Cultures, ECACC= European Collection of Authenticated Cell Cultures, CLS= Cell Line Services GmbH

Zelllinie	Spezies	Gewebe	Tumorentität	Wachstum	Alter	Geschlecht	Quelle
GaMG	Homo sapiens	Gehirn	Glioblastom	Monolayer adhärent	42	w	DSMZ
U87	Homo sapiens	Gehirn	Glioblastom	Monolayer, adhärent	44	w	ECACC
U138	Homo sapiens	Gehirn	Glioblastom	Monolayer, adhärent	47	m	CLS
U251	Homo sapiens	Gehirn	Glioblastom	Monolayer, adhärent	Unbekannt	m	CLS

5.1.6. KITS

Tabelle 7: Verwendete KITS

Name	Hersteller/Vertreiber
Amaxa Cell Line Nucleofector KIT (Ref.: VCA-1003)	Lonza
Cell Proliferation KIT (MTT 1) Ref.: 11465007001)	Roche
CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit (Ref.: V12883)	ThermoFisher
LIVE/DEAD™ Viability/Cytotoxicity Kit for mammalian cells (Ref.: L32250)	Invitrogen

5.1.7. Software

Tabelle 8: Verwendete Software

Software	
GraphPad Prism 9	GraphPad Software
Image J 1.53c	National Institutes of Health
Leica Application Suite (LAS V4.13)	Leica Microsystems
xCELLigence® RTCA-Software	OLS OMNI Life Science

5.1.8. Lösungen und Medien

Tabelle 9: Verwendete Lösungen und Medien

Lösung/Medium	Zusammensetzung
0,1 M Phosphatpuffer	800 ml von 35,8 g Dinatriumhydrogenphosphat in 1.000 ml H ₂ O 200 ml von 15,6 g Natriumdihydrogenphosphat in 1.000 ml H ₂ O 1:2 verdünnen mit H ₂ O

1 % Agarose-Lösung	50 ml PBS 0,5 g Agarosepulver
1 x TBS	200 ml 10 x TBS Puffer 1.800 ml Aqua dest.
10 x TBS Puffer	121,1 g Tris-ultrapure 169,4 g Natriumchlorid 100 ml Salzsäure (25 %) 2.000 ml Aqua dest.
10 mM Citratpuffer	500 ml 20 mM Citratpuffer 500 ml Aqua dest. 500 µl Tween® 20
20 mM Citratpuffer (pH 6)	8,4 g Citronensäure 4,2 g Natriumchlorid 2.000 ml Aqua dest.
Blocklösung-1	Normal Goat Serum (10 %) 1 % BSA 0,1 % Tween® 20 0,1 % Triton X-100
Blocklösung-2	DCS Normal Goat Serum (10 %) 1:1 verdünnt
Brain Slice Medium	1 x MEM 25 % normal horse serum 25 % HBSS 1 % Pen/Strep 1 % L-Glutamin 1 % Glukose (40%) 0,008 % Vitamin C
Färbelösung (Lebend-Todfärbung)	PBS 1 % FDA 10 % GelRed 0,1 % Hoechst
Doxorubicin-Stocklösung	1 g Doxorubicin

	1 ml 0,9 % NaCl
Einfriermedium	Zellkulturmedium 10 % DMSO 20 % FCS
Elutionsmittel	Acetonitril:Aqua dest. Im Verhältnis 32:68
GBO-Medium	47,24 % DMEM/F12 47,25 % Neurobasal 0,02 % B27 ohne Vitamin A (50x) 0,01 % Glutamax 0,01 % N2 Supplement 0,01 % NEAA 0,004 % Pen/Strep 0,001 % β -Mercaptoethanol 0,00023 % humanes Insulin
HGPSA	Hibernate A 1 % Glutamax 0,4 % Pen/Strep 0,1 % Amphotericin
PBS-T	1.000 ml PBS 1 ml Tween [®] 20
Permeabilisierungslösung-1	PBS-T 0,25 % Triton X-100
Permeabilisierungslösung-2	TBS-T 0,25 % Triton X-100
PFA-Lösung (4 %)	2 g PFA 50 ml 0,1 M Phosphatpuffer
Präparationsmedium	1 x MEM 1 % L-Glutamin 1 % Pen/Strep 1 % Glukose (40%)
PZ-Kulturmedium	1 x DMEM

	1,5 % NEAA 1,5 % Vitamine 20 % FCS
TBS-T	2.000 ml 1 x TBS 2 ml Tween® 20
Zellkulturmedium	1 x DMEM 2 % NEAA 0,4 % Pen/Strep 10 % FCS

5.1. Methoden

5.1.2. Microbubbles

Zur Synthese der MB wurden zwei Arten von Lipiden mit gesättigten Fettsäuren verwendet. 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) gehört zu den Phosphotidylcholinen und ist ein natürlich vorkommendes Diacylglycerin, welches die Hauptkomponente von biologischen Membranen darstellt (Aikawa et al. 2017). Außerdem wurden die Phosphotidylethanolamine 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol)-5000] (DPSE-PEG5000) und 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol)-2000] (DSPE-PEG2000) eingesetzt. Diese sind die am häufigsten vorkommenden Phospholipide in biologischen Membranen (Farine et al. 2015). Polyethylenglycerol (PEG) wird zur Stabilisierung der Lipide genutzt (Montesano et al. 2001) und verändert nicht nur die Kettenlänge der hydrophoben Schwänze sondern beeinflusst auch das Molekulargewicht (Johnsson und Edwards 2003).

5.1.2.1. MB-Synthese und Aufreinigung mittels Dialyse und Ionenaustausch-Chromatografie

Pro Ansatz wurden 4 mg DPPC und je 0,5 mg der Phosphotidylethanolamine abgewogen, in einem Rollrandglas in je 1 ml Chloroform gelöst und anschließend vermischt. Die Lipidlösung wurde mittels gasförmigen Stickstoffs evaporiert, um so einen gleichmäßigen Lipidfilm auszubilden. Durch Zugabe von 3 ml Glycerol mit 10 % PBS und 20 Minuten bei 55 °C im Wasserbad löste sich dieser. Die Endkonzentration der Lipide in der Lösung betrug dann 1,3 mg/ml für DPPC und 0,16 mg/ml für DSPE-PEG2000 und DPSE-PEG5000 (Abbildung 4A). Zur anschließenden Beladung der MB mit Dox wurde nun in 0,9 % NaCl gelöstes Dox in einer Endkonzentration von 10 µM eingesetzt (Abbildung 4B). Die Dox-Beladungseffizienz kann zum einen mikroskopisch, zum anderen auch mit Hilfe einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) bestimmt werden.

Die Suspension wurde in ein 13 ml MB-Reaktionsgefäß überführt und mit Parafilm und einem Gummistopfen luftdicht verschlossen. Mittels einer Supra-Kanüle wurde das Gemisch 5 Minuten lang mit Octafluorpropangas (C₃F₈) versetzt. Eine weitere Kanüle garantierte die Entweichung des Sauerstoffs. Anschließend erfolgte eine Sonikation der Lösung unter Luftausschluss mit 50 % der Leistung für 10 Minuten. Die beiden Vorgänge wurden stets in einem mit Wasser gefüllten Becherglas, welches sich auf einer Wärmeplatte befand,

durchgeführt (Abbildung 4G). So konnte gewährleistet werden, dass das Lipidgemisch stetig einer Temperatur von etwa 55 °C ausgesetzt war. Lipide verlieren bei diesen Temperaturen ihre Stabilität und werden agiler, sodass sie sich besser anlagern können (Abbildung 4C). Wenn die Temperatur anschließend wieder erniedrigt wird, gehen sie in einen stabileren, gelartigen Zustand über (Wang et al. 2015; Wu et al. 2016). Die trübe Suspension wurde in einem Eppendorfgefäß im Vialmix bei 55 °C und 2000 rpm für 1 Minute geschüttelt. Die Suspension mit den nun enthaltenen MB (Abbildung 4D) kühlte bei 4 °C für etwa 15 Minuten ab. Eine mikroskopische Kontrolle bestätigte die erfolgreiche MB-Synthese.

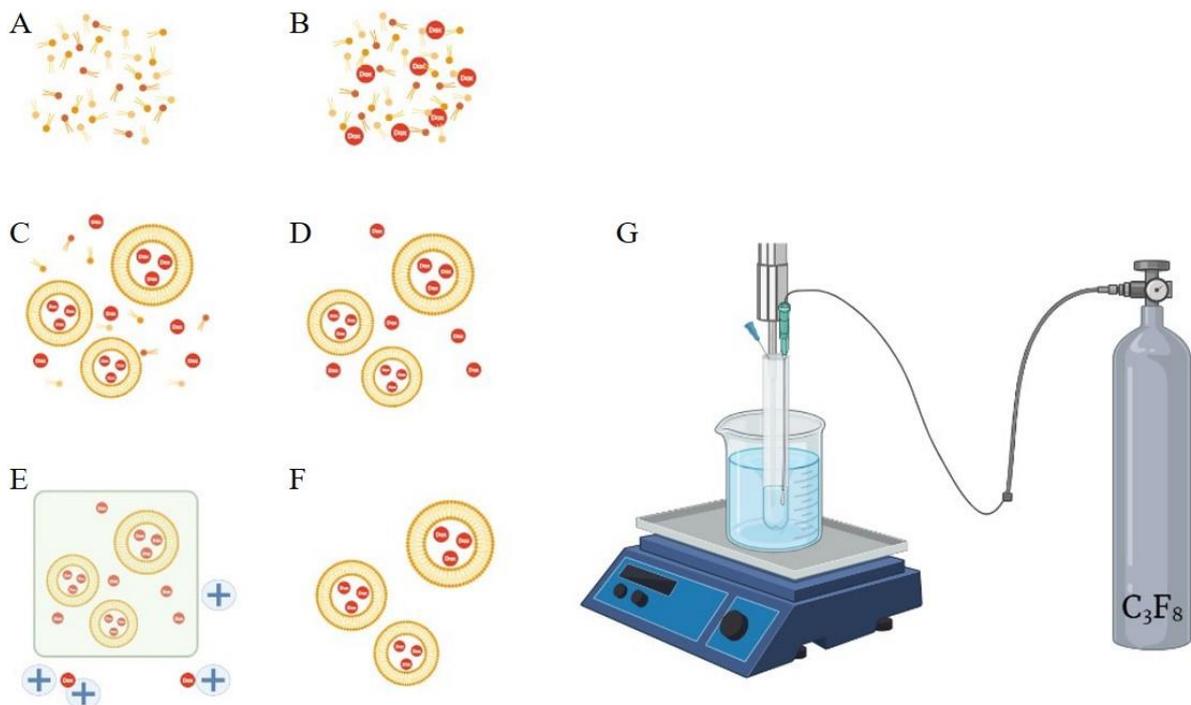


Abbildung 4: Prinzip und Versuchsaufbau zur MB-Synthese. A) Lipide wurden in Chloroform gelöst, evaporiert und in der entstehenden Lipidfilm in Glycerol in Lösung genommen B) 10 µM Dox wurden zur Lipidlösungen zu gegeben. C) Durch Begasung mit C₃F₈ und Sonikation bildeten sich aus den Lipiden MB und schlossen dabei Dox (rot) ein. D) In der MB-Lösung war noch frei zirkulierendes Dox enthalten. E) Durch Dialyse und Ionenaustausch-Chromatographie konnte das freie Dox aus der MB-Lösung entfernt und gebunden werden. F) Nach der Aufreinigung bestand die Lösung aus MBDox. G) Begasung der Lipidlösung mit C₃F₈ erfolgte bei 55 °C unter Rühren in einem Becherglas. Dabei wurde das Reaktionsgefäß luftdicht verschlossen. Eine Kanüle diente zum Luftausstrom. Der Sonikator wurde in die Lipidlösung getaucht. Dox= Doxorubicin, MB= Microbubbles, MBDox= mit Doxorubicin beladene Microbubbles. Quelle: Created with Biorender 2022, eigene Darstellung

Nach der Synthese erfolgte die Aufreinigung der MB, damit das überschüssige Chemotherapeutikum aus der Suspension entfernt wurde und schließlich nur MB mit eingeschlossenem Dox in Suspension verblieben. Hierzu wurde auf zwei bekannte Methoden zurückgegriffen. Bei der Dialyse wird mittels eines konzentrationsabhängigen Gradienten über

eine semipermeable Membran mit einem definierten Cut-Off überschüssiges Dox aus der MB-Suspension gezogen (Olczyk et al. 2018). Bei der Ionenaustausch-Chromatografie werden mittels Ladung die negativ geladenen Substanzen von der positiv geladenen Gelmatrix angezogen und so aus der Lösung genommen (Patel et al. 2014; Pismenskaya et al. 2020; Nomngongo et al. 2013) (Abbildung 4E).

Für die Dialyse wurde eine Slide-A-Lyzer Dialyse-Kassette zum Bewässern 2 Minuten in PBS gelegt. Anschließend wurden 5 ml der MBDox-Suspension mit einer Kanüle in die Dialyse-Kassette injiziert. Für die Ionenaustausch-Chromatografie wurde in einem Becherglas 1 mg Dowex 50W in 300 ml PBS gelöst. Die Dialyse-Kassette wurde in das Becherglas mit der Dowex-PBS-Suspension gehängt und unter ständigem leichtem Rühren mit Hilfe eines Rührfisches auf einem Magnetrührer 5 Minuten lang inkubiert. Während diesem Prozess wurde das überschüssige, negativ geladene Dox durch das positiv geladene Dowex im PBS aus der MBDox-Suspension gezogen. Die Membran der Dialyse-Kassette verhinderte durch ihre definierte Porengröße das Ausströmen der MBDox. Die MBDox-Suspension wurde mit einer sauberen Kanüle aus der Kassette extrahiert. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde überprüft, ob die Aufreinigung erfolgreich war. Dox hat eine maximale Anregungs- und Emissionswellenlänge von 470 nm bzw. 560 nm (Kauffman et al. 2016) und fluoresziert bei einer Wellenlänge von 555 nm. Diese Eigenschaft ist beim Nachweis der Aufreinigung sehr nützlich. Die MBDox sollten nun, aufgrund des eingeschlossenen Dox, nach Anregung mit einer Wellenlänge von 555 nm rot fluoreszieren, die Lösungen hingegen nicht (Abbildung 4G).

Um die MB-Konzentration in der Suspension zu bestimmen, wurde ein semiautomatisches Zählverfahren in Image J verwendet. Hierzu wurde die Suspension zunächst 1 zu 10 in PBS verdünnt und dann wurden 10 µl der Lösung in eine Neubauerzählkammer gefüllt. Unter einem Hellfeldmikroskop wurden mit dem 40x Objektiv je 5 zufällig ausgewählte Bilder eines Quadranten aufgenommen. Die Bilder wurden in Image J geladen und ein Threshold von 110 und 255 gesetzt. Mit dem Plug-In „Colony Counter“ wurden die MB nun automatisiert gezählt. Zuvor wurde eine Größe von minimal 0,05 und maximal 7000 mit einer Zirkularität von 1 definiert. Für die Endkonzentration wurde nun der Mittelwert gebildet, die Verdünnung herausgerechnet und die Konzentration als MB pro ml angegeben.

5.1.2.2. Dox-Konzentrationsbestimmung in MBDox mittels HPLC

Für die HPLC-Messung wurde die Anzahl der MBDox vor und nach der Aufreinigung mittels Dialyse und Ionenaustausch-Chromatografie bestimmt. Die HPLC Messung wurde mit einer C18-Säule und einem Photodiodenarray-Detektor (SPD-M20A) bei einer Temperatur von 35 °C mit Acetonitril:Wasser (32:68) mit einem pH-Wert von 2,6 als Elutionsmittel und einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/Minute durchgeführt. Das Volumen der Probeninjektion betrug 50 µl und die Excitation und Emission wurde auf eine Wellenlänge von 457 nm und 555 nm gesetzt. Für die anschließende Dox-Konzentrationsbestimmung wurde eine Standardkurve (100 µg/ml, 50 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 1 µg/ml Dox) angefertigt. Die Dox-Stocklösung wurde dabei mit dem Elutionsmittel (Acetonitril-Wasser-Gemisch) verdünnt.

5.1.3. 2D-Zellkultur

Erste Versuche zur Evaluierung eines neuen Therapieansatzes werden meist in einem 2D-Zellkulturmodell durchgeführt. Es ist nicht nur günstig in der Kultivierung, sondern zeigt auch eine schnelle Proliferation der Zellen, wodurch High-Throughput Experimente möglich sind (Souza et al. 2018). Vor allem für erste Drug-Screening Experimente (Quartararo et al. 2015) und zur Etablierung von neuen Methoden eignet es sich sehr gut (Dundar et al. 2020). Dabei können Zellen in Zellkulturflaschen als Suspension oder als adhärenter Zellmonolayer kultiviert werden (La Rosa et al. 2016). GBM-Zelllinien werden in der 2D-Zellkultur als adhärenter Monolayer kultiviert.

5.1.3.1. Kultivierung von GBM-Zelllinien

Die GBM-Zelllinien U87, U138, U251 und GaMG wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen in 10-15 ml Zellkulturmedium unter sterilen Bedingungen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Zur Lagerung wurden die Zellen cryokonserviert. Dabei können sie bis zu mehreren Jahren bei -198 °C in flüssigem Stickstoff gelagert werden (Miyamoto et al. 2018). Die Zellen befinden sich in Suspension in einem Einfriermedium, welches neben dem gängigen Zellkulturmedium auch einen erhöhten Anteil an FCS (20 %) und 10 % DMSO enthält. DMSO dient hier als Gefrierschutzmittel für die Zellen und verhindert so die toxische Ausbildung von Eiskristallen (Qin et al. 2020). Zum Auftauen wurden die Cryogefäße mit den Zellen aus dem Stickstoff entnommen und im Wasserbad zügig auf 37 °C erwärmt. Anschließend wurde die

Zellsuspension in eine 75 cm² Zellkulturflasche mit 10 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium überführt. Nach 24 h im Inkubator erfolgte ein Mediumwechsel. Hierbei wurde das restliche DMSO entfernt. Für eine erfolgreiche Kultivierung müssen Zellen in regelmäßigen Abständen passagiert werden. Hierzu wurde bei einer Konfluenz von 70 % das komplette Medium abgesaugt. Die Zellen wurden mit 5 ml PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml Trypsin/EDTA behandelt. Nach 8 Minuten Inkubationszeit im Inkubator ließen sich die Zellen ablösen und im Verhältnis 1:5 splitten. Hierzu wurden 8 ml der Zellsuspension entfernt. Die verbliebenen 2 ml Zellsuspension in der Zellkulturflasche wurden mit 10 ml frischem Zellkulturmedium aufgefüllt und anschließend wieder kultiviert.

Zum erneuten Einfrieren wurden die abgelösten Zellen in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 314 g für 5 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Einfriermedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in ein Cryogefäß überführt und mittels Einfrierhilfe zügig bei -80 °C weggefroren. Zur längeren Lagerung wurden die Zellen im Stickstofftank bei einer Temperatur von -198 °C gelagert.

5.1.3.2. Kultivierung von PZ

PZ wurden aus frischem intraoperativ entferntem Tumormaterial hergestellt. Hierzu wurden unter sterilen Bedingungen Nekrosen und Blutgefäße mit Skalpellen entfernt. Mit Hilfe eines Homogenisators wurde die Tumormasse fein zerkleinert. Die Zellsuspension wurde nun in einer 25 cm² Zellkulturflasche in 5 ml vorgewärmtem PZ-kulturmedium aufgenommen und bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Kultivierung und Handhabung der PZ glich jener der GBM-Zellen.

5.1.4. 3D-Zellkulturmodelle

Zur Austestung der Effektivität der beladenen MB sollten 3D-Modelle für GBM entwickelt werden. Hierzu wurden drei Konzepte erarbeitet: Ein dezellularisierter Schweinedarm, der als Matrix für GBM-Zellen diene und so ein dreidimensionales Wachstum ermögliche, eine Perfusionskammer, die die Vaskularisierung und den Durchfluss der MB-Suspension imitieren sollte, sowie Hirnschnitt-Modelle aus der Maus und aus intraoperativ gewonnenen humanen GBM.

5.1.4.1.3D-SiSser-Modell

Um ein 3-dimensionales Wachstum der GBM-Zellen zu ermöglichen, wurde dezellularisierter Schweinedarm genutzt. Von der Darmmatrix können entweder die Innenseite (Mukosa) oder die Außenseite (Serosa) zum Einwachsen der Zellen genutzt werden. Vorversuche haben die Eignung der Serosa als biologische Matrix für GBM-Zellen bestätigt (Clara Keller 2020)

Die SiSser wurde freundlicherweise vom Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt. Die hier dargestellte Methode wurde in Vorversuchen bereits erfolgreich etabliert (Keller 2020). Der dezellularisierte Schweinedarm lagerte bei 4 °C in PBS. Die SiSser wurde unter sterilen Bedingungen in einer 10 cm Petrischale, gefüllt mit 3 ml PBS, ausgeweitet und entlang des lateralen Saums aufgeschnitten und aufgeklappt. Die SiSser wurde mit der Serosaseite nach unten zeigend auf eine Metallkrone gezogen und mit einem Ring befestigt. Das Präparat wurde in eine 24 Well Platte gestellt, die mit Zellkulturmedium gefüllt war. Nach 24 h im Inkubator wurden Zellen nach Protokoll ausplattiert. Dabei wurden pro Krone 1×10^5 GBM-Zellen in 500 μ l Zellkulturmedium auf die Serosa gegeben. Nach einer Stunde setzten sich die Zellen ab und die Krone konnte mit weiteren 500 μ l Zellkulturmedium aufgefüllt werden. Die Zellen wuchsen nun innerhalb von 10 Tagen in die Matrix ein. Es erfolgte dreimal die Woche ein Mediumwechsel, wobei nur 75 % des Mediums ersetzt wurden.

5.1.4.2.Perfusionskammer

Die Perfusionskammer wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Funktionswerkstoffe am Universitätsklinikum Würzburg hergestellt (Ryma et al. 2021).

Ein Hydrogel aus Gelatin-Methacryloyl (GelMA) stellt eine geeignete biologische Umgebung für GBM-Zellen dar und wahrt unter physiologischen Temperaturen ihre Stabilität (Pepelanova et al. 2018), wodurch es als Gerüst dienen kann. Die GBM-Zellen wachsen verteilt im Hydrogel und werden über einen perfundierbaren Kanal versorgt, der durch das Hydrogel führt und zwei Reservoirs miteinander verbindet. Die Inkubation auf einem Schüttler gewährleistet, dass das Zellkulturmedium von einem in das andere Reservoir laufen und somit die in dem Hydrogel befindlichen Zellen versorgen kann. Zur Herstellung der Bioreaktoren wurde eine poly(2-cyclopropyl-2-oxazoline)-Faser (PcycloPrOx-Faser) in den Bioreaktor geklebt (Abbildung 5A). Pro Reaktor wurden 500 μ l einer Hydrogel-Lösung hergestellt, diese bestand aus 5 % GelMA, dem Crosslinker Lithium-Phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinat (LAP 0,15 %) und

Zellkultursuspension mit 5×10^5 Zellen pro ml in Zellkulturmedium. Die Hydrogel-Lösung wurde in den Bioreaktor gegeben und unter sichtbarem Licht, dies entspricht einer Wellenlänge von 380 nm-700 nm (Zhu et al. 2014), für 150 s ausgehärtet (Abbildung 5B). Die Faser wurde anschließend durch Erwärmung im Inkubator und mehrmaliges Spülen gelöst (Abbildung 5C). Zur Versorgung der Zellen wurde das eine Reservoir der Perfusionskammer mit 500 μ l und das andere mit 700 μ l Zellkulturmedium aufgefüllt. Die Perfusionskammer mit den Zellen wurden auf einem Schüttler, welcher sich im 5 Minutentakt um 7° neigte, bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert. Die Behandlung mit MBDox erfolgte über den Kanal (Abbildung 5D). Nach der LIFU Applikation zerplatzten die MB (Abbildung 5E) und es folgte eine Inkubation für 4 h mit anschließendem Mediumwechsel (Abbildung 5F). Die Lebend-Tod-Färbung wurde ebenfalls in der Perfusionskammer durchgeführt (Abbildung 5G).

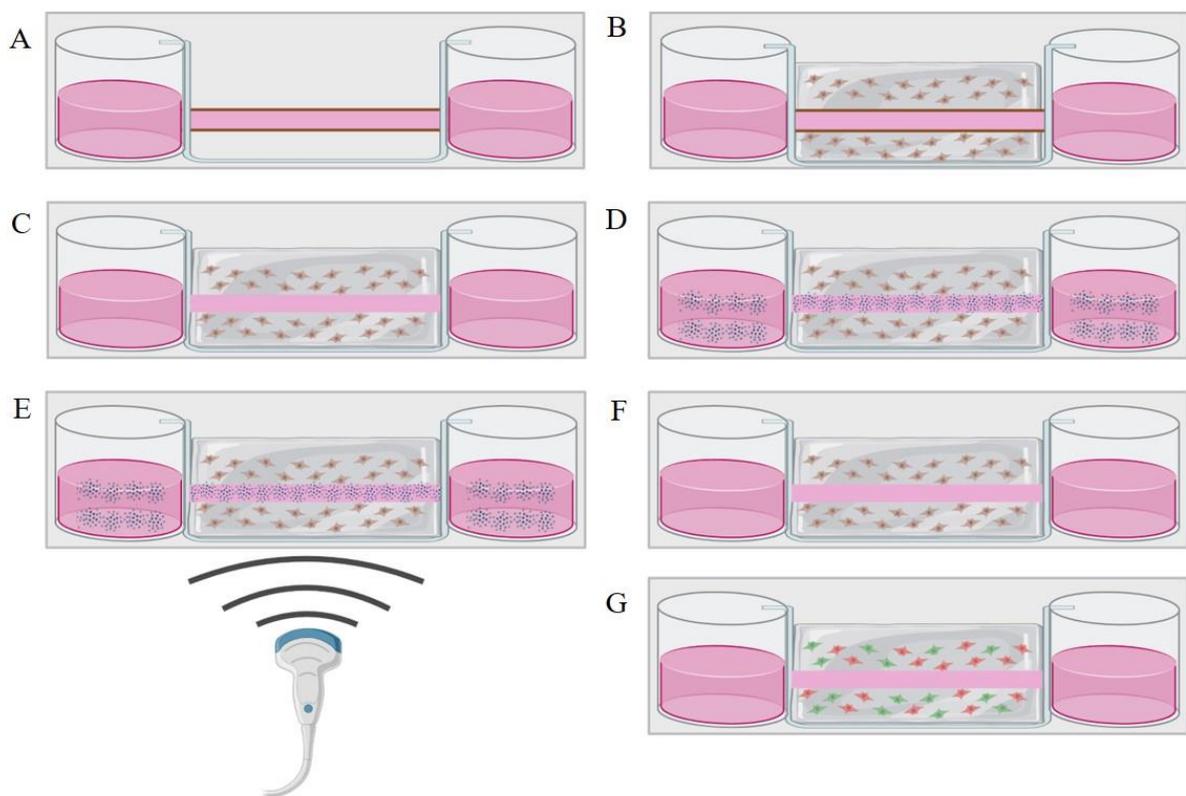


Abbildung 5: Vorbereitung und Behandlung der Perfusionskammer. A) Perfusionskammer mit zwei Reservoirs und Kanal aus PycloPrOx-Faser. B) Hydrogel aus GelMa und LAP mit GBM-Zellen wird in die Perfusionskammer gefüllt. C) Die PycloPrOx-Faser wird herausgelöst, sodass ein perfundierbarer Kanal zurückbleibt D) MBDox-Lösung wird in den Kanal gefüllt. E) Durch LIFU-Applikation zerplatzen MBDox und setzen Dox frei. F) Nach 4 h Inkubationszeit wird die MBDox-Lösung durch frisches Medium ersetzt. G) Die Auswertung erfolgt nach 48 h mittels Lebend-Tod-Färbung. Dox= Doxorubicin, GBM= Glioblastoma, GelMa= Gelatin-methacryl, LAP= Lithium-Phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinat, LIFU= Low intensity focused ultrasound, MBDox= mit Doxorubicin beladene Microbubbles. Quelle: Created with Biorender 2022, eigene Darstellung

5.1.4.3. Brain Slice Kulturen

Es wurden zwei Arten von Brain Slice Kulturen hergestellt, zum einen OHSC aus der Maus, auf denen es möglich ist Mikrotumoren aus humanen GBM-Zellen wachsen zu lassen, zum anderen Hirnschnitte aus humanem, intraoperativ gewonnenem Tumormaterial.

5.1.4.3.1. Präparation und Kultivierung

Zur Herstellung von OHSC wurden Mäuse (p4 - p7) mit einer Schere dekapitiert und das Gehirn wurde herauspräpariert (Abbildung 6A). Das Hirn wurde zügig in Präparationsmedium überführt. Vor der Herstellung der Schnitte wurde das Hirn mit einem Skalpell am anterioren und posterioren Ende zugeschnitten und nur das Großhirn weiterverarbeitet (Abbildung 6B). Das Hirn wurde mit der dorsalen Seite mittels Histoacrylkleber in die röhrenförmige Halterung des Compresstoms geklebt. Eine zuvor aufgekochte, 1% Agaroselösung wurde etwas abgekühlt, bevor das Hirn eingegossen wurde. Ein vorgekühlter Kühlblock wurde genutzt um das Abkühlen der Agarose zu beschleunigen. Die Halterung wurde schließlich in das Compresstom eingespannt und die Präparationswanne mit auf 4 °C vorgekühltem Präparationsmedium so gefüllt, dass das Präparat vollständig bedeckt war. Bei einer Oszillation von 6 und einer Advance von 3,5 wurden 350 µm dicke Hirnschnitte hergestellt. Die dünnen Schnitte (Abbildung 6C) wurden vorsichtig mit einem breiten Spatel aus der Präparationswanne in eine Petrischale überführt. Unter einer Stereolupe wurden die Hippocampi mit Skalpellen präpariert (Abbildung 6D) und auf einem Zellkultureinsatz, dessen semipermeable Membran eine Porengröße von 0,4 µm aufwies, überführt (Abbildung 6E). Die Kultivierung der Hirnschnitte erfolgte in Multiwell-Platten, die mit Brain Slice Medium so befüllt waren, dass der Zellkultureinsatz leicht im Medium hing (1 ml in 6 Well Platten, 300 µl in 24 Well Platten). Die OHSC wurden bei 35 °C, 5 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert. Es erfolgte dreimal die Woche ein Mediumwechsel. Nach etwa zwei Wochen Kultivierung konnten die OHSC in Versuchen eingesetzt werden.

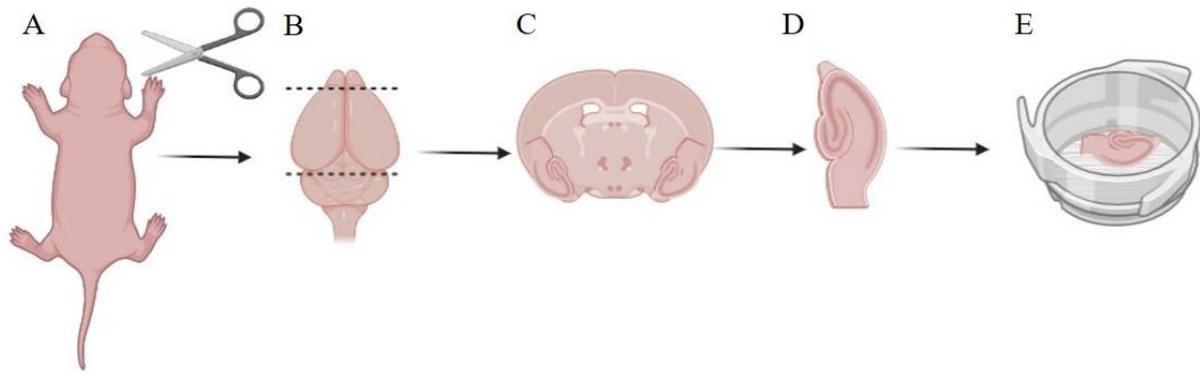


Abbildung 6: Präparation von Mäusen zur OHSC Herstellung. A) Junge Mäuse wurden dekapitiert und das Gehirn herauspräpariert. B) Das Hirn wurde anterior und posterior zugeschnitten. C) Es wurden 350 µm dicke Hirnschnitte hergestellt. D) Der Hippocampus wurde herauspräpariert. E) Die Kultivierung der OHSC erfolgte auf Zellkultureinsätzen mit semipermeabler Membran. OHSC= Organotypic hippocampal brain slice culture. Quelle: Created with Biorender 2022, eigene Darstellung

Humane Tumormirnschnitte wurden nach gleichem Protokoll hergestellt. Das intraoperativ entfernte Tumorgewebe wurde direkt in Hibernate A Medium überführt und bis zur Präparation auf Eis gelagert. Das Tumorgewebe wurde von Nekrosen und vaskularisiertem Gewebe befreit und mit einem Skalpell in etwa 0,5 cm x 1,5 cm große Stücke geschnitten. Die Herstellung der 350 µm dicken Schnitte lief wie bereits für OHSC beschrieben ab. Das Gewebe wurde mit Histoacrylkleber in die röhrenförmige Halterung geklebt (Abbildung 7A), dabei sollte es möglichst gerade in der Form stehen (Abbildung 7B). Das Gewebe wurde mit Agarose aufgegossen (Abbildung 7C) und mit Hilfe eines Kühlblocks zügig ausgehärtet (Abbildung 7D). Die Schnitte wurden in einer Präparationswanne aufgefangen (Abbildung 7E) und anschließend von der Agarose befreit (Abbildung 7F). Die Kultivierung der humanen Tumormirnschnitte erfolgte ebenfalls auf Zellkultureinsätzen mit 0,4 µm großen Poren in Brain Slice Medium.

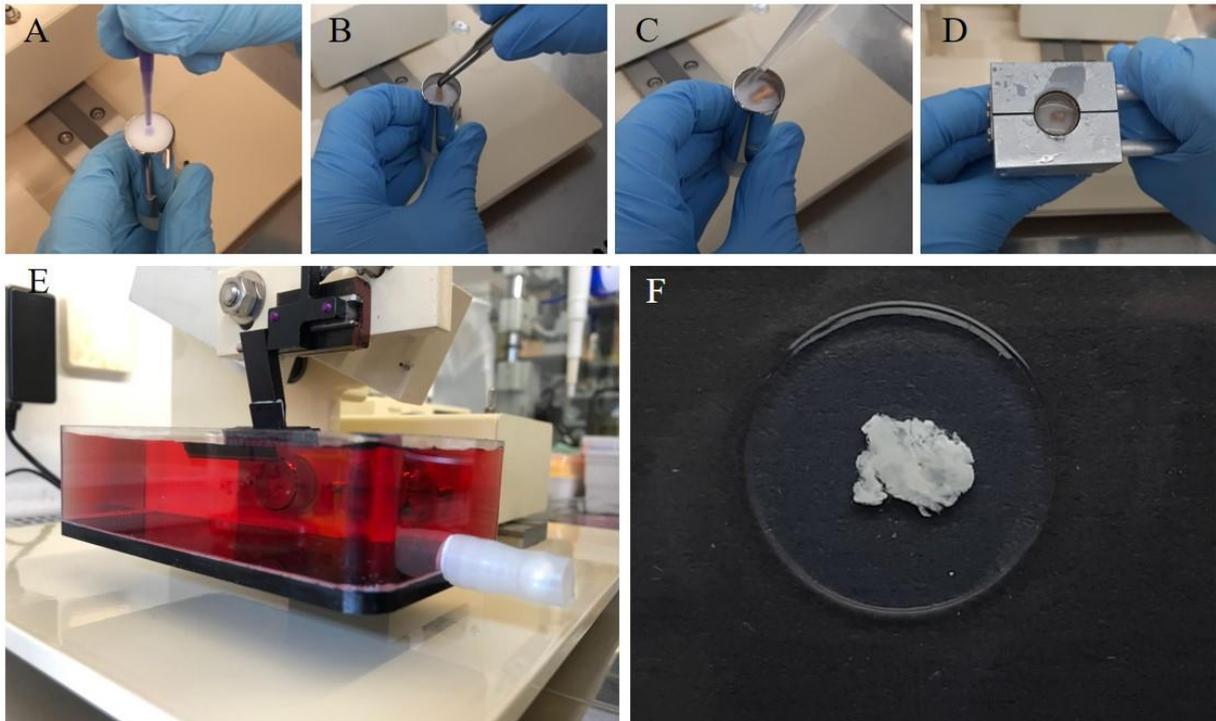


Abbildung 7: Herstellung der humanen Tumorschnitte. A) Histoacrylkleber wurde auf die röhrenförmige Halterung appliziert. B) Der zurechtgeschnittene Tumor wurde senkrecht festgeklebt und C) in Agarose eingegossen. D) Die Agarose härtete mit Hilfe eines vorgekühlten Kühlblocks schneller aus. D) Die Hirnschnitte wurden nach dem Slicen in der Präparationswanne, die mit Präparationsmedium gefüllt war, aufgefangen. D) Die fertigen Schnitte mussten vor der Kultivierung in Zellkultureinsätzen von der Agarose befreit werden.

5.1.4.3.2. Mikrotumoren

Für ein geeignetes 3D-Modell zur Untersuchung von GBM war es notwendig auf den OHSC Mikrotumoren wachsen zu lassen. Hierfür wurden die GBM-Zelllinien U87 und U138 mittels Nucleofector mit dem green fluorescent Protein (GFP) transfiziert. Die Durchführung erfolgte gemäß des Protokolls vom Nucleofector Kit V. Die Zellen wurden zunächst mit Trypsin/EDTA abgelöst und in Suspension gebracht (Abbildung 8A). Für einen Ansatz wurden 1×10^6 Zellen mit $300 \times g$ bei Raumtemperatur für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in $100 \mu l$ Nucleofectorlösung aufgenommen. Zur Zellsuspension wurden $2 \mu g$ pmaxGFP Plasmid hinzugegeben und mit dem Transfektionsprogramm U29 behandelt. Nach erfolgter Transfektion wurden die GBM-Zelllinien in 5 ml Zellkulturmedium in 25 cm^2 Zellkulturflaschen kultiviert (Abbildung 8B). PZ wurden zur Sphäroidbildung zusätzlich auf einer Beschichtung mit 1% Agar kultiviert. Hierfür wurde 1 g Noble Agar in 20 ml destilliertem Wasser aufgekocht und mit 80 ml Zellkulturmedium aufgefüllt. 10 ml der Agarlösung wurden luftblasenfrei auf den Boden der Zellkulturflasche verteilt, wo sie bei 4°C aushärten konnte, bevor die Zellsuspension darauf verteilt wurde. Am Folgetag der Transfektion wurden die

Zellen auf den OHSC ausplattiert. Dabei wurden 1×10^5 der GBM-Zellen in $10 \mu\text{l}$ Zellkulturmedium mit einer Pipette auf die Brain Slices gegeben. Die PZ wurden erst auf die OHSC ausplattiert, nachdem sich Sphäroide gebildet hatten (Abbildung 8C). Dies geschah nach etwa 2-3 Tagen. Bei erfolgreicher Durchführung waren nach 3 bis 4 Tagen bereits Mikrotumoren auf den Brain Slices gewachsen (Abbildung 8D). Diese waren aufgrund ihrer Fluoreszenz unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar.

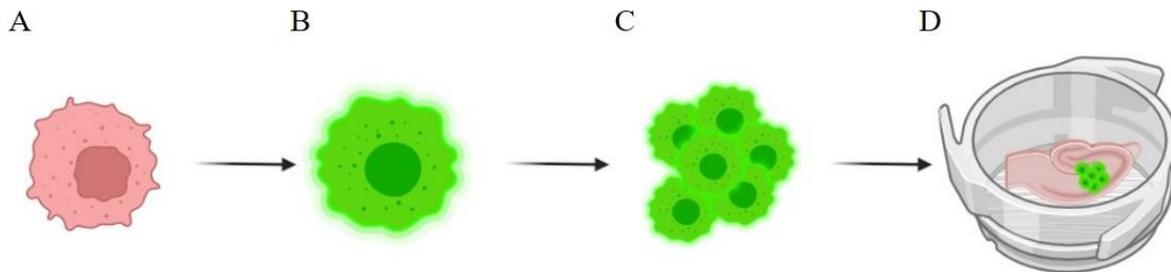


Abbildung 8: Prinzip der Mikrotumoren auf OHSC. A) Zur Herstellung der Mikrotumoren wurden GBM oder PZ verwendet. B) Die Zellen wurden mit GFP transfiziert. C) Nach einigen Tagen bildeten sich Sphäroide aus PZ. D) Die GBM-Zellen bzw. Sphäroide der PZ wurden auf die OHSC gesetzt, wo sie als Mikrotumoren anwachsen. GBM= Glioblastoma, GFP= green fluorescent protein, OHSC= Organotypic hippocampal brain slice culture, PZ= Primärzellen. Quelle: Created with Biorender 2022, eigene Darstellung

5.1.4.4. Organoide

Zur Etablierung eines multizellulären Tumormodells, welches die Heterogenität des GBM möglichst genau widerspiegelt, wurden Organoide aus frischem GBM-Patientenmaterial hergestellt und als Mikrotumoren auf OHSC eingesetzt.

5.1.4.4.1. Präparation und Kultivierung von Organoiden

Organoide wurden aus intraoperativ entferntem GBM-Tumormaterial gewonnen und gemäß dem Protokoll von Jacob et al hergestellt (Jacob et al. 2020). Das frisch entnommene Gewebe wurde direkt in Hibernate A überführt und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert. Nachdem Nekrose und stark vaskularisiertes Gewebe entfernt worden war, konnte mit Hilfe von Skalpell das Tumorgewebe in $0,5 \times 0,5 \text{ cm}$ große Stücke geschnitten werden. Es folgte eine Behandlung mit RBC-Lysis-Puffer für 10 Minuten auf dem Schüttler mit zwei anschließenden Waschschritten mit HGPSA für jeweils 5 Minuten. Zur Inkubation wurden die kleinen Gewebestücke in 4 ml GBO-Medium auf Zellkulturplatten (6 Well, low attachment)

überführt und auf einem Orbitalshaker bei 120 rpm und 37 °C, 5 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert. Nach 2 Wochen Kultivierung bildeten sich Organoide aus, die für weitere Experimente eingesetzt werden konnten.

5.1.4.4.2. Markierung der Organoide mit Fluoreszenzfarbstoff

Bevor die Organoide als Mikrotumoren auf OHSC ausplattiert werden konnten, wurden diese fluoreszent markiert. Hierfür wurde das CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit nach Protokoll verwendet. Die Organoide wurden zunächst mechanisch mit Skalpell auf eine Größe von etwa 100 µm zurechtgeschnitten und anschließend für 15 Minuten in 10 µM CFSE in PBS bei RT inkubiert. Es folgte ein Waschschrift mit frischem GBO-Medium für 30 Minuten im Inkubator ehe die Organoide über Nacht in frischem GBO-Medium kultiviert wurden. Am Folgetag konnte die Fluoreszenz unter Anregung einer Wellenlänge von 488 nm unter dem Fluoreszenzmikroskop überprüft werden. Die fluoreszent markierten Organoide wurden einzeln auf die OHSC plattiert und wuchsen innerhalb von 2 Tagen als Mikrotumoren an.

5.1.4.5. Patientenkohorte

Alle Patienten wurden in der Neurochirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Würzburg behandelt und gaben ihre schriftliche Einwilligung nach Aufklärung gemäß der Deklaration von Helsinki und nach Genehmigung durch die Ethikkommission der Universität Würzburg (#22/20-me). Die Histopathologie der Tumorproben wurde von einer erfahrenen Neuropathologin bestätigt und nach den WHO-Kriterien 2021 (Louis et al., 2021) klassifiziert. Es wurden nur GBM, IDH-Wildtyp ZNS mit WHO-Grad 4 berücksichtigt. Zur Erstellung der beschriebenen 3D-Zellkulturmodelle wurden Tumorproben von acht GBM-Patienten verwendet (Tabelle 10). Da die Menge an Tumormaterial begrenzt war, konnten leider nicht alle Versuche mit den gleichen GBM durchgeführt werden

Tabelle 10: Klinische Charakteristika der GBM-Proben und die eingesetzten 3D-Zellkulturmodelle. ATRX= *alpha thalassaemia/mental retardation syndrome X-linked*, GBM= Glioblastoma, ID= Identifikator, IDH= Isocitrat-Dehydrogenase, KPS= Karnofsky-Index, PZ= Primärzellen

ID	Geschlecht	Alter [Jahre]	Histologie	KPS	Ki67 [%]	MGMT Promotor Methylierung [%]	IDH1 Mutation	IDH2 Mutation	ATRX Expression	3D-Zellkulturmodell
PZ 1	männlich	64	GBM	100	20	Ja (76)	Nein	Nein	Ja	PZ
PZ 2	Weiblich	79	GBM	100	20	Ja (66)	Nein	Nein	Ja	PZ
PZ 3	Weiblich	73	GBM	100	50	Ja (28)	Nein	Nein	Ja	PZ
Organoid	Weiblich	69	GBM	30	25	Ja (71)	Nein	Nein	Ja	Organoid
GBM 1	männlich	54	GBM	90	40	Nein (3)	Nein	Nein	Ja	Humane Tumorschnitte
GBM 2	männlich	64	GBM	40	30	Ja (82)	Nein	Nein	Ja	Humane Tumorschnitte

5.1.5. Behandlungsschemata

Um die Wirksamkeit der MBDOx zu überprüfen, wurden die 2D- und 3D-Zellkulturmodelle mit MBDOx und LIFU behandelt. Zur Etablierung der Hirnschnitt-Modelle wurde auf die bereits etablierte TTFields-Applikation zurückgegriffen. Beide Behandlungsmethoden werden im Folgenden beschrieben.

5.1.5.1. Behandlung mit MBDOx + LIFU

Fokussierter Ultraschall mit niedriger Frequenz wird verwendet, um MB in Schwingung zu versetzen bis sie letztendlich zerplatzen (Apfel R.E 1999; Pouliopoulos et al. 2020). Hierzu ist ein besonderes Setup nötig, welches im Folgenden beschrieben wird.

Zunächst wurde ein Agaroseblock gegossen. Hierzu wurde eine 1 %-ige Agaroselösung in PBS hergestellt und in eine extra dafür angefertigte Form gegossen und ausgehärtet. Der Agaroseblock war 7 cm hoch und zylinderförmig. Mittig befand sich eine 1 cm tiefe Mulde, die als Probenhalterung dient (Abbildung 9A). Zur Stabilisierung wurde der Agaroseblock von einem Kunststoffring gestützt (Abbildung 9B). Die Proben wurden in die Mulde platziert (Abbildung 9C). Der Agaroseblock saß auf dem Ultraschallkopf und ermöglicht so eine Weiterleitung des Ultraschalls durch luftfreies, wässriges Medium. Der Abstand zwischen Ultraschallkopf und der Probe betrug 6 cm. Dies war der Abstand, bei dem der Ultraschallfokus lag (Carolin Rippke 2016). Die Mulde, in der die Probe lag, wurde jeweils mit 1 ml entsprechendem Zellkulturmedium bzw. MB oder MBDOx-Lösung befüllt (Abbildung 9D).

Anschließend wurde die Behandlung durchgeführt. Dabei wurde eine Pulsfrequenz von 99 Hz, eine Pulsdauer von 1000 μ s mit einer Amplitude von 30 μ m und einer Ultraschallfrequenz von 500 kHz für 5 Minuten angelegt. Nach der Behandlung wurde die Probe mit einer Pinzette vorsichtig in die 24 bzw. 12 Well Zellkulturplatte überführt und das Well mit der Lösung aus der Mulde des Agaroseblocks befüllt. Es folgte eine Inkubationszeit von 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂.

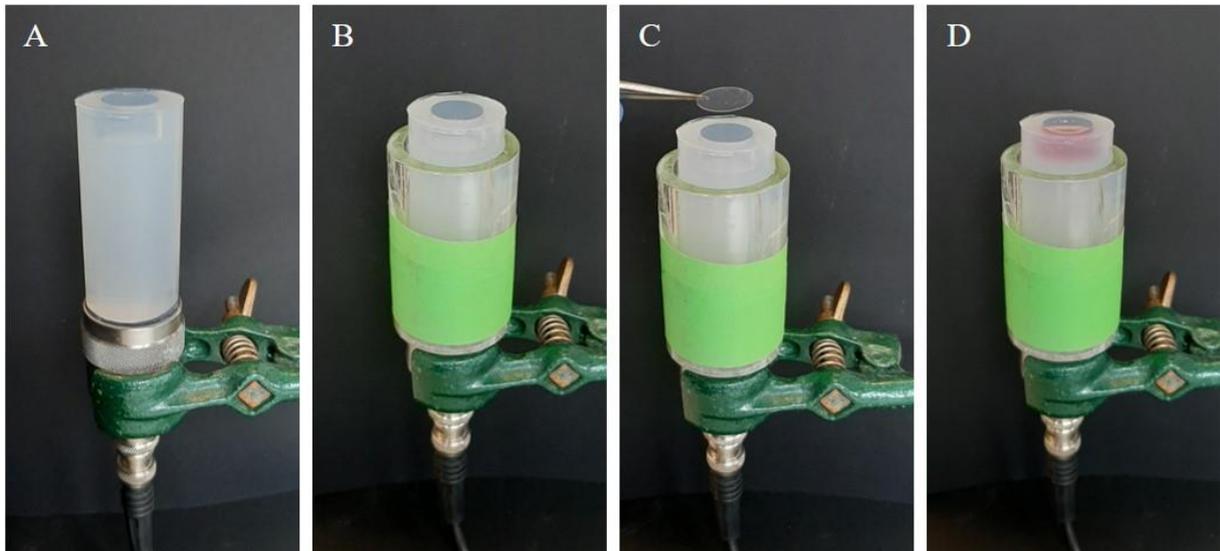


Abbildung 9: Experimentelles Setup der LIFU-Applikation. A) Der Agaroseblock wurde auf den Ultraschallkopf gesetzt. B) Zur Stabilisierung diente eine Kunststoffhalterung. C) Die Probe wurde in die Mulde des Agaroseblocks gelegt und D) mit Zellkulturmedium oder MB- bzw. MBDox-Lösung befüllt. LIFU= Low intensity focused ultrasound, MB= Microbubble, MBDox= mit Doxorubicin beladene MB

Zur Behandlung wurden Lösungen mit MB, MBDox, 10 μ M Dox und Zellkulturmedium als unbehandelte Kontrolle verwendet. Die MB- und MBDox-Lösung enthielt jeweils eine Konzentration von 1×10^8 MB pro ml.

Zur Behandlung der GBM-Zellen wurden 1×10^5 Zellen in Zellkulturmedium auf 12 mm Deckgläser ausplattiert und in 24-Well Zellkulturplatten kultiviert. Nach 24 h Adhärenzzeit im Inkubator erfolgte die Behandlung mit MBDox und LIFU. Hierfür wurden die Deckgläser mit den Zellen vorsichtig in die Mulde des Agaroseblocks überführt, mit entsprechender Lösung aufgefüllt und nach der Behandlung zurück in die Zellkulturplatte verbracht. Nach 48 h Inkubationszeit wurden die Proben analysiert (5.1.6.4.1).

Zur Behandlung der in die Serosa eingewachsenen GBM-Zellen mit MB wurde zunächst das Medium, welches sich im Innenraum der Krone befand, abgesaugt. Es wurde 1 ml der

entsprechenden Lösung auf die Zellen gegeben. Die Krone wurde samt Flüssigkeit in die Mulde des Agaroseblocks gesetzt. Die Mulde im Agaroseblock wurde mit Medium aufgefüllt, sodass kein Luftraum mehr vorhanden war. Nach Beendigung der LIFU-Applikation wurde die Krone mitsamt der darin befindlichen Flüssigkeit in eine 12 Well Zellkulturplatte überführt. Das Well wurde außerhalb der Krone mit 1,5 ml Zellkulturmedium aufgefüllt. Nach 4 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die darauffolgende Inkubationszeit betrug 44 h. Nach Beendigung der insgesamt 48 h Inkubationszeit wurden die Proben analysiert (5.1.6.4.2).

Zur Behandlung der Perfusionskammer wurde ein 6 cm hoher Agaroseblock ohne Mulde gegossen. Das Medium in den Reservoirs der Perfusionskammer wurde durch 1 ml der entsprechenden Lösung ersetzt. Die Kammer wurde auf den Agaroseblock gesetzt und LIFU appliziert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 4 h im Inkubator, bevor die Lösung durch frisches Zellkulturmedium ausgetauscht wurde. Nach 48 h erfolgte die Analyse mittels Leben-Tod-Färbung (5.1.6.3).

5.1.5.2. Behandlung mittels TTFields

Zur TTFields-Applikation wurde das Inovitro System genutzt. Die humanen Tumorschnitte könnten direkt nach der Präparation der TTFields-Behandlung unterzogen werden. Die OHSC wurden erst eingesetzt, nachdem die Mikrotumoren angewachsen waren. Zur TTFields-Applikation wurden die 24 Well Zellkultureinsätze, in denen die Hirnschnitte kultiviert wurden, in die Halter überführt (Abbildung 10A, B). Um die Verdunstung des Mediums zu minimieren und zu verhindern, dass Kondenswasser die Hirnschnitte flutet, wurde auf den Zellkultureinsatz ein 12 mm Deckglas gelegt (Abbildung 10C). Die Halterung mit dem Insert wurde in den TTFields-Keramikschaalen platziert (Abbildung 10D). Die TTFields-Keramikschaale wurden mit 2,5 ml Brain Slice Medium befüllt (Abbildung 10E). Die humanen Tumorschnitte wurden nun mit einer weiten Glaspipette vorsichtig überführt (Abbildung 10F), sodass sie möglichst zentriert auf dem Zellkultureinsatz zu liegen kamen (Abbildung 10G). Die OHSC wurden bereits auf den Zellkultureinsätzen kultiviert. Die TTFields-Keramikschaale wurden mit dem Deckglas, Parafilm und einem Deckel verschlossen (Abbildung 10H) und in die Applikationsplatte gedreht (Abbildung 10I). Die TTFields-Behandlung erfolgte für 72 h mit einer Frequenz von 200 kHz und einer Intensität von 1,5 V/cm bei 35 °C. Die anschließende Analyse erfolgte am Fluoreszenzmikroskop. Für immunhistochemische Färbungen wurden die Brain Slices über Nacht bei 4 °C mit 4 % Formalin fixiert und anschließend entwässert und Paraffinschnitte angefertigt.

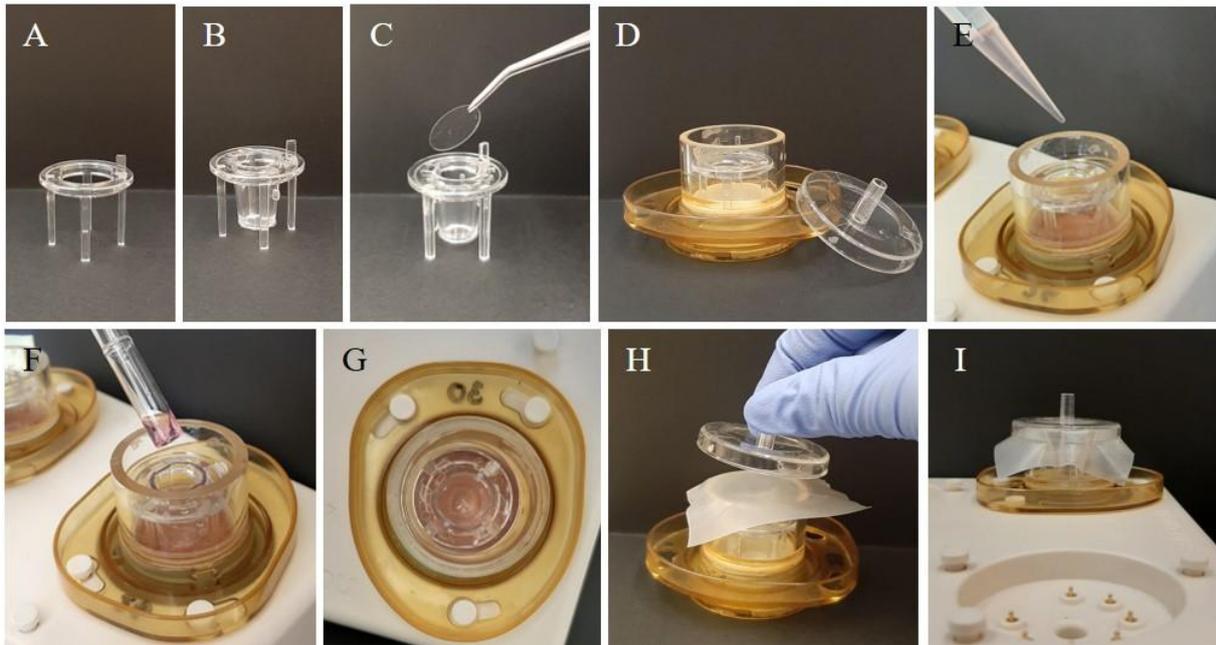


Abbildung 10: Probenvorbereitung für die TTFIELDS-Behandlung. A) Halterung für Einsätze. B) Das Insert wurde in den Halter eingesetzt. C) Glasdeckglas zum Schutz vor entstehender Kondensation. D) Insert und Halter wurden in die TTFIELDS-Keramikschale gestellt. E) Die Keramikschale wurde mit 2,5 ml Medium gefüllt. F) Die Hirnschnitte wurden mit einer breiten Glaspipette überführt und das überschüssige Medium wird abgesaugt. G) Die Hirnschnitte sollten zentriert auf dem Einsatz liegen. H) Glasdeckglas, Parafilm und Deckel verschlossen die Keramikschale. I) Die Keramikschale wurde in die Applikationsplatte gedreht und an den Generator angeschlossen. TTFIELDS= Tumor Treating Fields

5.1.6. Analysemethoden

5.1.6.1.3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolimbromid (MTT)-Assay

Zur Untersuchung der Viabilität von behandelten GBM-Zellen wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Dabei können aufgrund der Umsetzung von MTT zu Formazan in metabolisch aktiven Zellen kolorimetrische Messungen am ELISA-Reader durchgeführt werden, welche Rückschlüsse auf die Viabilität der Zellen ermöglichen (Mosmann 1983). Das ermittelte Absorptionsspektrum wird zur Berechnung der inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) genutzt. Der IC_{50} -Wert gibt den halbmaximalen Effekt der zu testenden Substanz und deren hemmende Wirkung an (Sebaugh 2011).

Die Durchführung des MTT-Assays erfolgte mittels des Cell Proliferation KIT (MTT 1). Hierzu wurden zunächst 3×10^3 Zellen pro Well in 100 μ l Zellkulturmedium in einer 96 Well Zellkulturplatte ausplattiert. Nach einer Adhärenzzeit von 24 h im Inkubator erfolgte die Behandlung mit der gewünschten Substanz. Hierzu wurde das Zellkulturmedium komplett entfernt und durch die entsprechende Verdünnung des Chemotherapeutikums ersetzt.

Zusätzlich wurde eine Positivkontrolle mit 10 % DMSO in Zellkulturmedium mitgeführt, sowie eine Negativkontrolle, die mit der entsprechenden Verdünnung des Lösungsmittels der Substanz versetzt war. Nach 48 bzw. 72 h wurden 10 µl Labeling Reagenz pro Well hinzugegeben. Nach 4 h Inkubationszeit bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl Solubilization Solution beendet. Nach 24 h im Inkubator wurde die Messung am ELISA Reader durchgeführt, dabei wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 540 nm ohne Referenzwert gemessen. Die Ermittlung der IC₅₀-Werte erfolgte mittels GraphPad Prism 9.

5.1.6.2. Proliferations- und Adhäsionsmessungen im xCELLigence®-System

Das xCELLigence®-System ermöglicht es, die Proliferation von adhären Zellen in Echtzeit zu messen. Aufgrund der am Boden der Mikrowellplatten befindlichen Goldelektroden, kann in regelmäßigen Abständen die Impedanz gemessen werden, welche über die Bedeckung der Gesamtfläche Rückschlüsse auf die Proliferation der Zellen geben kann (Ke et al. 2011; Witzel et al. 2015). Hier wurde das xCELLigence®-System genutzt um die Wirksamkeit von Platin(II)- bzw. Palladium(II)-Komplexen und Dox auf GBM-Zellen zu untersuchen.

Zu Beginn wurden 100 µl Zellkulturmedium in jedes Well der E-Plates® gegeben und es wurde eine Hintergrundmessung durchgeführt. Anschließend wurden pro Well 3x10³ GBM-Zellen in 100 µl Zellkulturmedium ausplattiert. Es folgte eine Adhärenzmessung über 24 h, während der sich die Zellen am Boden absetzten und anwuchsen. Zur Behandlung der GBM-Zellen wurden verschiedene Konzentrationen der zu untersuchenden Platin(II)- bzw. Palladium(II)-Komplexe und Dox in Zellkulturmedium angesetzt. Dabei sollte stets eine Negativkontrolle mit Zellkulturmedium und dem entsprechenden Lösungsmittel mitgeführt werden. Das Medium wurde vorsichtig von den Zellen abgesaugt und durch 200 µl der entsprechenden Verdünnung ersetzt. Um Messfehler zu vermeiden, wurde in Duplikaten gearbeitet. Die bei der Inkubation der Zellen entstehende Verdunstung sollte durch Auffüllen der Zwischenräume der E-Plates® mit Wasser minimiert werden. Nach der Behandlung erfolgte eine Inkubation von 96 h. Dabei wurde kontinuierlich im Intervall von 15 Minuten automatisiert eine Impedanzmessung durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels xCELLigence® RTCA-Software.

5.1.6.3. Lebend-Tod-Färbung

Zur Überprüfung der Viabilität der Brain Slices, wurde eine Lebend-Tod-Färbung durchgeführt. Hierzu wurde eine L/T-Färbelösung mit Hoechst, GelRed und FDA in PBS hergestellt. Hoechst 33324 ist ein zelldurchlässiges Agens, welches an die DNA bindet und bei einer Anregung mit UV-Licht die Darstellung der Zellkerne am Fluoreszenzmikroskop ermöglicht (Latt und Wohlleb 1975). FDA ist ein membrangängiges Esterasesubstrat, welches von intrazellulären Esterasen hydrolysiert wird (Rotman B 1966). Somit fluoreszieren nur stoffwechselaktive Zellen unter Anregung von Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm. GelRed hingegen ist nicht membrangängig (Haines et al. 2015) und wird daher nur von Zellen mit bereits geschädigter Zellmembran aufgenommen. Es bindet ebenfalls an die DNA (Crisafuli et al. 2015) und fluoresziert bei einer Excitation von 300 nm und einer Emission von 600 nm rot (Haines et al. 2015). Sobald die Färbelösung frisch angesetzt war, wurden die Brain Slices mit PBS gewaschen und von allen Seiten mit der Färbelösung versehen. Die Inkubation erfolgte unter Lichtausschluss für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Färbelösung verworfen und die Slices wurden für jeweils 10 Minuten zweimal mit PBS gewaschen. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

Für die Lebend-Tod-Färbung der Zellen in der Perfusionskammer wurde das LIVE/DEAD™ Viability/Cytotoxicity Kit for mammalian cells nach Herstellerprotokoll verwendet. Ein ml der Färbelösung enthielt 4 mM Calcein-AM und 2 mM Ethidium Homodimer und wurde sowohl in die Reservoirs der Perfusionskammer als auch direkt auf das Hydrogel gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % für 30 Minuten. Anschließend wurde die Färbelösung durch PBS ausgetauscht und die Proben konnten in der Perfusionskammer unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden. Hierfür wurden z-stack Aufnahmen gemacht und anschließend in ImageJ 1.53c semiautomatisch ausgewertet.

5.1.6.4. Immunhistochemische Fluoreszenzfärbung

Zur Detektion und Lokalisation bestimmter Proteine oder Zellstrukturen kann eine immunhistochemische Färbung verwendet werden (Magaki et al. 2019). Dabei binden spezifische Antikörper mit einer hohen Affinität an Epitope. Sind diese Antikörper mit einem Farbstoff gekoppelt, so spricht man von Fluoreszenzfärbung (Luttmann et al. 2014). Die hier verwendete Methode entspricht einer indirekten immunhistochemischen Fluoreszenzfärbung (Barbierato et al. 2012). Der Primärantikörper richtet sich gegen die zu detektierende Struktur und bindet mit einer hohen Affinität, der Sekundärantikörper richtet sich gegen den

Primärantikörper (Luttmann et al. 2014). Durch den gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff am Sekundärantikörper können die Strukturen unter Anregung einer spezifischen Wellenlänge mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskop visualisiert werden (Sanderson et al. 2014).

Bei der hier angewendeten Fluoreszenzfärbung handelte es sich um eine Doppelfärbung, bei der zwei Primärantikörper verwendet wurden. Das Glial Fibrillary Acid Protein (GFAP) wird in Astrocyten des zentralen Nervensystems, den nicht-myelinisierenden Schwann-Zellen im peripheren Nervensystem und in den enterischen Gliazellen exprimiert (Yang und Wang 2015). Das Intermediärfilament Protein der Klasse II wird daher als Astrozytenmarker verwendet und für die Diagnose von GBM verwendet (Yang und Wang 2015; Lawrence F. Eng 1985; Lyubimova et al. 2020). Hier sollten damit die GBM-Zellen visualisiert werden.

5.1.6.4.1. Immunhistochemische Fluoreszenzfärbung von 2D-GBM-Zellkulturen

Für die immunhistochemische Fluoreszenzfärbung wurden die GBM-Zellen zunächst auf Deckgläsern kultiviert und behandelt. Während der Färbung war es wichtig darauf zu achten, dass die Zellen nicht austrockneten und stets mit Flüssigkeit bedeckt waren. Zunächst wurde das Medium entfernt und die Zellen wurden anschließend mit 400 µl PBS gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte mit 250 µl 4 % PFA für 10 Minuten bei Raumtemperatur. PFA bildet Crosslinks mit Aminogruppen aus, ohne dabei die Tertiärstruktur der Proteine zu beschädigen, sodass ein Großteil der Epitope zur Antikörperbindung frei zur Verfügung steht (Danchenko et al. 2019). Es folgten drei Waschschriffe mit PBS mit einer anschließenden Permeabilisierung für 10 Minuten mit der Permeabilisierungslösung-1. Die Lösung enthält das nicht ionische Detergens Triton-X 100, welches sich in die Doppellipidschicht der Membran einlagert und so die Permeabilität erhöht, ohne die Proteine zu denaturieren (Jamur M.C. 2010). Der nächste Waschschriff erfolgte mit PBS-T für 5 Minuten auf dem Schüttler. Die Zellen wurden dann mit 250 µl der Blocklösung-1 für 1 h bei Raumtemperatur geblockt. Bei diesem Vorgang werden die unspezifischen Bindungsstellen besetzt und eine höhere Spezifität der Färbung gewährleistet (Buchwalow et al. 2011). Die verwendeten Antikörper GFAP (1:50) und γ H2AX (1:200) wurden entsprechend in DCS verdünnt und pro Präparat 100 µl aufgetragen. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C über Nacht. Am Folgetag wurden die überschüssigen Antikörper mit PBS-T 3-mal für je 5 Minuten abgewaschen. Die Sekundärantikörper Alexa Fluor Plus 488 (1:1000) und Alexa Fluor Plus 555 (1:1000) wurden in entsprechender Verdünnung in insgesamt 200 µl PBS-T verdünnt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei abschließenden Waschschriffen mit PBS-T wurden die Präparate in DAPI

eingedeckt. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der an die DNA bindet und bei Anregung unter dem Fluoreszenzmikroskop mit UV-Licht die Zellkerne visualisieren kann (Karg und Golic 2018). Bis zur Analyse am Fluoreszenzmikroskop verblieben die Präparate 2-3 Tage unter Lichtausschluss bei 4 °C.

5.1.6.4.2. Immunhistochemische Fluoreszenzfärbung von 3D-Zellkulturen

Vor der immunhistochemischen Fluoreszenzfärbung müssen die Proben der 3D-Modelle zunächst einmal vorbereitet und Paraffinschnitte angefertigt werden.

Die Serosa wurde mit 2,5 ml PBS gewaschen und anschließend für 2 h mit 4 % Formalin bei Raumtemperatur fixiert. Dabei war es wichtig, die Serosa von allen Seiten mit Formalin zu bedecken. Anschließend wurde die Serosa aus der Krone befreit, mit Skalpell zurechtgeschnitten, um die nicht mit Zellen bewachsenen Serosa-Abschnitte zu entfernen, und in einer mit Filterpapier ausgelegten Einbettkassette platziert. Im Gewebereinbettautomaten wurde die Serosa schrittweise entwässert (Tabelle 11).

Die Brain Slices wurden über Nacht bei 4 °C mit 4 % Formalin fixiert und anschließend in PBA gewaschen. Die Brain Slices wurden samt semipermeabler Membran mit Skalpell aus dem Zellkultureinsatz ausgeschnitten und in eine 1 %-ige Agar-Agar-Lösung eingegossen. Nach Aushärten der Probe wurde diese in eine mit Filterpapier ausgelegte Einbettkassette platziert und entwässert (Tabelle 11)

Tabelle 11: Programm des Gewebereinbettautomaten mit Abschleuderfunktion zur Entwässerung der Serosa

Lösung	Zeit
50 % Ethanol	45 Minuten
70 % Ethanol	45 Minuten
80 % Ethanol	45 Minuten
96 % Ethanol	45 Minuten
100 % Ethanol	60 Minuten
100 % Ethanol	60 Minuten
100 % Ethanol + Chloroform 1:1	30 Minuten
100 % Ethanol + Chloroform 1:1	30 Minuten
Chloroform absolut	30 Minuten
Chloroform absolut	30 Minuten
Paraffin I	120 Minuten
Paraffin II	120 Minuten

Die dehydratisierte Serosa wurde in drei gleichgroße rechteckige Stücke geschnitten und hochkant in eine Metall-Einbettform gestellt. Die Slices konnten als Ganzes weiterverarbeitet werden. Die Proben wurden nun in 60 °C warmes Paraffin eingegossen. Auf einer 4 °C Kälteplatte konnte das Paraffin aushärten. Zur Herstellung von 3 µm dicken Paraffinschnitten aus den Paraffinblöcken wurde ein Mikrotom verwendet, wobei die Schnitte auf Superfrost Objektträger übertragen wurden. Anschließend konnte mit der immunhistochemischen Fluoreszenzfärbung fortgefahren werden.

Die Paraffinschnitte mussten zunächst entparaffiniert werden. Hierzu wurde das Lösungsmittel Xylol verwendet. Eine absteigende Alkoholreihe gewährleistete, dass das Gewebe auf den Objektträgern wieder rehydriert wurde (Romeis 2015). Indem die Schnitte 20 Minuten lang in einem 10 mM Citratpuffer im Dampfgerar schonend aufgekocht wurden, wurden die Quervernetzungen der Proteine aufgebrochen und die Epitope demaskiert (Rodig 2021). Die langsam abgekühlten Schnitte wurden in Aqua dest. zwischengelagert und die einzelnen Proben mit einem PapPen umrandet. Anschließend wurden die Schnitte 5 Minuten in TBS-T gewaschen und 10 Minuten mit Permeabilisierungslösung-2 permeabilisiert. Nach einem weiteren Waschschrift für 5 Minuten in TBS-T wurden die Schnitte für 20 Minuten bei Raumtemperatur in Blocklösung-2 geblockt. Schließlich wurden 50 µl der Primärantikörper in

der entsprechenden Verdünnung in Antikörperverdünnungspuffer pro Schnitt aufgetragen (Tabelle 12) und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit TBS-T für 5 Minuten auf dem Schüttler wurde der sekundäre Antikörper (Tabelle 12) für 1 h bei Raumtemperatur aufgetragen. Nach der Inkubationszeit folgten zwei weitere Waschschrritte mit TBS-T, bevor die Schnitte mit zwei Tropfen des Fluoroshield Mounting Mediums mit DAPI eingedeckt wurden.

Tabelle 12: Antikörperverdünnungen für die immunhistochemischen Fluoreszenzfärbung von 3D-Zellkulturmodellen

3D-Modell	Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
SISser	GFAP	1:50	Alexa Fluor Plus 488	1:1000
SISser	H2AX	1:200	Alexa Fluor Plus 555	1:1000
Brain Slice	GFAP	1:50	Alexa Fluor Plus 488	1:1000
Brain Slice	Ki67	1:1000	Alexa Fluor Plus 555	1:1000

5.1.7. Statistische Analyse

Alle Daten wurden mit GraphPad Prism 9 ausgewertet. Hierzu wurde der Mittelwert und die Standardabweichung errechnet und der unabhängige t-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 % durchgeführt. Als statistisch signifikant galten Werte ab $p \leq 0,05$. Zur Auswertung der immunhistochemischen Fluoreszenzfärbung wurden je Probe 5 (2D-Zellkulturmodell) bzw. 10 (SISser, Brain Slices) zufällig gewählte repräsentative Einzelbilder am Fluoreszenzmikroskop DMI3000 B mit einer Leica DFC450 C Kamera aufgenommen und anschließend mit einem semiautomatischen Makro (Feldheim et al. 2020) in Image J ausgezählt. Die Lebend-Tod-Färbung der GBM-Zellen in der Perfusionskammer wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop als z-stack aufgenommen. Die anschließende Analyse erfolgte ebenfalls über ein semiautomatisches Makro in Image J. Die Größe der Mikrotumoren auf OHSC als auch die Größe der MB wurde manuell mit ImageJ 1.53c bestimmt

6. Ergebnisse

6.1. Microbubbles und deren Wirkung auf GBM-Zellen

Die Toxizität der einzelnen Lipide, als auch der Lipidmischung wurde an den GBM-Zelllinien GaMG, U251 und U87 mittels MTT-Assay ermittelt (Abbildung 11A). Es zeigte sich bei der Behandlung der GaMG-Zellen eine signifikante Differenz in der Zellviabilität nach Behandlung mit den Lipiden DSPE-PEG2000 und DSPE-PEG5000 (DSPE-PEG200: $-14,00 \pm 4,460$, 95 % CI= $-26,38 - -1,618$, $p= 0,0349$; DSPE-PEG5000: $-8,333 \pm 1,972$; 95 % CI= $-13,81 - -2,858$, $p= 0,0134$), jedoch nicht mit DPPC und dem Lipidgemisch (DPPC: $-6,667 \pm 2,472$, 95 % CI= $-13,53 - 0,1969$, $p= 0,0543$; Lipidgemisch: $-8,667 \pm 3,887$, 95 % CI= $-19,46 - 2,126$, $p= 0,0897$). Die GBM-Zelllinie U251 zeigte lediglich einen signifikanten Unterschied in der Viabilität unter der Behandlung von DSPE-PEG500 ($-4,667 \pm 0,9428$, 95 % CI= $-7,284 - -2,049$, $p= 0,0078$), unter den anderen Behandlungen konnte kein signifikanter Viabilitätsverlust festgestellt werden (DSPE-PEG2000: $-9,000 \pm 3,771$, 95 % CI= $-19,47 - 1,471$, $p= 0,0755$; DPPC: $-7,000 \pm 2,625$, 95 % CI= $-14,29 - 0,2873$, $p= 0,0560$; Lipidgemisch: $-5,000 \pm 2,055$, 95 % CI= $-10,71 - 0,7051$, $p= 0,0717$). Die GBM-Zelllinie U87 wiesen hingegen unter der Behandlung mit DSPE-PEG2000 ($-10,67 \pm 1,700$, 95 % CI= $-15,39 - -5,948$, $p= 0,0033$) und DPPC ($-9,000 \pm 1,972$, 95 % CI= $-14,48 - -3,525$, $p= 0,0103$) eine signifikante Varianz der Viabilität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auf. Das Lipidgemisch ($-4,333 \pm 2,472$, 95 % CI= $-11,20 - 2,530$, $p= 0,1545$) als auch DPSE-PEG5000 ($-5,333 \pm 2,667$, 95 % CI= $-12,74 - 2,071$, $p= 0,1161$) zeigten keinen signifikanten Unterschied. Die Behandlung mit 10 μM Dox ergab bei GaMG ($-67,67 \pm 7,401$, 95 % CI= $-88,22 - -47,12$, $p= 0,0008$) und U87 ($-57,67 \pm 4,410$, 95% CI= $-69,91 - -45,42$, $p= 0,0002$) einen signifikanten Unterschied in der Viabilität verglichen mit der Behandlung mit dem Lipidgemischen.

MB wiesen unter mikroskopischer Betrachtung ein heterogenes Bild mit verschiedenen Größen auf. Dieses veränderte sich bei 4 °C nach 4 h bzgl. der Größenverteilung als auch Konzentration (Abbildung 11B). Es konnte eine Größenverteilung von 0,7 μm bis hin zu 14,9 μm aufgezeigt werden (Abbildung 11C). Die durchschnittliche Größe betrug 4 μm ($\pm 2,4 \mu\text{m}$), wobei 41% der MB eine Größe von etwa 2 μm hatten.

Die MB-Synthese, ergab eine Ausbeute von durchschnittlich $6,6 \times 10^8$ ($\pm 6,6 \times 10^7$) MB pro ml. Ihre Stabilität wurde unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Im Inkubator bei 37 °C nahm die MB-Zahl bereits nach einer Stunde von $6,4 \times 10^8$ auf $3,2 \times 10^8/\text{ml}$ signifikant ab ($-3,2 \times 10^8 \pm 3,7 \times 10^7$, 95% CI= $-4,2 \times 10^8 - -2,1 \times 10^8$, $p= 0,001$) und verringerte sich nach einer weiteren Stunde noch einmal um die Hälfte auf $1,3 \times 10^8/\text{ml}$ ($-1,9 \times 10^8 \pm 4,1 \times 10^7$, 95% CI= -

$3,1 \times 10^8$ - $7,8 \times 10^7$). Nach insgesamt 4 h lag die MB-Konzentration bei 7×10^7 und verringerte sich somit noch um $-6,1 \times 10^7$ ($\pm 2,6 \times 10^7$, 95 % CI= $-1,3 \times 10^8 - 1,1 \times 10^8$, $p= 0,0774$). Nach 24 h waren keine MBs mehr nachweisbar. Die Inkubation bei Raumtemperatur führte nach einer Stunde zu einer signifikanten Abnahme der MB-Konzentration um $-2,3 \times 10^8$ ($\pm 5,7 \times 10^7$, 95% CI= $-3,9 \times 10^8 - -7,5 \times 10^8$, $p= 0,015$) auf $4,1 \times 10^8$. Nach 2 h nahm die MB-Anzahl statistisch nicht signifikant ab ($6,1 \times 10^7 \pm 7,3 \times 10^7$, 95% CI= $-1,4 \times 10^8 - -2,6 \times 10^8$, $p= 0,4459$). 4 h nach der MB-Synthese waren es nur noch $2,6 \times 10^8$ MB pro ml, die statistische Abnahme zu den letzten 2 Stunden war daher signifikant ($-2,1 \times 10^8 \pm 7,5 \times 10^7$, 95 % CI= $-4,2 \times 10^8 - -6,2 \times 10^6$, $p= 0,0460$). Nach 24 h waren nur noch $3,9 \times 10^7$ MB nachweisbar. Bei 4 °C nahm die MB-Konzentration zwar tendenziell über die Zeit von $7,1 \times 10^8$ auf $4,6 \times 10^8$ nach 4 h ab ($(-2,6 \times 10^8 \pm 9,5 \times 10^7$, 95% CI= $-5,2 \times 10^8 - -7,4 \times 10^7$, $p= 0,0542$)), aber diese Verringerung war nicht signifikant. Insgesamt konnte aber eine signifikante Abnahme der MB-Zahl vom Zeitpunkt der Synthese ($7,1 \times 10^8$) bis hin zu 24 h nach der Synthese ($2,8 \times 10^8$) festgestellt werden ($-4,2 \times 10^8 \pm 8,5 \times 10^7$, 95% CI= $-6,6 \times 10^8 - -1,9 \times 10^8$, $p= 0,0076$) (Abbildung 11D).

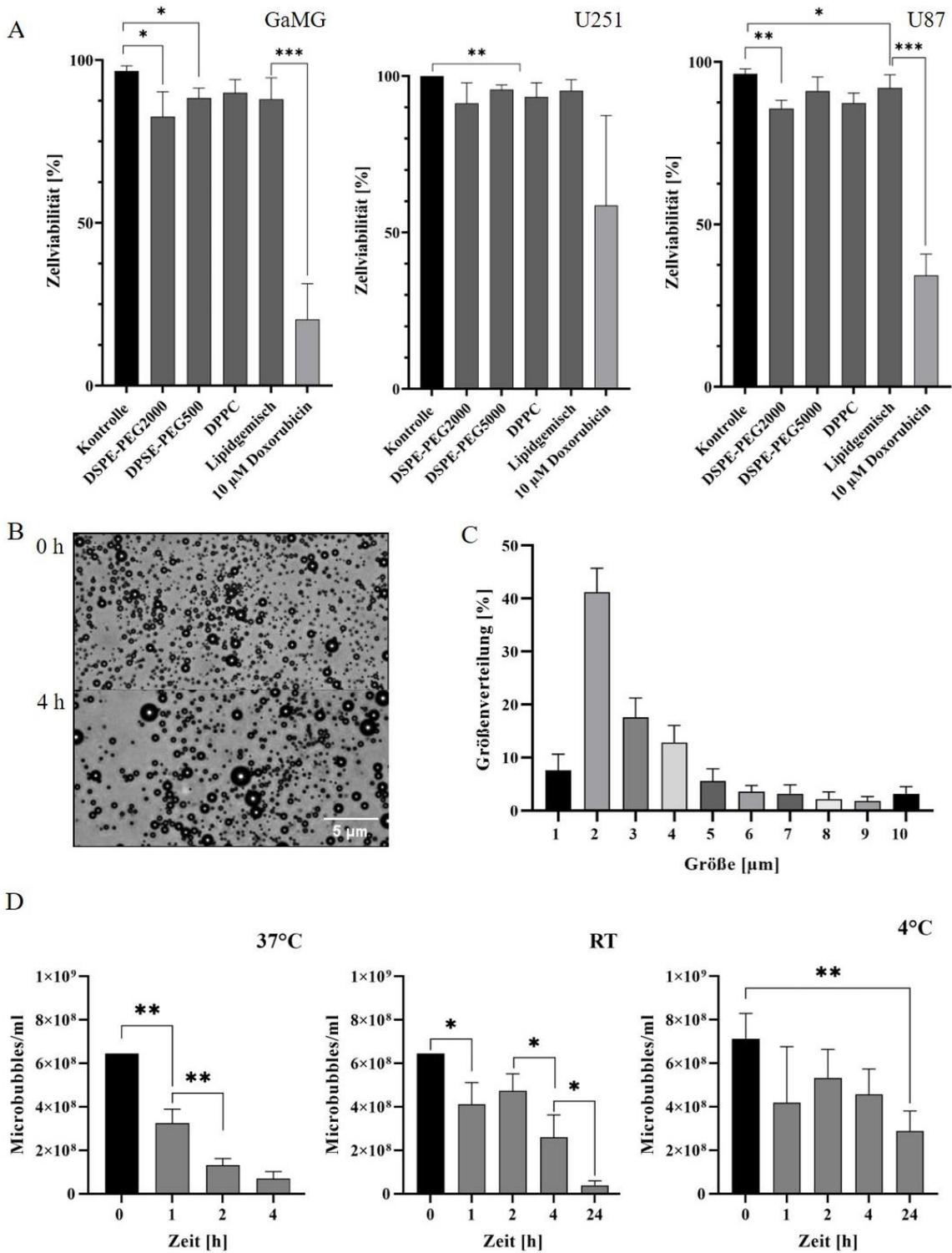


Abbildung 11: Stabilität und Charakterisierung der MB und deren Einfluss auf die Viabilität von GBM-Zellen. A) Einfluss der Lipide und 10 μ M Dox auf GBM-Zelllinien GaMG, U251 und U87 nach 48 h Inkubation. Die Vitalität wurde mittels MTT-Assay ermittelt. Dabei wurde die Absorption bei 540 nm Wellenlänge nach 48 h Behandlung gemessen. $n=3$. B) Repräsentative mikroskopische Aufnahme der MB bei einer Lagerung bei 4 $^{\circ}$ C zu den Zeitpunkten 0 h und 4 h nach Synthese. 40 x Objektiv, Skalierungsbalken 5 μ m. C) Größenverteilung der MB in μ m direkt nach Synthese. $n=3$. D) Quantifizierung der MB-Anzahl pro ml bei 37 $^{\circ}$ C, Raumtemperatur und 4 $^{\circ}$ C $n=3$. * = $p \leq 0,005$, ** = $p \leq 0,01$, Dox = Doxorubicin, MB = Microbubbles, RT = Raumtemperatur

6.2. Wirkung von LIFU auf GBM-Zellen und MB

Der Einfluss von LIFU wurde auf GBM-Zellen getestet. Dabei wurde nach 5-minütiger Ultraschallapplikation die absolute Zellzahl im Zeitrahmen von 0 h bis 72 h nach Behandlung bestimmt (Abbildung 12A). Von einer initialen Zellzahl von 1×10^4 stieg diese bei U138-Zellen auf 4×10^4 Zellen, bei GaMG-Zellen auf 7×10^4 und bei U87 Zellen sogar auf über 1×10^5 Zellen an. Im Verlauf der Messung nahm die Zellzahl somit stetig zu. Zwischen den Kontrollansätzen und den behandelten Zellen konnte für alle Zelllinien zu den gemessenen Zeitpunkten (24 h, 48 h und 72 h) kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Wurde Ultraschall mit der gleichen Intensität und Dauer auf MBs appliziert, so waren diese nach 5 Minuten nahezu komplett zerplatzt (Abbildung 12B).

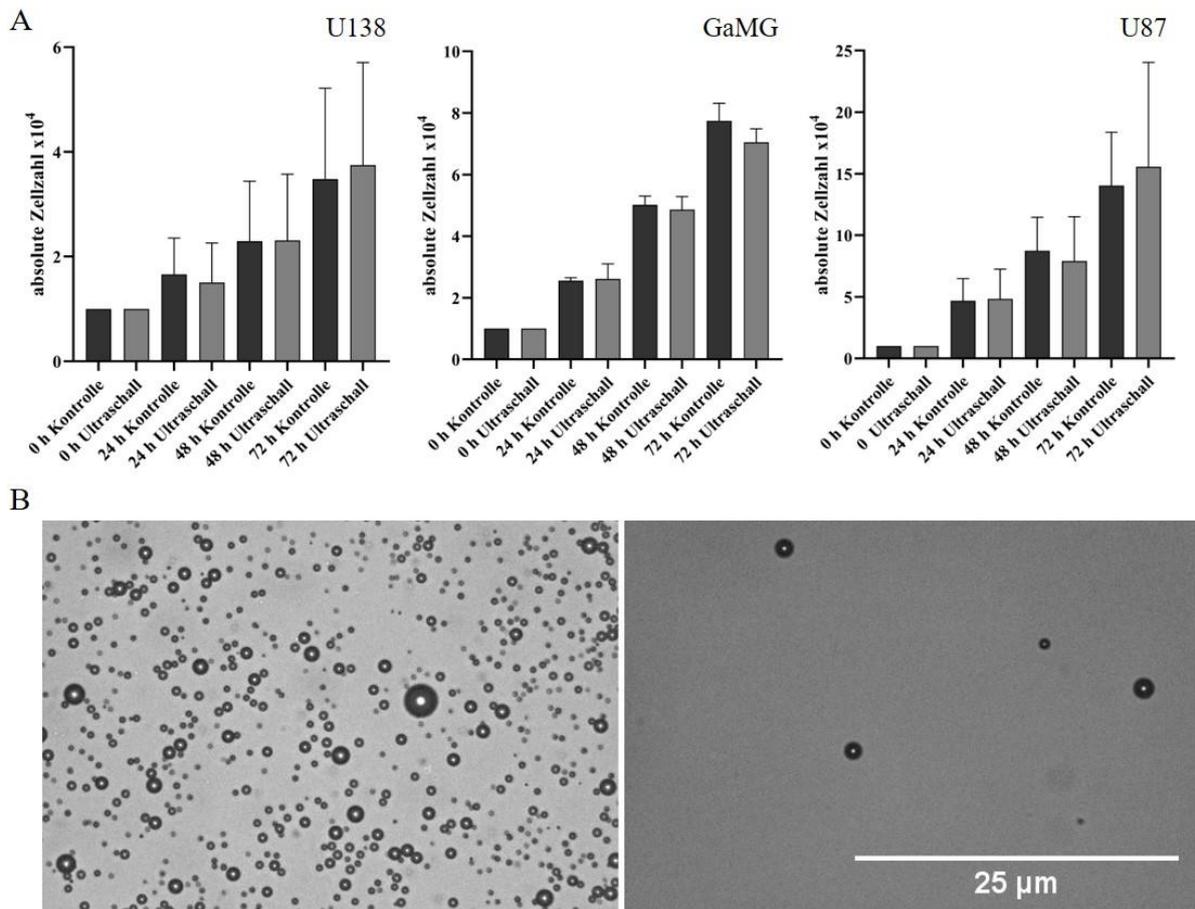


Abbildung 12: Einfluss von fokussiertem Ultraschall mit niedriger Intensität auf GBM-Zellen und MB. A) Absolute Zellzahl der GBM-Zelllinien GaMG, U87 und U138 nach 24 h, 48 h und 72 h nach Ultraschallapplikation., $n = 3$. B) Exemplarische mikroskopische Aufnahme von MB vor (links) und nach (rechts) Ultraschallapplikation. $n = 3$, Skalierungsbalken = 25 µm, Pulsfrequenz = 99 Hz, Pulsdauer = 1000 µs, Amplitude = 30 µm, Ultraschallfrequenz = 500 kHz, Dauer = 5 Minuten

6.3. Wirksamkeit von verschiedenen Chemotherapeutika auf GBM-Zellen und ihre Eignung zur Beladung von Microbubbles

Die Wirksamkeit der Platin(II)- bzw. Palladium(II)-Komplexe auf GBM-Zellen wurde bereits mittels MTT-Assay ermittelt. Dabei ergaben sich für die GBM-Zelllinie GaMG EC_{50} -Werte im Bereich von 36,9-4,2 μM , insbesondere die Komplexe mit den langkettigen Alkylresten wiesen eine hohe Toxizität auf (Viviane Mawamba Kemo 2020). Diese Werte stellen eine Endpunktmessung nach 72 h Behandlung dar. Um die toxische Wirkung der Komplexe und die damit zusammenhängende Zellproliferation in Echtzeit messen zu können, wurde das xCELLigence® RTCA System eingesetzt. Dabei hatten Palladium(II)-Verbindungen mit einer langen Alkylkette (C8) bereits bei einer Konzentration von 1 μM einen Effekt auf die Zellen, da der auf den Zeitpunkt der Komplexzugabe normalisierte Zellindex nach 24 h signifikant abnahm und bei unter 0,5 lag. Bei einer Behandlung mit 10 μM sank der Zellindex bereits direkt nach Zugabe auf 0,1 ab und blieb konstant (Abbildung 13A). Bei einer Platin(II)-Verbindung mit einer langen Alkylkette zeigte sich die Wirkung weniger stark. Der Zellindex fiel auf rund 0,6 und halbierte sich somit im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, deren Zellindex bei 1,1 lag (Abbildung 13B). Einen ähnlichen Effekt konnte bei einer Palladium(II)-Verbindung mit kurzer Alkylkette (C1) beobachtet werden. Der Zellindex lag nach Zugabe der Verbindung konstant unter 1, wohingegen die Kontrolle einen stetig zunehmenden Zellindex von über 1 aufwies (Abbildung 13C).

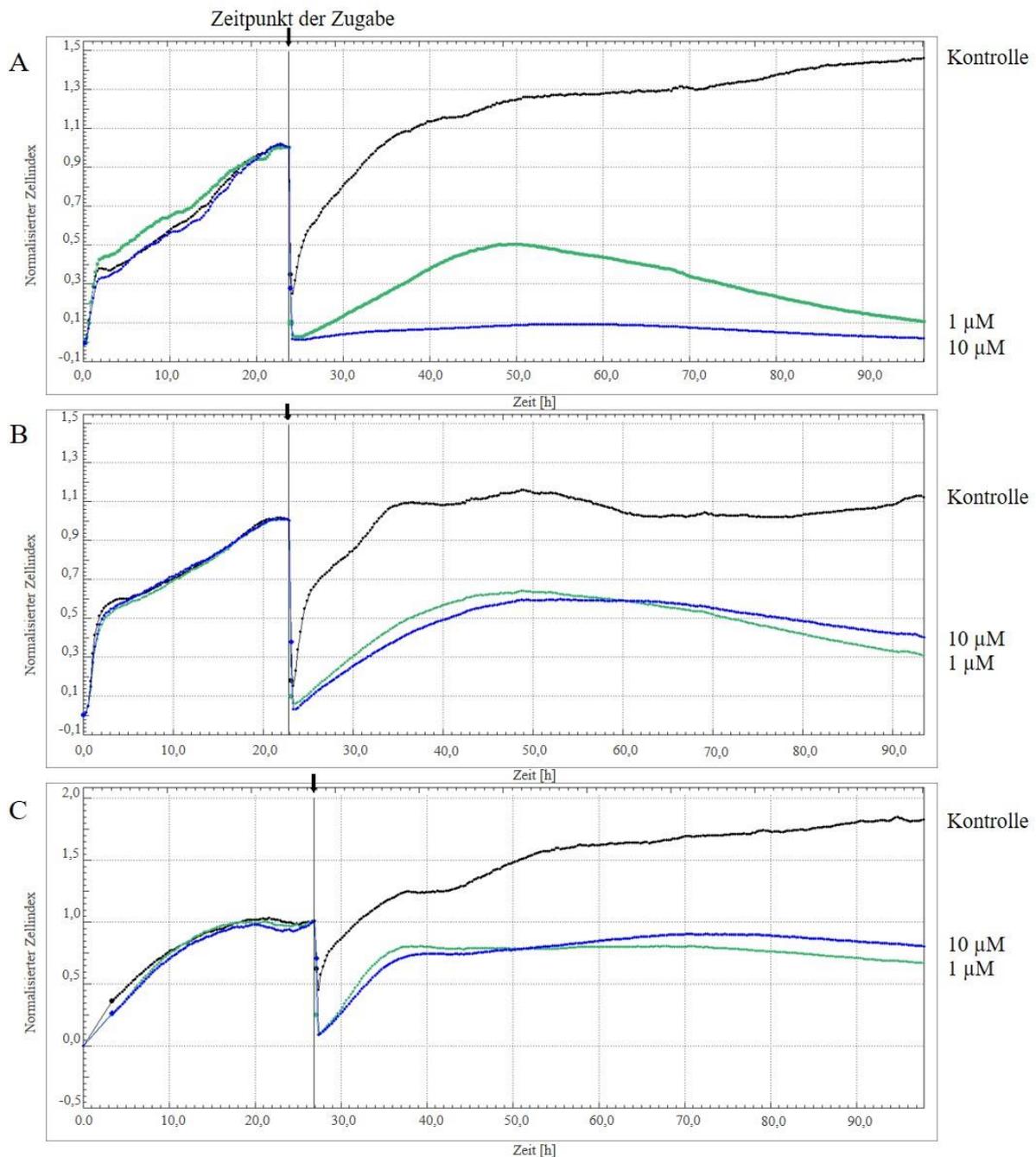


Abbildung 13: Echtzeitproliferationsassay von GaMG GBM-Zellen unter der Behandlung von Palladium(II)- und Platin(II)-Komplexen für 72 h im xCELLigence RTCA System. A) Zellindex von GaMG-Zellen unter Behandlung mit 1 μM (grün) und 10 μM (blau) Palladium(II)-Komplex mit C8-Kette im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (schwarz). $n = 3$. B) Zellindex von GaMG-Zellen unter Behandlung mit 1 μM (grün) und 10 μM (blau) Platin(II)-Komplex mit C8-Kette im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (schwarz). $n = 3$. C) Zellindex von GaMG-Zellen unter Behandlung mit 1 μM (grün) und 10 μM (blau) Palladium(II)-Komplex mit C1-Kette im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (schwarz). $n = 3$. GBM= Glioblastoma

Der EC_{50} -Wert von Dox sowie der Nachweis von dessen Aufnahme in GBM-Zellen, wurde bereits in Vorversuchen erarbeitet (Hiltensberger 2021). Der Echtzeitproliferationsassay ergab unter der Behandlung mit 100 nM Dox einen steigenden Zellindex, der mit dem Zellindex des Kontrollansatzes am Ende der Behandlung identisch war. Bei einer Behandlung mit 0,5 μM

Dox stieg der Zellindex in den ersten 36 h an, nahm dann jedoch bis zu einem Wert von unter 0 ab. Wurde die Konzentration erhöht, so zeigte sich bei 10 μM als auch schon bei 1 μM Dox eine stetige Abnahme des Zellindex in den negativen Bereich. Auffällig war, dass zu Beginn der Behandlung der Zellindex in den ersten 4 h abfiel (Zellindex: 0,25), dann wieder anstieg (Zellindex: 1), bevor er kontinuierlich sank (Abbildung 14).

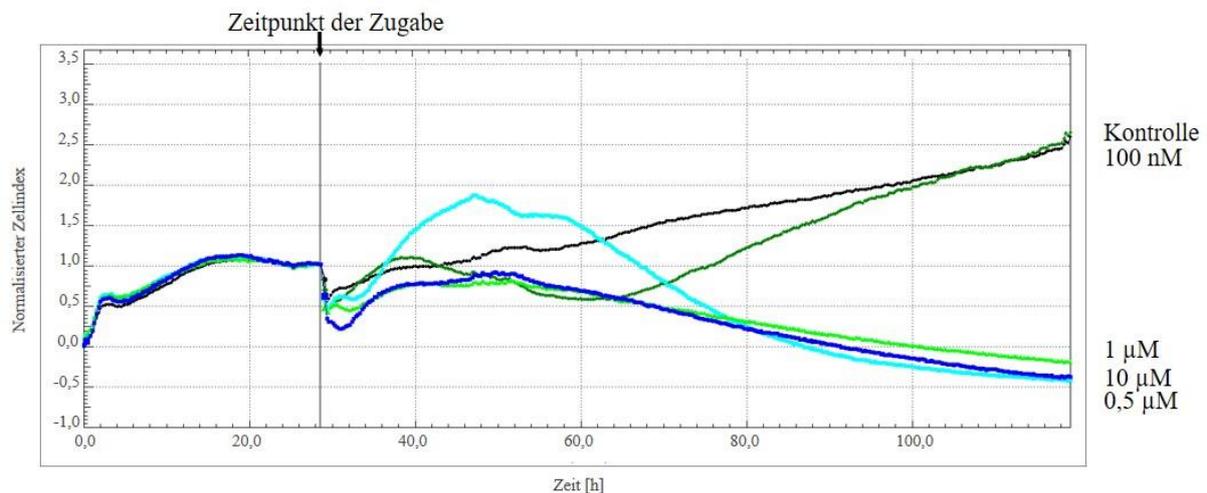


Abbildung 14: Echtzeitproliferationsassay von GaMG GBM-Zellen unter der Behandlung mit 10 μM (blau), 1 μM (grün), 0,5 μM (hellblau) und 100 nM (dunkelgrün) Doxorubicin für 96 h im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (schwarz), $n=3$. GMB= Glioblastoma

6.4. Beladung der Microbubbles mit Dox und Evaluierung der erfolgreichen Aufreinigung mittels HPLC

Die mit 10 μM Dox beladenen MB müssen nach der Synthese aufgereinigt werden, um so das frei vorliegende, nicht integrierte Dox aus der Lösung zu entfernen. Die Beladungs- und Aufreinigungseffizienz wurde mittels HPLC ermittelt. Die Analyse ergab für die unbeladenen MB nach einer Retentionszeit von 2,252 Minuten einen Peak mit einer Höhe von 4244 und einer Fläche von 90086. Diese war jedoch nicht auf eine Dox-Detektion zurückzuführen (Konzentration= 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Die MB_{Dox} zeigten einen Peak mit einer Höhe von 993358 und einer Fläche von 3256319, was auf eine Dox-Konzentration von 6,63 $\mu\text{g}/\text{ml}$ schließen lässt. Die MB_{Dox}, welche nach der Synthese aufgereinigt wurden, zeigten einen Messpeak mit einer Fläche von 2229903 und einer Höhe von 373390, was einer Konzentration von 1,55 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Dox entsprach. Berücksichtigte man zusätzlich die eingesetzte MB-Anzahl pro ml, so ergab sich eine Konzentration von 0,58 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Dox vor der Aufreinigung und 0,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Dox nach der

Aufreinigung in 1×10^8 MB. Dies entsprach einer Beladungseffizienz von 52 %, womit die aufgereinigten MB eine Endkonzentration von 5 μM in Lösung hatten (Tabelle 13).

Tabelle 13: Daten der HPLC-Messung von unbeladenen MB, als auch mit MBDOX vor und nach der Aufreinigung mittels Dialyse und Ionen-Austausch-Chromatographie. Dox= Doxorubicin, MB= Microbubbles, MBDOx= mit Doxorubicin beladene Microbubbles

Probe	MB	MBDOx	MBDOx (aufgereinigt)
Retentionszeit [min]	2,252	2,154	2,156
Fläche	90086	6256319	2229903
Höhe	4244	993358	373390
Dox-Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	0	6,63	1,55
MB-Konzentration [MB/ml]	$1,09 \times 10^9$	$1,14 \times 10^9$	$5,17 \times 10^8$
Dox-Konzentration in 1×10^8 MB [$\mu\text{g/ml}$]	0	0,58	0,3

Direkt nach der Synthese war unter dem Fluoreszenzmikroskop eine großflächige Fluoreszenz erkennbar, welche nicht abgrenzbar war. Die HPLC-Messung ergab bei einer Retentionszeit von 2,154 Minuten einen Peak (Abbildung 15A). Nach der Aufreinigung waren unter Anregung mit einer Wellenlänge von 555 nm klar definierte rot fluoreszierende MB zu erkennen. Die HPLC-Messung ergab nach einer Retentionszeit von 2,156 Minuten ebenfalls einen Peak (Abbildung 15B).

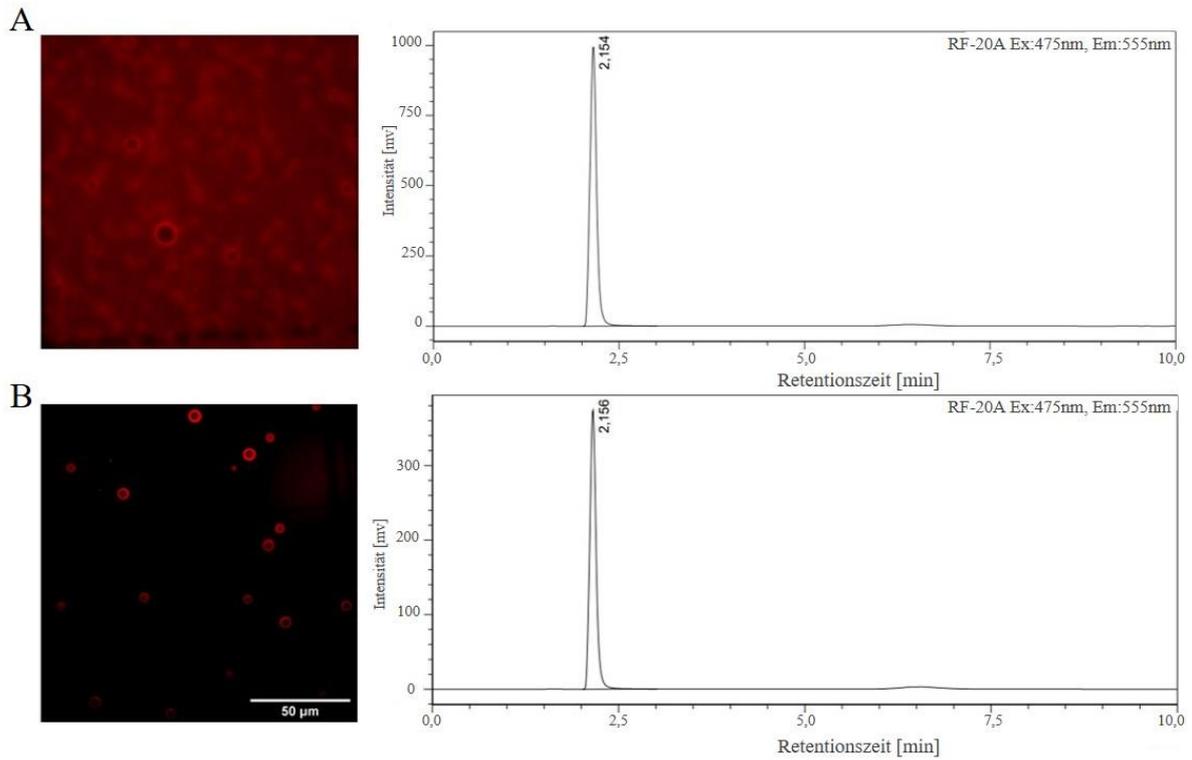


Abbildung 15: Beladungseffizienz von Dox in MB. Exemplarische fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von MBDox A) nach der Synthese und B) nach Aufreinigung mittels Dialyse und Ionen-Austausch-Chromatographie, sowie Verlaufsdiagramm der HPLC-Messung. Dox= Doxorubicin, HPLC= Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, MB= Microbubbles, MBDox= mit Doxorubicin beladene Microbubbles

6.5. Wirksamkeit von MBDox auf GBM Zellen in 2D-Zellkultur

Nachdem Dox erfolgreich in die MB integriert und sichergestellt worden war, dass sich kein überschüssiges Dox in der Lösung befand, konnte die Behandlung der GBM-Zellen mit MBDox durchgeführt werden. Um das Wirkprinzip zu überprüfen, wurden zunächst GBM-Zellen in einem einfachen 2D-Zellkulturmodell untersucht. Die Behandlung der Zellen mit MB wurde nach 48 h mittels immunhistochemischer Fluoreszenzfärbung gegen γ H2AX und GFAP ausgewertet. So konnte die schädigende Wirkung von Dox auf die DNA der Zellen indirekt nachgewiesen werden. Dabei waren bei den mikroskopischen Aufnahmen von U138 GBM-Zellen nach deren Behandlung mit MBDox und Ultraschallapplikation, sowie mit 10 μ M Dox eine erhöhte Anzahl an γ H2AX positiven Zellkernen erkennbar (Abbildung 16A). Die Färbung gegen GFAP ermöglichte es, die Zellstruktur sichtbar zu machen. Im Vergleich zur Kontrolle und der Behandlung mit MBDox zeigte sich sowohl in der Behandlung mit 10 μ M Dox als auch durch das aus den MB freigesetzte Dox eine Vergrößerung der Zelloberfläche. Die quantitative Auswertung ergab, dass die Ultraschallapplikation keinen negativen Einfluss auf die Zellen hatte, da die Anzahl an γ H2AX positiven Zellen keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrolle (16,3 %) und der Ultraschallapplikation (15 %) aufwies ($-1,33 \pm 2,03$, 95 % CI= -6,96 - 4,29, $p= 0,5467$) (Abbildung 16B). Der Anteil an γ H2AX positiven Zellen erhöhte sich unter der Behandlung mit MBDox im Vergleich zu unbeladenen MB von 15,7 % auf 45 % ($29,33 \% \pm 7,06$, 95 % CI= 9,75 - 48,92, $p= 0,0142$). Unter Behandlung mit MBDox und zusätzlicher Ultraschallapplikation stieg die Anzahl an γ H2AX positiven Zellen signifikant an ($30,00 \pm 6,952$, 95% CI= 10,70 - 49,30, $p= 0,0125$) und erreichte mit einem Anteil von 75 % das Maximum. Dieser Wert unterschied sich nicht signifikant zur Behandlung mit 10 μ M Dox ohne LIFU (62 %, $-13,00 \pm 8,813$, 95 % CI= -37,47 - 11,47, $p= 0,2142$) und auch nicht mit LIFU (70,3 %, $-4,667 \pm 5,333$, 95 % CI= -19,47 - 10,14, $p= 0,4310$).

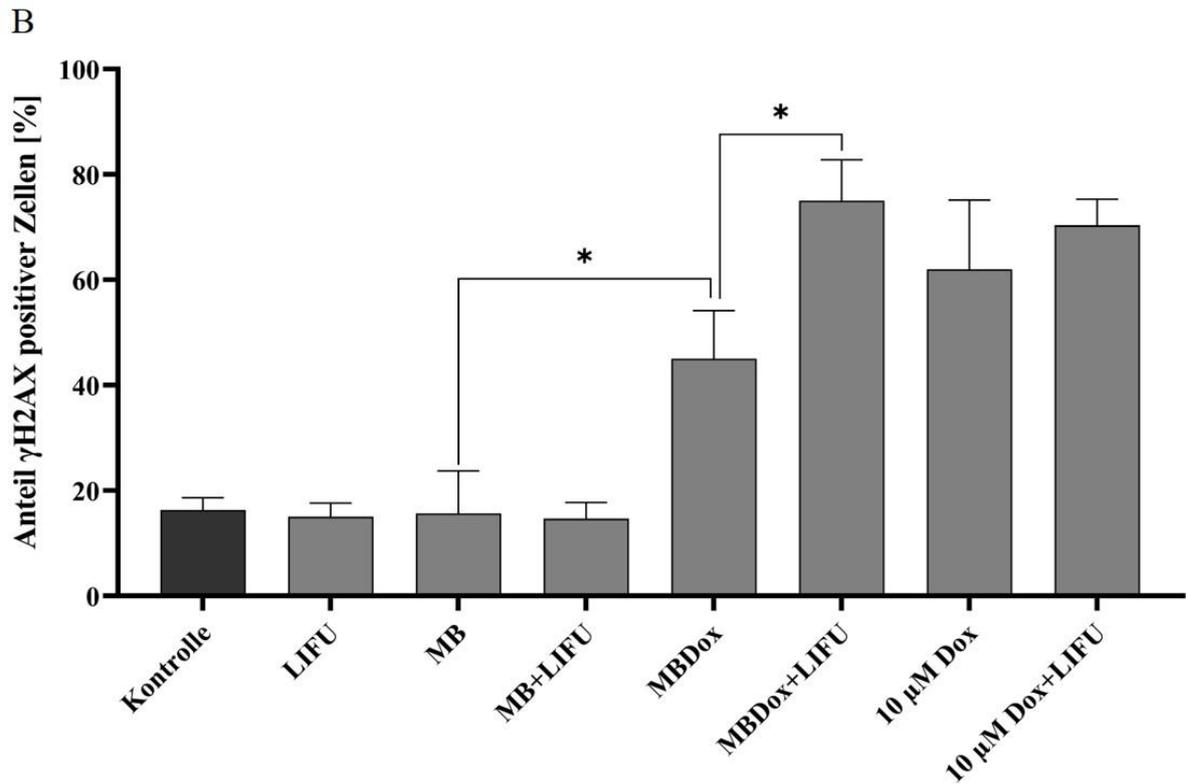
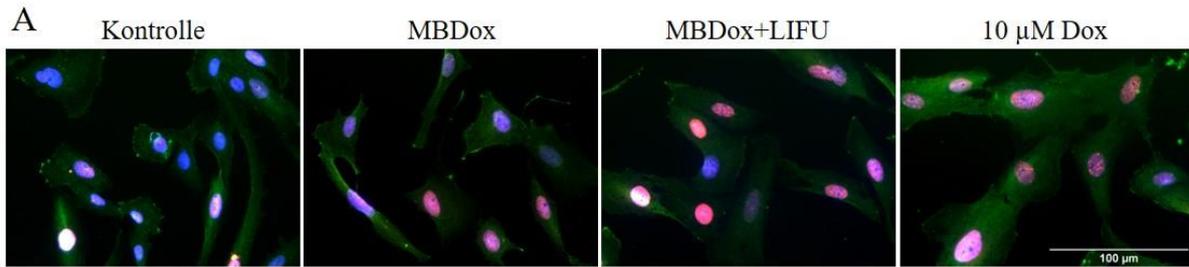


Abbildung 16: Behandlung von U138 GBM-Zellen mit beladenen und unbeladenen MB mit und ohne Ultraschallapplikation im 2D-Zellkulturmodell. A) Exemplarische immunhistochemische Fluoreszenzfärbung von U138 GBM-Zellen nach 48 h Behandlung. Blau= DAPI, grün= GFAP, rot= γ H2AX, 40x Objektiv, Skalierungsbalken= 25µm, n= 3. B) Quantifizierung der γ H2AX positiven Zellkerne nach 48 h Behandlung und Vergleich der verschiedenen Behandlungen. $p^* \leq 0,05$, n= 3. Dox= Doxorubicin, GBM= Glioblastoma, LIFU= Low intensity focused ultrasound, MB= Microbubbles, MBDox= mit Doxorubicin beladene Microbubbles

Derselbe Versuch wurde auch mit der GBM-Zelllinie U87 durchgeführt. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigten ein ähnliches Bild wie das der U138-GBM-Zellen. Die Behandlung mit MBDox, MBDox und LIFU, sowie mit 10 μ M Dox erhöhte die Anzahl an γ H2AX positiven Zellkernen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 17A). In der statistischen Auswertung ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Behandlung mit MBDox ($24 \% \pm 7,1$) und MBDox mit LIFU ($57 \% \pm 5,7$) ($33,00 \pm 6,403$, 95 % CI= 5,450 - 60,55, $p=0,0356$). Auch zur Behandlung mit 10 μ M Dox ($30 \% \pm 5,7$) und 10 μ M Dox in Kombination mit LIFU ($39 \% \pm 2,1$) zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Anteil der γ H2AX positiven Zellkernen im Vergleich zu MBDox plus LIFU (10 μ M Dox: $-27,00 \pm 5,657$, 95 % CI= -51,34 - -2,661, $p=0,0412$; 10 μ M Dox + LIFU: $-18,50 \pm 4,272$, 95 % CI= -36,88 - -0,1191, $p=0,0494$). Die Kontrolle ($10 \% \pm 0,7$) unterschied sich nicht signifikant zur LIFU-Applikation ($7 \% \pm 1,4$) und auch nicht zu den unbeladenen MB ($17 \% \pm 14,9$) (LIFU: $-2,500 \pm 1,118$, 95 % CI= -7,311 - 2,311, $p=0,1548$; MB: $7,000 \pm 10,51$, 95 % CI= -38,23 - 52,23, $p=0,5740$). Auch zwischen MB und MBDox konnte keine signifikante Zunahme der γ H2AX positiven Zellkerne festgestellt werden ($7,500 \pm 11,63$, 95 % CI= -42,54 - 57,54, $p=0,5851$) (Abbildung 17B).

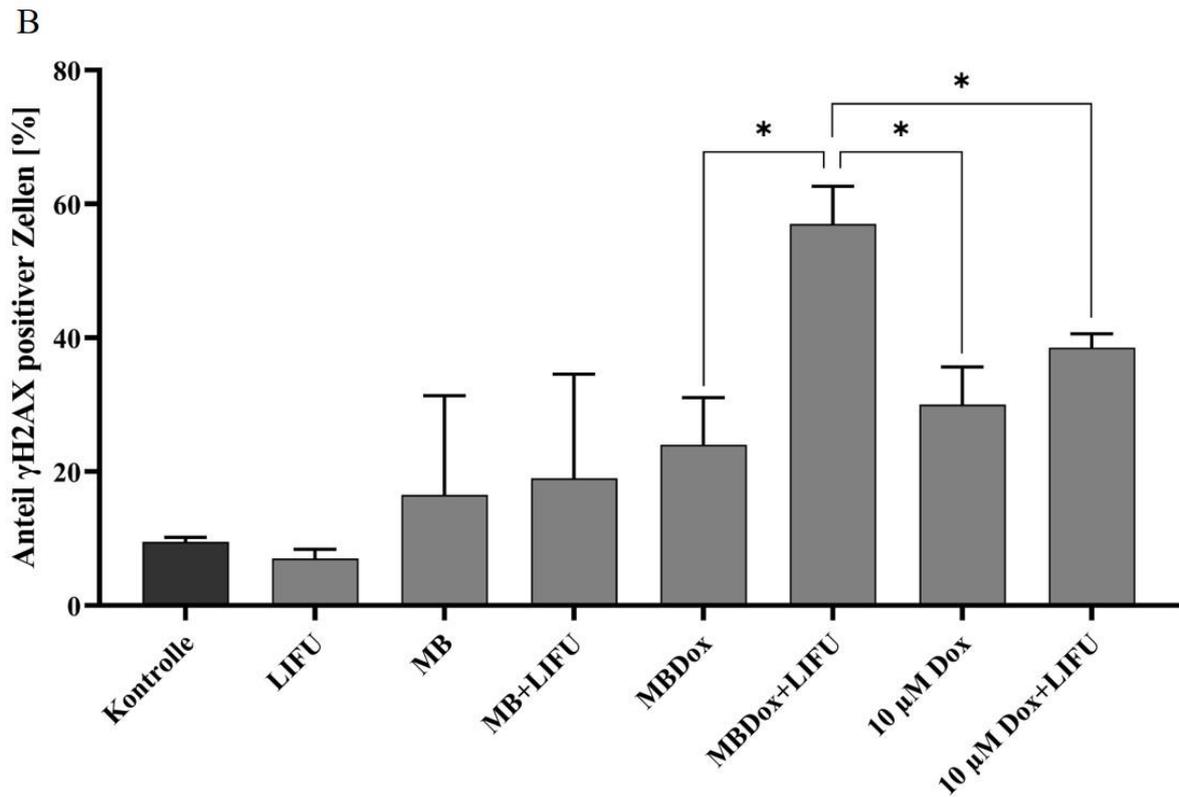
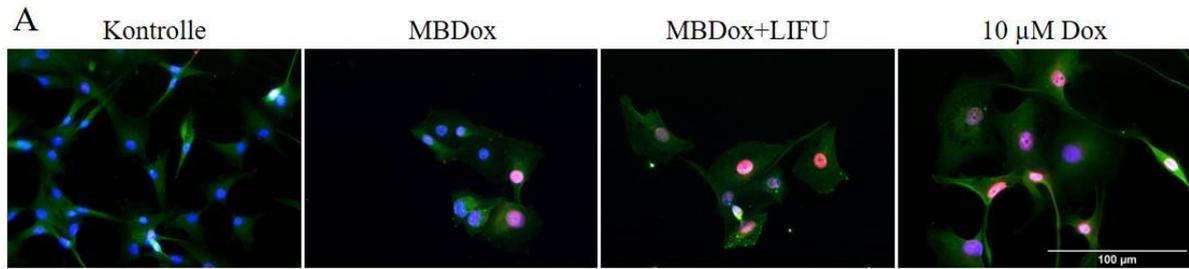


Abbildung 17: Behandlung von U87 GBM-Zellen mit beladenen und unbeladenen MB mit und ohne Ultraschallapplikation im 2D-Zellkulturmodell. A) Exemplarische immunhistochemische Fluoreszenzfärbung von U87 GBM-Zellen nach 48 h Behandlung. Blau= DAPI, grün= GFAP, rot= γ H2AX, 40xObjektiv, Skalierungsbalken= 100µm, n= 2. B) Quantifizierung der γ H2AX positiven Zellkerne nach 48 h Behandlung und Vergleich der verschiedenen Behandlungen. $p^* \leq 0,05$, n= 3. Dox= Doxorubicin, GBM= Glioblastoma, LIFU= Low intensity focused ultrasound, MB= Microbubbles, MBDox= mit Doxorubicin beladene Microbubbles

6.6. Wirksamkeit von MBDox auf GBM-Zellen in 3D SISser-Kultur

Die Behandlung von GBM-Zellen in 2D-Zellkultur gibt nur bedingt die Wirkung der beladenen MB wieder. Aus diesem Grund wurde der Versuch systematisch, beginnend mit dem SISser-Modell, in die 3D-Zellkultur überführt. Die GBM-Zellen wuchsen innerhalb von 10 Tagen tief in die Serosa des dezellularisierten Schweinedarmes ein und wurden anschließend für 48 h mit MB behandelt. Die unbeladenen Zellen (Kontrolle) wiesen nur einen sehr geringen Anteil γ H2AX positiver Zellen ($3 \% \pm 1,5$) auf (Abbildung 18A). Ein vergleichbares Bild ergab sich bei der Behandlung mit unbeladenen MB ($1,5 \% \pm 0,7$). Auch die mit Dox beladenen MB ($3,5 \% \pm 0,7$) zeigten im Vergleich zu den unbeladenen MB ($1,5 \% \pm 0,7$) keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Anzahl an γ H2AX positiven Zellen ($2,00 \pm 0,707$, 95 % CI= $-1,042 - 5,042$, $p= 0,106$). Wurden die beladenen MB jedoch mittels Ultraschall zum Platzen gebracht, so stieg der Anteil γ H2AX positiver Zellen auf $27,7 \% (\pm 9,1)$ im Vergleich zur MB-Behandlung ohne Ultraschallapplikation ($3,5 \% \pm 0,7$) signifikant an ($24,17 \% \pm 6,94$, 95 % CI= $2,09 - 46,24$, $p= 0,0399$). Die Behandlung mit $10 \mu\text{M}$ reinem Dox nach Ultraschallapplikation ($30 \% \pm 4,7$) als auch mit Dox beladenen MB nach Ultraschallapplikation ($27,7 \% \pm 9,1$) ergab einen sehr hohen Anteil an γ H2AX positiven Zellen ohne signifikanten Unterschied zueinander ($2,33 \pm 5,98$, 95 % CI= $-14,27 - 18,94$, $p= 0,716$) (Abbildung 18B).

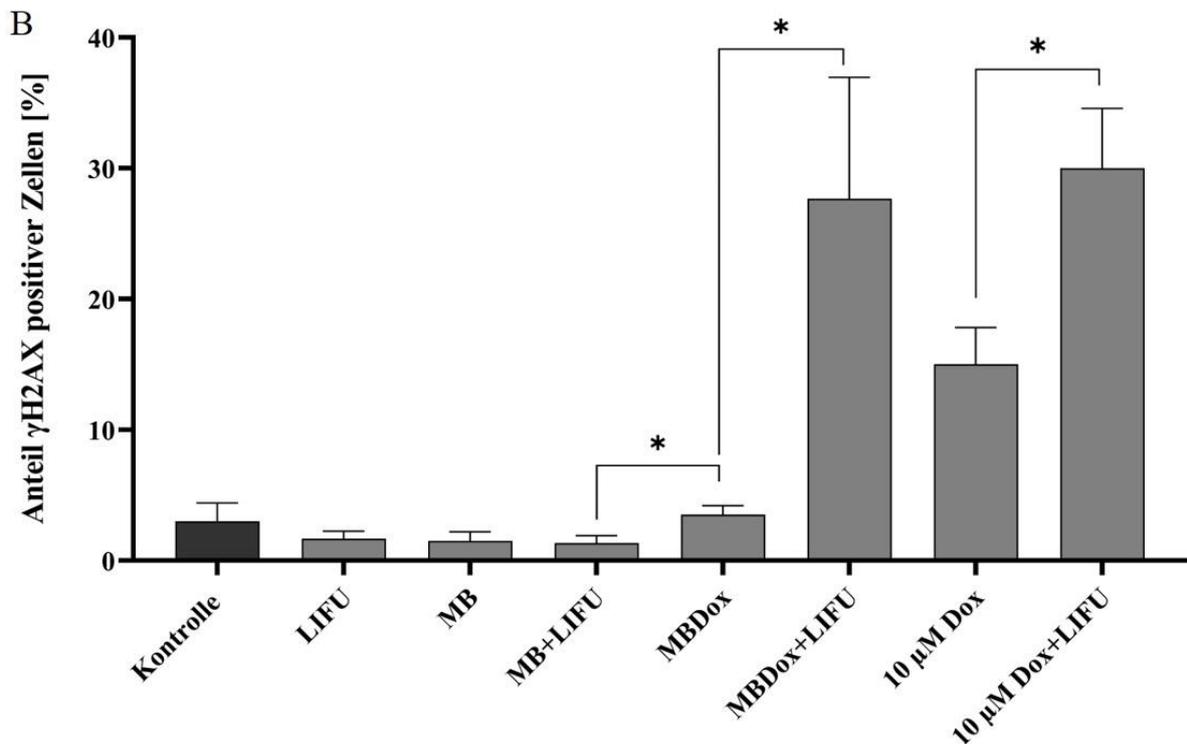
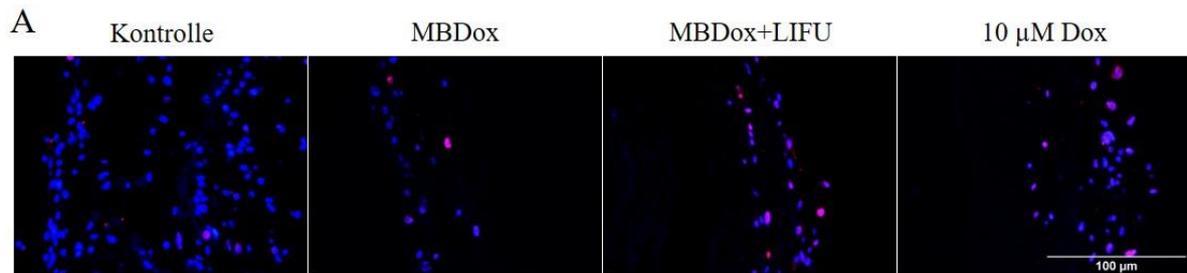


Abbildung 18: Behandlung von U87 GBM-Zellen im 3D-SISsermodell mit beladenen und unbeladenen MB mit und ohne Ultraschallapplikation. A) Exemplarische immunhistochemische Fluoreszenzfärbung von U87 GBM-Zellen nach 48 h Behandlung. Blau= DAPI, rot= γ H2AX, 40x Objektiv, Skalierungsbalken=25 μ m, n= 3. B) Quantifizierung der γ H2AX positiven Zellkerne nach 48 h Behandlung und Vergleich der verschiedenen Behandlungen. * \leq 0,05, n= 3, Dox= Doxorubicin, GBM= Glioblastoma, LIFU= Low intensity focused ultrasound, MB= Microbubbles, MBDox= mit Doxorubicin beladene Microbubbles

6.7. Wirksamkeit von MBDox auf GBM-Zellen im Bioreaktor

Um der *in vivo* Situation noch näher zu kommen, wurde die Behandlung der GBM-Zellen mit beladenen MBs in einem Bioreaktor durchgeführt. Die Vaskularisierung des Tumors sollte so dargestellt werden. Die Behandlung erfolgte über einen perforierbaren Kanal, der mittig durch ein Hydrogel führte in dem GBM-Zellen kultiviert wurden. Die Aufnahmen zeigten nach 72 h

Kultivierung einen hohen Anteil an grün fluoreszierenden Zellen in der Lebend-Tod-Färbung, was für eine hohe Vitalität der Zellen sprach. Der Anteil an rot fluoreszierenden Zellen erhöhte sich nach der Behandlung mit MBDox in Kombination mit Ultraschall, was für eine hohe Rate an apoptotischen Zellen sprach (Abbildung 19A). Die statistische Auswertung belegte, dass beladene, intakte MB (11,7 % \pm 0,07) keinen negativen Effekt auf die Zellen hatten, da sie keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle (12,7 % \pm 0,09) hervorriefen ($-1,000 \pm 6,700$, 95 % CI= $-19,60 - 17,60$, $p= 0,8886$). Die Ultraschallapplikation zeigte einen signifikanten Anstieg von rot fluoreszierenden Zellen auf 55 % ($-43,33 \pm 7,172$, 95 % CI= $-63,25 - -23,42$, $p= 0,0038$). Dieser Anteil unterschied sich nicht signifikant zur Behandlung mit 10 μ M reinem Dox (36,3 %, $18,67 \pm 7,535$, 95 % CI= $-2,254 - 39,59$, $p= 0,0684$) (Abbildung 19B).

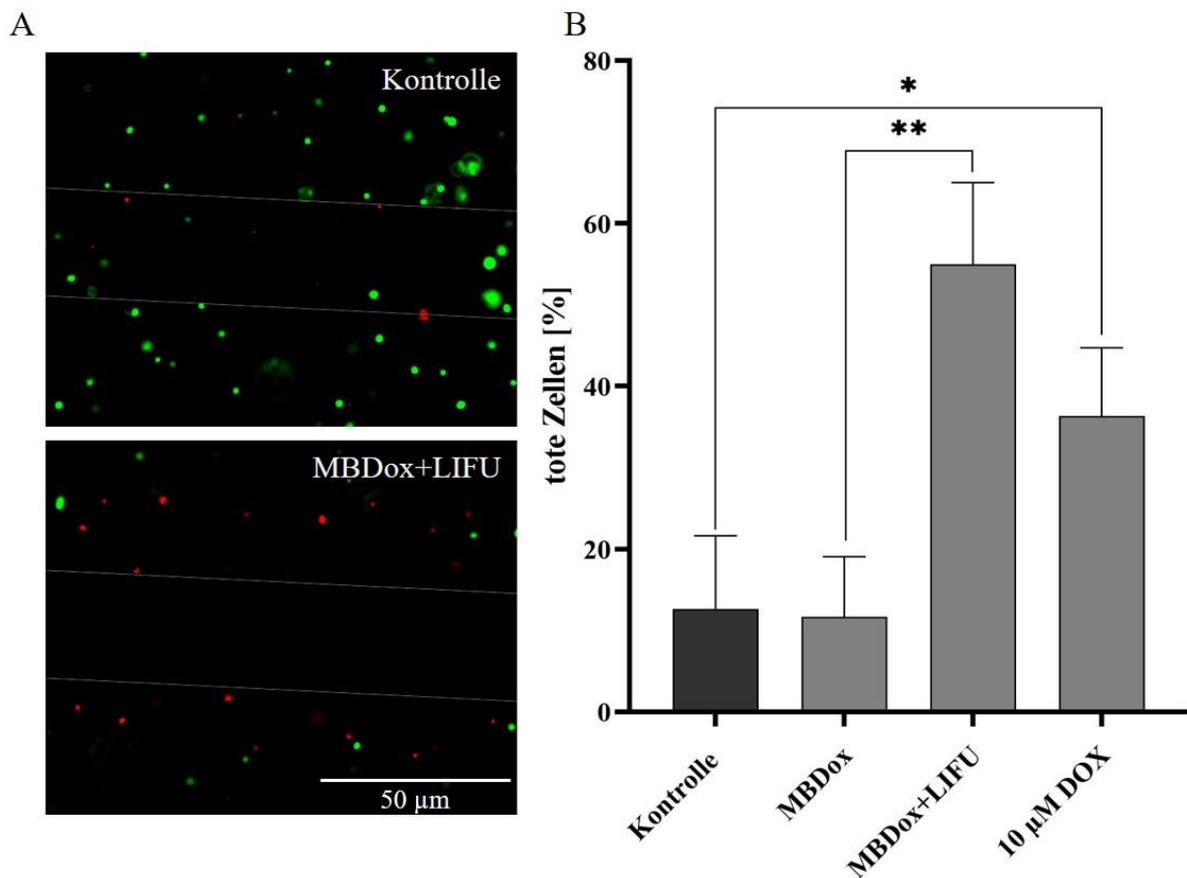


Abbildung 19: Wirkung von MBs auf GBM-Zellen im 3D-Bioreaktor. A) Exemplarische fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer Lebend-Tod-Färbung von U87 GBM-Zellen im Bioreaktor nach Behandlung mit MBDox+LIFU im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. grün= lebende Zellen, rot= tote Zellen 40x Objektiv, Skalierungsbalken= 50 μ m, n= 3. B) Quantifizierung toter Zellen nach 48 h Behandlung mit MBDox, MBDox+LIFU und 10 μ M Dox im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle., * = $p \leq 0,005$, ** = $p \leq 0,01$, n=3 Dox= Doxorubicin, GBM= Glioblastoma, LIFU= Low intensity focused ultrasound, MB= Microbubbles, MBDox= mit Doxorubicin beladene Microbubbles

6.8.Etablierung von OHSC

Die Präparation und Kultur von OHSC konnte erfolgreich etabliert werden (Schulz et al. 2021). Die hippocampalen Strukturen blieben erhalten (Abbildung 20A) und die frisch angelegten Kulturen wiesen einen hohen Anteil GFAP-positiver Zellen auf (Abbildung 20B). Um die Vitalität der Hirnschnitte zu bewerten wurden während der Kultivierung Lebend-Tod-Färbungen durchgeführt. Direkt nach der Präparation der OHSC zeigten sich überwiegend grün fluoreszierende, lebende Zellen. Lediglich in den Randbereichen waren rot fluoreszierende und somit tote Zellen sichtbar (Abbildung 20C). Nach 7 Tagen in Kultur war zwar eine Zunahme an toten Zellen nachweisbar, allerdings waren diese vor allem oberflächlich und peripher lokalisiert (Abbildung 20D).

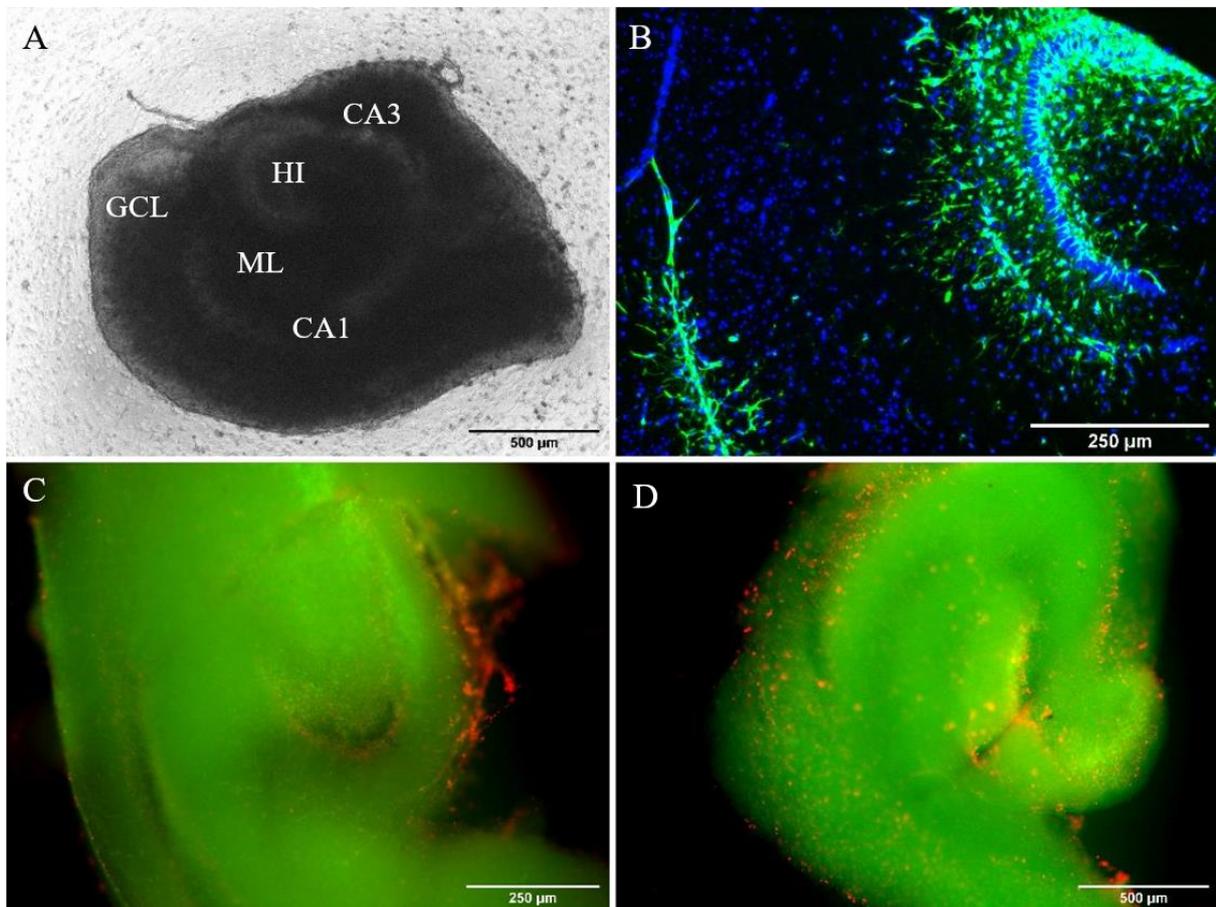


Abbildung 20: Kultivierung von hippocampalen Brain Slice Kulturen aus der Maus. A) Lichtmikroskopische Aufnahme eines frisch präparierten OHSC. Granule Cell Layer (GCL), Cornu ammonis subfield (CA1 und CA3), hilus region (HI) und molecular layer (ML) (Schulz et al. 2021). 5x Objektiv, Skalierungsbalken= 500 µm. B) Immunhistochemische Fluoreszenzfärbung eines Paraffinschnittes von OHSC frisch nach Präparation. DAPI= blau, GFAP=grün, 10x Objektiv, Skalierungsbalken= 250 µm. C) Lebend-Tod-Färbung von OHSC frisch nach der Präparation. 10x Objektiv, Skalierungsbalken= 250 µm. und D) nach 7 Tagen in Kultur. grün= lebende Zellen, rot= tote Zellen, 5x Objektiv, Skalierungsbalken= 500 µm. OHSC= Organotypic hippocampal brain slice cultures

Auf OHSC ausplattierte GBM-Zellen wachsen nach wenigen Tagen zu Mikrotumoren heran (Hagemann et al. 2013). U87-Zellen hatten zum Zeitpunkt des Ausplattierens bereits Sphäroide gebildet. Nach 2 Tagen in Kultur bildeten sich Mikrotumoren an den OHSC aus. Nach 4 Tagen war eine deutliche Vergrößerung der Mikrotumoren erkennbar und nach 6 Tagen war eine weitere Invasion und enormes Wachstum zu beobachten (Abbildung 21A). Mikrotumoren bildeten sich auch aus Patienten stammenden GBM-Zellen (Abbildung 21B), sowie Organoiden (Abbildung 21C) (Schulz, Dufner 2021 in Vorbereitung).

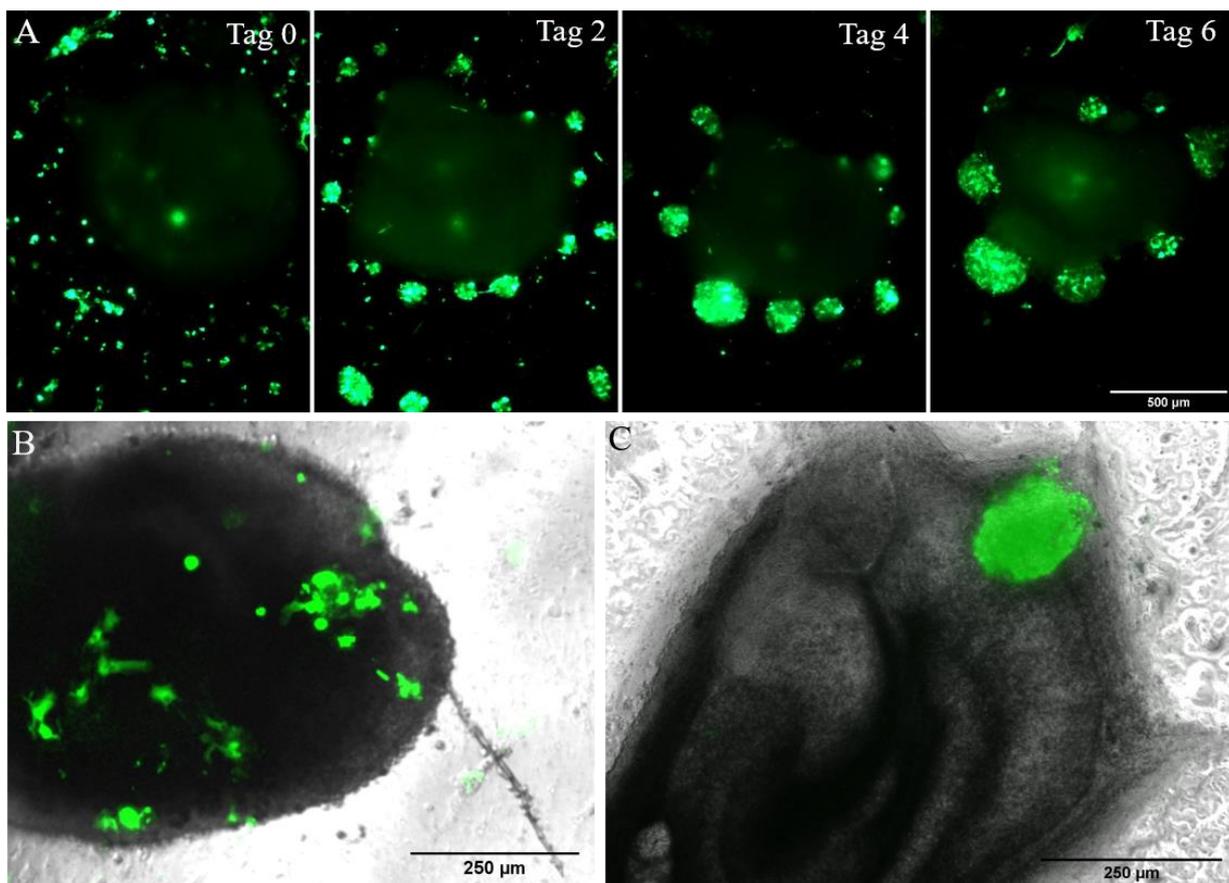


Abbildung 21: Mikroskopische Aufnahmen des Wachstumsverlaufs von Mikrotumoren auf OHSC. A) Mikrotumoren aus GFP-transfizierten U87 GBM-Zellen auf OHSC nach Tag 0, 2, 4 und 6 nach Ausplattieren. 5x Objektiv, Skalierungsbalken= 500 µm. B) Mikrotumoren aus GFP-transfizierten PZ auf OHSC. 5x Objektiv, Skalierungsbalken= 250 µm. C) fluoreszenzmarkierte GBM-Organoiden auf OHSC. 10x Objektiv, Skalierungsbalken= 250 µm. Grün= fluoreszenzmarkierte Mikrotumoren. GBM= Glioblastoma, OHSC= organotypic brain slice cultures, PZ= Primärzellen

Um die OHSC als 3D-Modell für die Behandlung von GBM mit beladenen MB nutzen zu können, musste ihre Eignung zunächst mittels eines bereits etablierten Therapieansatzes getestet werden. Hierfür wurden TTFIELDS verwendet. In Vorversuchen wurde zunächst die

Wirksamkeit der TTFIELDS auf PZ in 2D-Zellkulturen als adhärenter Monolayer getestet. Die PZ reagierten unterschiedlich stark auf TTFIELDS. Nach 72 h Behandlung zeigte PZ 1 (18202 ± 9741) eine Abnahme in der Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle (36650 ± 6068) (-18448 ± 3334 , 95 % CI= $-25363 - -11534$, $p = <0,0001$). Hingegen konnte bei PZ 2 (28650 ± 1768) und PZ 3 (27240 ± 12885) kein signifikanter Unterschied in der Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle (Kontrolle PZ 2: 28733 ± 4445 , Kontrolle PZ 3: 27967 ± 5282) festgestellt werden (PZ 2: $-83,33 \pm 3308$, 95 % CI= $-7567 - 7400$, $p = 0,9805$) (PZ 3: $-726,7 \pm 4283$, 95 % CI= $-9855 - 8401$, $p = 0,8675$) (Abbildung 22A). Die PZ wurden mit GFP transfiziert und als Mikrotumoren auf die OHSC ausplattiert und anschließend mit TTFIELDS für 72 h behandelt. Die Tumorgößen wurden vor und nach der TTFIELDS-Applikation bestimmt. Der statistische Vergleich zwischen Mikrotumoren mit und ohne TTFIELDS-Applikation gab einen Hinweis auf den Effekt der Behandlung. Die Mikrotumoren der PZ 1 ($-90 \% \pm 21$) zeigten eine signifikante Minderung der Tumorgöße nach 72 h TTFIELDS-Applikation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($37 \% \pm 66$) ($-126,9 \pm 16,19$, 95 % CI= $-160,0 - -93,75$, $p = <0,0001$). Gleiches konnte auch bei den Mikrotumoren der PZ 2 ($-90 \% \pm 27$) und PZ 3 ($-37 \% \pm 87$) beobachtet werden. Hier gab es eine Abnahme der Tumorgößen im Vergleich zur Kontrolle (Kontrolle PZ 2: $15 \% \pm 5$, Kontrolle PZ 3: 101 ± 107) (PZ 2: $-106,2 \pm 19,58$, 95 % CI= $-147,4 - -65,09$, $p = <0,0001$; PZ 3: $-138,2 \pm 28,78$, 95 % CI= $-196,1 - -80,40$, $p = <0,0001$) (Abbildung 22B). Auch Mikrotumoren aus U87 GBM-Zellen wurden auf OHSC getestet. Dabei zeigte sich in der Kontrollgruppe ohne TTFIELDS-Applikation ein fortschreitendes Wachstum der Mikrotumoren über 72 h. Nach 72 h TTFIELDS-Applikation waren dagegen keine Mikrotumoren mehr sichtbar, obwohl sie vor der Behandlung ein invasives Wachstum aufwiesen. Während die Tumoren ohne TTFIELDS-Applikation durchschnittlich um 72 % (± 100) in ihrer Größe zunahmen, schrumpften sie unter TTFIELDS-Behandlung um 28 % (± 70) ($-101,4 \pm 16,72$, 95 % CI= $-134,6 - -68,29$, $p = 0,0001$) (Abbildung 22B). Die Mikroskopaufnahmen zeigten, dass die mit GFP-transfizierten Mikrotumoren aus PZ in die OHSC einwuchsen und unter TTFIELDS-Applikation schrumpften oder teils ganz verschwinden (Abbildung 22A). Hingegen wuchsen die Mikrotumoren unter normalen Kulturbedingungen ohne TTFIELDS-Applikation. (Abbildung 22C)

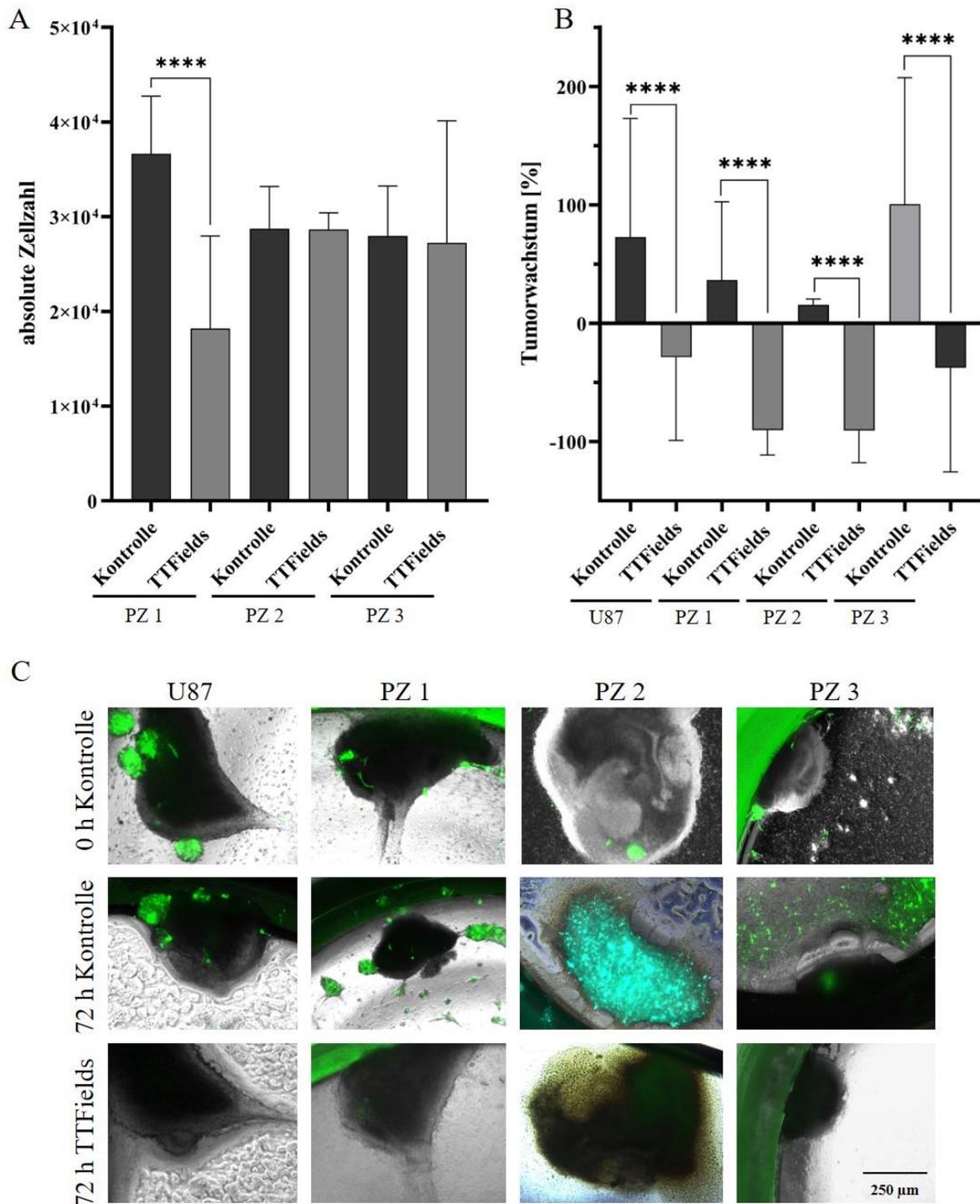


Abbildung 22: Einfluss von TTFields auf PZ und Mikrotumoren aus PZ und U87 GBM-Zellen A) Statistische Auswertung der Zellzahl von PZ in 2D-Zellkultur als Monolayer unter der Behandlung von TTFields für 72 h im Vergleich zum Zeitpunkt 0 h vor der Behandlung. $n = 3-18$ B) Statistische Auswertung der Tumorgöße der Mikrotumoren aus U87 GBM-Zellen und PZ vor und nach TTFields-Applikation im Vergleich zur Kontrolle. PZ 1 $n = 7$, PZ 2 $n = 7$, PZ 3 $n = 13$, U87 $n = 24$. C) Mikroskopische Aufnahmen von OHSC mit Mikrotumoren aus GFP-transfizierten U87 GBM-Zellen und PZ unter TTFields-Behandlung als auch die unbehandelte Kontrolle zum Zeitpunkt 0 h und nach 72 h Behandlung. Objektiv= 5x Skalierungsbalken= 250 μm . ****= $p \leq 0,0001$. GBM= Glioblastoma, GFP= Green fluorescent protein, OHSC= organotypic brain slice cultures, PZ= Primärzellen, TTFields= Tumor Treating Fields

Mikrotumoren aus Organoiden können das TME und die Tumorheterogenität besser darstellen. Aus diesem Grund wurden fluoreszenzmarkierte Organoiden auf OHSC ausplattiert und mit TTFields für 72 h mit 200 kHz behandelt. Die Tumorgöße wurde jeweils vor und nach der TTFields-Applikation anhand von mikroskopischen Aufnahmen bestimmt (Abbildung 23B). Das Organoid zeigte unter TTFields-Applikation ($-64\% \pm 43$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (32 ± 13) nach 72 h eine signifikante Abnahme der Tumorgöße ($-96,18 \pm 19,53, 95\% \text{ CI} = -136,3 - -56,03, p < 0,0001$) (Abbildung 23A)

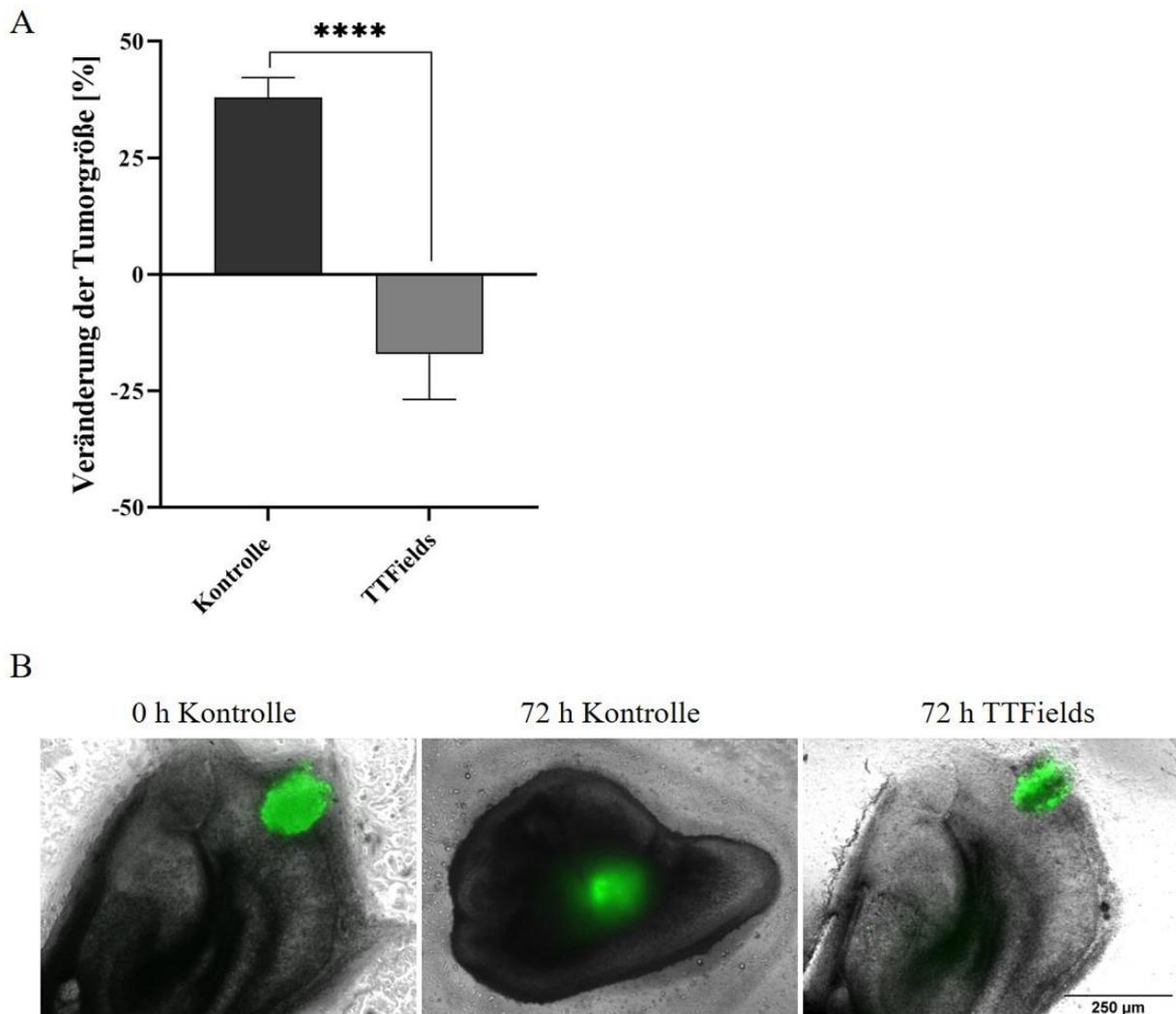


Abbildung 23: Mikrotumoren aus Organoiden vor und nach 72 h TTFields-Applikation mit 200 kHz A) Mikroskopische Aufnahmen von OHSC mit Mikrotumoren aus fluoreszenzmarkierten GBM-Organoiden unter TTFields-Behandlung als auch die unbehandelte Kontrolle zum Zeitpunkt 0 h und nach 72 h Behandlung. Objektiv= 5x Skalierungsbalken= 250 μm . B) Statistische Auswertung der Tumorgöße vor und nach TTFields-Applikation im Vergleich zur Kontrolle. $n = 24$, ****= $p \leq 0,000$. GBM= Glioblastoma, OHSC= Organotypic brain slice cultures, TTFields= Tumor Treating Fields

6.9. Humane GBM Slice-Kulturen

Obwohl auf OHSC wachsende Mikrotumoren aus GBM-Zellen ein gutes 3D-*in vitro* Modell darstellen, spiegeln sie nicht genau die Eigenschaften eines soliden Hirntumors wider. Humane GBM-Tumorschnitte von zwei verschiedenen Patienten wurden daher aus frisch intraoperativ gewonnenem Gewebe hergestellt, in Kultur genommen und als Proof-of-Concept Versuch mit TTFields behandelt. Nach 72 h wurde eine immunhistochemische Fluoreszenzfärbung gegen den Proliferationsmarker Ki67 durchgeführt (Abbildung 24A). Die humanen Tumorschnitte von GBM 1 erbrachten in der statistischen Auswertung direkt nach der Präparation des GBM einen Anteil von 6 % (± 3) Ki67-positiver Zellen, nach 72 h Kultivierung unter Normalbedingungen lag der Anteil bereits bei 15 % (± 5) und nach 72 h TTFields-Applikation zeigte sich sogar ein Anteil von 25 % (± 5). Der Anteil an Ki67-positiven Zellen erhöhte sich unter TTFields signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($9,833 \pm 2,903$, 95 % CI= 3,365 - 16,30, $p= 0,0069$). Bei den Tumorschnitten von GBM 2 lag der Anteil an Ki67-positiven Zellen zu Beginn der Kultivierung bei 10 % (± 6), und sank nach 72 h auf 9 % (± 2). Nach der TTFields-Applikation für 72 h zeigte sich ein Anteil von 5 % (± 4), dieser war im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant niedriger ($-3,625 \pm 1,499$, 95 % CI= -6,841 - -0,4094, $p= 0,0298$) (Abbildung 24B).

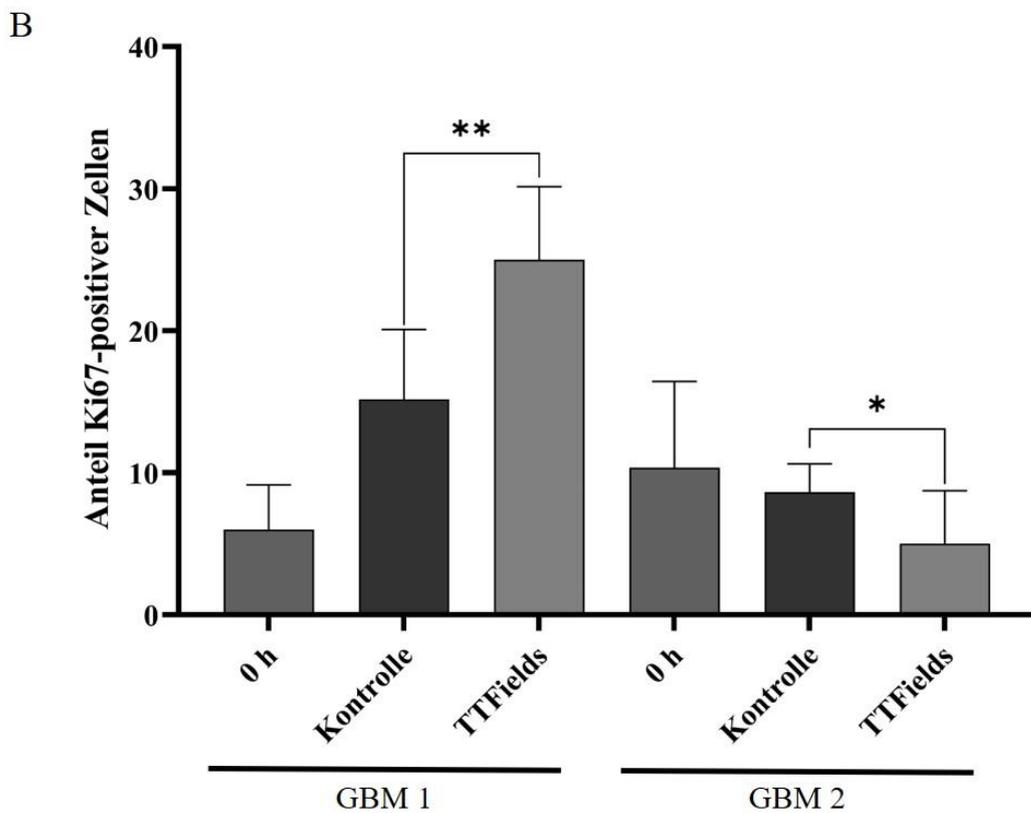
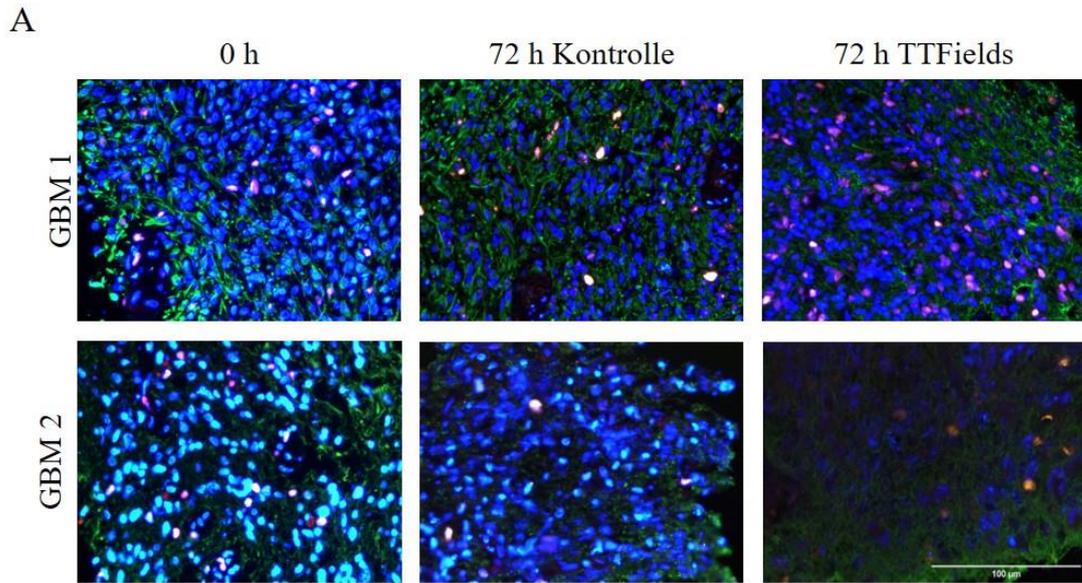


Abbildung 24: Humane Brain Slices unter TTFields-Behandlung bei 200 kHz. A) Exemplarische fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Antikörperfärbung gegen GFAP und Ki67 von humanen GBM-Tumorschnitten direkt nach der Präparation (0 h), nach 72 h Kultivierung als auch nach 72 h TTFields-Applikation. Blau= DAPI, rot= Ki67, grün= GFAP, 40x Objektiv, Skalierungsbalken= 100 µm B) Quantifizierung Ki67-positiver Zellen in humanen GBM-Tumorschnitten nach 72 h Behandlung mit 200 kHz TTFields als auch unbehandelter Kontrollen nach 0 h und 72 h. n= 3, *= $p \leq 0,005$, **= $p \leq 0,01$. GBM= Glioblastoma, TTFields= Tumor Treating Fields

7. Diskussion

Zweifelsohne ist in der Behandlung von GBM noch großer Optimierungsbedarf vorhanden. Die derzeitige Standardtherapie umfasst neben der maximal möglichen Resektion eine Bestrahlung mit adjuvanter TMZ-Gabe. Auch die neuartige Behandlung mit TTFields konnte das OS zwar verbessern (Stupp et al. 2017; Stupp et al. 2005), ermöglicht aber noch kein zufriedenstellendes Langzeitüberleben. Das GBM zeichnet sich durch inter- als auch intrapersonelle Heterogenität aus (Aum et al. 2014). Dadurch ist es nicht möglich, dass ein Chemotherapeutikum für alle GBM-Patienten gleichermaßen wirksam und effektiv ist. Die größte Hürde bei der Entwicklung von neuen Therapieansätzen stellt allerdings die BHS dar, die das Passieren vieler Chemotherapeutika verhindert. Um dies zu umgehen, gibt es zwei Möglichkeiten: Die BHS muss temporär geöffnet werden oder das Chemotherapeutikum muss physikochemische Eigenschaften erfüllen, um die BHS passieren zu können (Omidi et al. 2021). Ein hochwirksamer Therapieansatz muss also die BHS überwinden und flexibel in der Art der individuell verabreichten Chemotherapeutika sein. Besonders gut geeignet sind hierfür Drug Delivery Systeme, insbesondere Liposomen, die in der Lage sind Wirkstoffe, Proteine oder DNA einzuschließen (Cha et al. 2020). MB bestehen nicht nur aus zelleigenen Lipiden (Park et al. 2012), sondern stellen auch durch ihre Größe einen Vorteil für ihre Beladungseffizienz dar (Amoabediny et al. 2018). Zusätzlich werden sie bereits in der Klinik zur Bildgebung als Kontrastmittel bei Ultraschalluntersuchungen eingesetzt (Fix et al. 2015). Hinzukommend besteht die Möglichkeit, die BHS mittels MB und LIFU zu öffnen (Dasgupta et al. 2016). Hierzu gibt es schon in der Literatur veröffentlichte Erfolge. In Tierversuchen mit Primaten hatte das wiederholte Öffnen und Schließen der BHS keinen negativen Effekt auf das umliegende Gewebe, den zentralen Glucose-Metabolismus, die Nervenleitung in der Elektroenzephalographie und löste keine epileptischen Signale aus (Horodyckid et al. 2017). Auch in klinischen Studien wurde fokussierter Ultraschall bereits erfolgreich eingesetzt, um die BHS zu öffnen (Carpentier et al. 2016). Auch in Kombination mit Chemotherapeutika gab es schon Erfolge. In einer Studie an Kaninchen wurde mittels US und MB die BHS temporär geöffnet, um so die Konzentration von injiziertem TMZ am Tumor zu erhöhen (Beccaria et al. 2016). Während TMZ nur bei Patienten mit MGMT-Methylierung wirksam ist (Mansouri et al. 2019), hat Dox den Vorteil, dass es targetunspezifisch wirkt, indem es an die DNA bindet und dort Brüche induziert. Treat et al. nutzten in ihrer Studie an Ratten ebenfalls US und MB zur Öffnung der BHS und verabreichten Dox. Hierbei zeigte sich, dass sich am Tumor deutlich mehr Dox anlagerte als im umliegenden Gewebe (Treat et al. 2007). Kurze Zeit später nutzte die selbe Arbeitsgruppe liposomales Dox und konnte hier ein signifikant gesteigert OS im

Tierversuch mit Ratten dokumentieren (Treat et al. 2012). Diese Versuche zeigen, dass eine Verabreichung von MB und US mit Chemotherapeutika generell durch die Öffnung der BHS einen gesteigerten Effekt haben. Es liegt daher nahe, dieses Prinzip zu nutzen und die Wirksamkeit zu erhöhen, indem man die MB direkt mit Dox belädt. Genau dies tat die Arbeitsgruppe von Escoffre et al, indem sie mit liposomalem Dox beladene MB nutzten, um die BHS mit US zu überwinden. So konnte eine 4-fache Menge an Dox im Tumor erreicht werden (Escoffre et al. 2013). Hierbei wurden Liposomen, die 200 nm groß sind, mit Dox befüllt und an MB gekoppelt. NB oder Liposomen solcher Größen haben den Nachteil, dass sie sich auch in kleinen Blutgefäßen anlagern (Maeda 2015). Größere MB können nicht nur mehr Dox aufnehmen, sondern sind allein auf Grund ihrer Größe auf ihren Wegen durch den Blutkreislauf limitiert. Dadurch besteht eine bessere Chance am Target anzukommen. Auch Studien zu Tierversuchen mit freiem Dox in Kombination mit MB und US lassen sich finden (Kovacs et al. 2014; Xiao et al. 2019a). MB dienen oft lediglich als Kontrast- und Hilfsmittel bei der Öffnung der BHS mit US. Die Integration von Dox in MB und die anschließende Freisetzung mittels LIFU stellt allerdings einen innovativen Ansatz dar. Ein weiterer Aspekt stellt die Abschirmung der Chemotherapeutika durch die Lipidhülle von der Umwelt dar. Durch eine gesteuerte lokale Freisetzung können systemische Nebenwirkungen, die durch die toxischen Substanzen hervorgerufen werden, minimiert werden.

All diese Aspekte zusammen ergeben eine einzigartige Methode MB als Drug Carrier für Chemotherapeutika einzusetzen und diese dann mittels LIFU über die BHS zu bringen. Genau dieses Prinzip wurde in der vorliegenden Arbeit ausführlich getestet. Neben den Eigenschaften der MB wurde die Beladungseffizienz mit Dox untersucht und die Auswirkungen in Kombination mit LIFU in geeigneten 2D- und 3D-Zellkulturmodellen getestet. Zusätzlich wurden zwei Hirnschnittmodelle entwickelt, die zukünftig auch als Testsystem dienen können.

Auch wenn sich in der Literatur zahlreiche Protokolle zur Herstellung von MB finden lassen, so zeigten Vorversuche eine nicht ausreichende Stabilität. Um diese zu steigern und eine effektive Beladung mit Chemotherapeutika zu ermöglichen, wurde ein neues Synthesekonzept erarbeitet und untersucht.

7.1. Wirksamkeit von MBDox auf 2D- und 3D-GBM-Modelle

Die MB bestehen aus Lipiden, die einen Gaskern aus C_3F_8 haben. Eine Studie bewies bereits, dass die zur MB-Synthese verwendeten Gase keinen negativen Einfluss auf das Hirngewebe haben, dazu zählt auch das hier eingesetzte C_3F_8 (Omata et al. 2019). Die hier verwendeten Lipide zur MB-Synthese hatten insgesamt keinen negativen Einfluss auf GBM-Zellen. Eine leichte Abnahme in der Viabilität konnte zwar für einzelne Lipide nachgewiesen werden, jedoch zeigte die Lipidmischung keinen negativen Effekt. Zudem sei erwähnt, dass der MTT-Assay eine kolometrische Viabilitätsmessung ist, die aufgrund von Licht bestimmter Wellenlänge das in den Zellen umgesetzte MTT misst. Lipide lagern sich aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften gerne als Schicht an der Flüssigkeitsoberfläche an und stellen somit eine Barriere für die Lichtmessung dar. Licht streut durch die Lipidschicht (Xiao et al. 2019b), wodurch es zu einer Beeinträchtigung der Messergebnisse kommen kann. Die Arbeit von Angius und Floris stellt den MTT-Assay als nicht geeignete Methode zur Untersuchung von Zellviabilität in Verbindung mit Liposomen dar. Liposomen bewirken eine Zunahme der Formazan-Speicherung in den Zellen (Angius und Floris 2015). Dies liegt an den lipophilen Eigenschaften des Formazans, welches sich bevorzugt in Lipidtröpfchen und in der Zellmembran akkumuliert (Diaz et al. 2007). Dennoch konnte in dieser Arbeit ein deutlicher Unterschied in der Viabilität zwischen der Behandlung mit Lipiden und dem hoch toxischen Dox beobachtet werden. Wodurch der MTT-Assay zur Bestimmung der Viabilität nach Behandlung von GBM-Zellen mit Lipiden aussagekräftig ist.

Als weitere wichtige Komponente wurde der Einfluss von LIFU auf GBM-Zellen und MB untersucht. LIFU zeigte keinen negativen Einfluss auf GBM-Zellen. Dies bestätigt auch ein Blick in die Literatur (Song et al. 2021). Generell gilt LIFU als nicht invasive Methode und wird zur Tiefenhirnstimulation ohne pathologische Veränderung des Hirngewebes genutzt (Darrow 2019).

MB zerplatzen unter Ultraschalleinfluss (Borden et al. 2005). Dies konnte in dieser Arbeit durch Applikation von LIFU auf MB bestätigt werden.

Da die Behandlung mit MB und LIFU für GBM-Zellen unbedenklich war, konnten die MB mit Chemotherapeutika beladen werden. Die Bandbreite an Wirkstoffen ist groß. Es galt ein Chemotherapeutikum zu finden, welches zum einen eine hohe Wirksamkeit gegenüber GBM-Zellen aufzeigt und sich zum anderen erfolgreich in die MB integrieren lässt.

Zurzeit zählt die Verabreichung von TMZ zur Standardtherapie (Stupp et al. 2005). Der Einsatz von anderen Chemotherapeutika wird durch die BHS erschwert. MB sollen diese als Carrier-System für Chemotherapeutika überwinden. Allerdings eignen sich nicht alle Chemotherapeutika zur Beladung der MB, da diese vor allem lipophile Eigenschaften besitzen müssen, um in die MB integriert werden zu können (Sirsi et al. 2013). Das hochwirksame und bereits erfolgreich in der Tumorthherapie eingesetzte Cisplatin, zeigt zwar eine erhebliche zytotoxische Wirkung gegenüber GBM-Zellen, kann aber aufgrund seiner chemischen Eigenschaften nur schwer in die MB integriert werden (Silver et al. 2010; Dasari und Tchounwou 2014; Raudenska et al. 2019). Das Institut für anorganische Chemie unter der Leitung von Prof. Dr. Schatzschneider synthetisierte Substanzen in Anlehnung an das hochwirksame Cisplatin. Es handelt sich dabei um Platin(II)- bzw. Palladium(II)-Komplexe, die mit Alkylketten als lipophile Substituenten versehen sind. Aufgrund der niedrigen Polarisierung der Kohlenstoff-Wasserstoff-Bindungen in den unpolaren Alkylketten sind diese lipophil (Johnston et al. 2012). Je länger die Alkylkette der Metallkomplexe ist, desto höher ist die Affinität zu den MB. Die Analysen im Echtzeitproliferationsassay bestätigten die Wirksamkeit der Palladium(II)- und Platin(II)-Azidokomplexe, allerdings in unterschiedlicher Stärke. Hierzu wurde die GBM-Zelllinie GaMG verwendet, da sich U87-Zellen aufgrund ihrer Präferenz als Sphäroide zu wachsen nicht gut für Adhärenz-Messungen im xCELLigence® eignen. Unter der Behandlung mit Palladium(II)- und Platin(II)-Komplexen mit einer langen Kohlenstoffkette (C8) ergab sich der größte Effekt auf die GBM-Zellen. Dieser war bei der kurzkettigen Palladium(II)-Verbindung schwächer. Insgesamt zeigte die langkettige Palladium(II)-Verbindung die stärkste Wirkung auf die GBM-Zellen und wäre somit ein geeigneter Kandidat zur Integration in die MB, da die Wirksamkeit als auch die Länge der Kohlenstoffkette dies begünstigt. Diese Daten korrelieren nicht mit den Ergebnissen aus Viabilitätsmessungen mittels MTT-Assay. Bereits veröffentlichte Daten belegten, dass mit kürzerer Kohlenstoffkette die Toxizität auf GBM-Zellen steigt (Schulz et al. 2022). Grund dafür sind zwei verschiedene Analysemethoden, während der MTT-Assay eine kolometrische Messung der Stoffwechselaktivität ist, wird beim Echtzeitproliferationsassay die Proliferationsrate gemessen. Weitere quadratisch planare Palladium(II)- und Platin(II)-Azidokomplexe wurden synthetisiert und auf ihre Toxizität gegenüber GBM-Zellen getestet (Peng et al. 2019). Die EC₅₀-Werten lagen zwischen 2 µM und 16 µM und waren somit hochwirksam. Ein effizienter Beladungsnachweis war bei den Palladium(II)- und Platin(II)-Komplexen nicht möglich. Letztendlich hatte Dox nicht nur aufgrund seiner hohen Toxizität (Tavener et al. 2021) und dem bereits erfolgreichen Einsatz bei anderen Tumorentitäten

(Thigpen et al. 2004; van Wijk et al. 2003), sondern vor allem durch seine Eigenfluoreszenz (Shah et al. 2017; Chen et al. 2012) eine hohe Eignung zur Integration in die MB. Im Vergleich zu den Palladium(II)- und Platin(II)-Komplexen war es somit möglich die Integration in die MB mittels Fluoreszenzmikroskopie nachzuweisen. Der hier durchgeführte Echtzeitproliferationsassay bestätigte die toxische Wirkung auf GBM-Zellen. Auffällig war, dass sich bei der Behandlung mit 10 μM Dox zunächst ein Anstieg in der Proliferation zeigte, bevor dieser dann stark abnahm. Hierbei sei zu erwähnen, dass der Proliferationsassay die Impedanz der adhären Zellen misst. Somit wird die Bedeckung der Goldelektroden als Proliferation gedeutet. Dox zeigte bereits bei einer Konzentration von 0,5 μM einen zytotoxischen Effekt auf GBM-Zellen. In der Literatur sind EC_{50} -Werte von 4,9 μM für GBM-Zellen zu finden (Tavener et al. 2021). Im Vergleich zu zum Beispiel Brustkrebs (EC_{50} = 0,006 μM (Farino et al. 2020)) liegt dieser Wert deutlich höher. Vergleicht man allerdings die EC_{50} -Werte von Dox zum TMZ bei U87 Zellen nach einer Inkubationszeit von 72 h, so ist hier ein Wert von 57 μM für TMZ zu finden (Khazaei et al. 2019). Dies liegt deutlich über dem hier ermittelten EC_{50} -Wert und bestärkt die zytotoxische Wirkung von Dox auf GBM-Zellen.

Dox konnte erfolgreich mit einer Beladungseffizienz von 52 % in die MB integriert werden, sodass die Endkonzentration in den MBDox bei 5 μM lag. Generell unterscheidet man zwischen dem *surface loading* und dem *entire volume loading* bei MB (Lin et al. 2021; Tinkov et al. 2009). Bei MB bestehend aus Phospholipiden ist das *surface loading* wahrscheinlicher, allerdings kann auch das *entire volume loading* nicht ausgeschlossen werden. Anhand der hohen Beladungseffizienz wäre auch *entire volume loading*, bei der das Dox im Hohlraum der MB eingeschlossen wird, denkbar (Tinkov et al. 2009). Die Beladungseffizienz der hier vorgestellten MBDox-Systems liegt mit 52 % weit über der durchschnittlichen Beladungseffizienz. In der Literatur findet sich eine Beladungseffizienz von Dox in MB von 17,02 % (Zhang et al. 2020a). Auch andere Wirkstoffe, wie Camptothecin konnten nur mit einer Effizienz von 26 % in MB integriert werden (Li und Guo 2019). Generell erreichen viele Chemotherapeutika nicht die nötige Beladungseffizienz und Konzentration in den MB als auch am Zielort (Wang et al. 2016). Eine Steigerung der Beladungseffizienz ließe sich durch die Zugabe von Albumin steigern (Wang et al. 2016), wobei es auch hier eine natürliche Beladungsgrenze gibt, welche für jedes Chemotherapeutikum individuell untersucht werden müsste. Da hier die Beladung und Aufreinigung der MBDox erfolgreich war, könnte man in anschließenden Versuchen andere auf GBM wirksame Chemotherapeutika, wie zum Beispiel

Palladium(II)- und Platin(II)-Komplexe, einsetzen. Die Stabilität der MBDox, sowie das spontane Zerplatzen und dadurch induzierte Freisetzen des Chemotherapeutikums aus den MB muss in zukünftigen chemischen Analysen noch eruiert werden.

Erste vielversprechende Ergebnisse der beladenen MBDox taten sich in 2D- als auch 3D-Versuchen auf. Ihre erste Austestung erfolgte in einem einfachen Experiment-Setup in der 2D-Zellkultur. Hierzu wurden zwei Zelllinien (U87 und U138) gewählt, die in Vorversuchen am vielversprechendsten auf Dox reagiert hatten (Jonathan Hiltensberger 2021). Die Wirkung von Dox auf die Zellen und die dabei induzierten DNA-Doppelstrangbrüche sollten mittels immunhistochemischer Immunfluoreszenzfärbung auf γ H2AX nachgewiesen werden. Zellen, deren DNA einen Doppelstrangbruch erleiden, phosphorylieren das Histonprotein H2AX am Serinrest 139 (Rogakou et al. 1998). Histone sind an der Regulierung des Zellzyklus beteiligt. Sie bestehen aus den vier Proteinfamilien H4, H3, H2A und H1B, wobei es von H2A wiederum Unterfamilien gibt, zu denen auch H2AX zählt (Rogakou et al. 1998). Die zytotoxische Wirkung von Dox wird in der Literatur meist durch eine Antikörperfärbung gegen γ H2AX nachgewiesen und gilt daher als ein zuverlässiger Nachweis (Plappert-Helbig et al. 2019). Alternativ wäre die Analyse mittels *TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling Assay* (TUNEL-Assay) denkbar. Bei diesem werden ebenfalls DNA-Strangbrüche in fixierten Zellen und Geweben nachgewiesen. Allerdings eignet sich der TUNEL-Assay vor allem zum Nachweis von frühen Phasen der Apoptose mit einer ausgeprägten DNA-Fragmentierung in niedrigmolekularen Doppelsträngen und zeigt daher eine eher geringe Selektivität auf (Majtnerová und Roušar 2018). Immunhistochemische Färbungen lassen sich auch auf diverse 3D-Modelle einfach übertragen.

Es konnte in den hier durchgeführten Vorversuchen nachgewiesen werden, dass LIFU als auch unbeladene MB keinen negativen Einfluss auf Zellen in 2D-Kulturen haben. MBDox hatte im Vergleich zu MB einen leichten negativen Einfluss auf die Zellen. Vermutlich ist dies auf ein Freisetzen von Dox aus den MBDox oder ein spontanes Zerplatzen von diesen zurückzuführen. Wie bereits während der Charakterisierung der MB gezeigt wurde, zerplatzen sie zu einem großen Anteil bei 37 °C nach bereits 24 h, sodass hier eine zytotoxische Wirkung nicht verwunderlich ist. Eine Modifizierung der MB zur Stärkung ihrer Stabilität wäre denkbar, wie es zum Beispiel Unga et al durch die Zugabe von DPSG erzielen konnte (Unga et al. 2019). Bei der Behandlung der 3D-Modelle wurde die Inkubationszeit deutlich verkürzt, um so dem spontanen Zerplatzen der MB entgegenzuwirken. Dennoch war eine signifikante Zunahme von apoptotischen Zellen unter MBDox und LIFU zu beobachten. Die MBDox zerplatzen unter

LIFU (Borden et al. 2005) und setzen Dox frei, was zu einer erheblichen zytotoxischen Wirkung und einem Anstieg an γ H2AX positiven Zellen führte. Bei U87 GBM-Zellen unterschied sich die Behandlung mit 10 μ M Dox und 10 μ M Dox mit LIFU. Hier wirkt vermutlich der Mikro-Jet Effekt. Unter LIFU kommt es zur Kollabierung der MBDox. Dabei wird Druck und Energie in Form von Wärme freigesetzt, welche zusammen mit den US-Stoßwellen dazu führen, dass das freigesetzte Dox Jet-artig in die Zellen geschossen wird (Dasgupta et al. 2016). Dies scheint zu einer verstärkten Wirkung von Dox gegenüber den Zellen zu führen. Vor allem wenn man betrachtet, dass durch die 52 %-ige Beladungseffizienz der MBDox es hierbei zu einer finalen Behandlung mit 5 μ M Dox kommt. In den 2D-Zellkulturversuchen zeigte sich bei den U87-GBM-Zellen ein stärkerer Effekt bei der Behandlung mit MBDox, weshalb diese Zelllinie für die 3D-Modelle ausgesucht wurde.

Im SISser-Modell haben die Zellen nun die Möglichkeit zum 3D-Wachstum. Dabei vollziehen Zellen in der Regel eine Veränderung in der Expression von ECM-Proteinen und auch ihr Migrationsverhalten ändert sich (Sood et al. 2019; Paolillo et al. 2021; Wang et al. 2014). Die mikroskopischen Aufnahmen von U87 GBM-Zellen zeigten, dass diese tief in die Serosa einwuchsen. Die Behandlung mit MBDox und LIFU hatte eine hohe Wirksamkeit auf die Zellen in der Serosa. Auch wenn hier die Inkubationszeit der Zellen mit MBDox bei nur 4 h lag, war eine zytotoxische Wirkung von Dox bemerkbar. Ein Freisetzen von Dox ist demnach auch bereits innerhalb von 4 h möglich. Die Differenz zwischen 10 μ M Dox und 10 μ M Dox mit LIFU bestärkt die Vermutung, dass LIFU einen positiven Effekt auf die Aufnahme von Dox durch die Zellen hat.

Die Vaskularisierung des GBMs wird im SISser Modell nicht reproduziert. Dabei spielt die BHS eine entscheidende Rolle für die Behandlung von GBM (Cha et al. 2020). MBDox sollen diese mittels LIFU überwinden können. Um hierfür ein geeignetes *in vitro* Modell zur Verfügung zu haben, wurde das experimentelle Setup in eine Perfusionskammer überführt. Die Idee hierbei ist, den Kanal zukünftig mit Endothelzellen auszukleiden und so die BHS nachstellen zu können. In diesem Vorgänger-Modell fehlt zwar die zelluläre BHS, allerdings kann die Stabilität der MBDox in einem Gefäß-ähnlichem Kanal untersucht werden. Es wirkten zusätzliche Scherkräfte durch die Injektion der MB in den Kanal und das Schwenken während der Inkubation. In der Auswertung mittels Lebend-Tod-Färbung wurde deutlich, dass die MBDox unter diesen Bedingungen keinen zytotoxischen Einfluss auf die GBM-Zellen hatten. Hierfür sind folgende Erklärungen möglich: Nach der Inkubationszeit der MBDox in der Perfusionskammer, wurde der Kanal gespült und mit frischem Zellkulturmedium gefüllt, sodass

nur wenige Rückstände von Dox in der Lösung waren. Allerdings zeigte sich in Vorversuchen, dass bereits nach 4 h Inkubation mit 10 μ M Dox eine Aufnahme in den GBM-Zellen nachweisbar war (Jonathan Hiltensberger 2021). Es wurde auch ersichtlich, dass die MBDox durch die Scherkräfte nicht zusätzlich strapaziert wurden und innerhalb von 4 h nicht in dem Ausmaß zerplatzen als dass dies einen negativen Effekt auf die GBM-Zellen hätte. Auffällig war, dass sich die Wirkung von MBDox mit LIFU deutlich von MBDox ohne LIFU unterschied. Der LIFU scheint im Hydrogel eine potenzierte Wirkung zu haben, wenn man die Differenz zum SISser-Modell vergleicht. Es gilt jedoch zu beachten, dass zwei verschiedene Methoden zur Auswertung verwendet wurden. Während im SISser-Modell die DNA-Bruchenden mittels immunhistochemischer Fluoreszenzfärbung gegen γ H2AX markiert wurden, wurde hier eine Lebend-Tod-Färbung durchgeführt. Die Lebend-Tod-Färbung arbeitet mit zwei Farbstoffen. Calcein-AM und Ethidium Homodimer-1. Calcein-AM wird in vitalen Zellen von Esterasen in die fluoreszente Form gespalten (Tawakoli et al. 2013). Ethidium-Homodimer-1 zeigt den Verlust der Integrität von der Plasmamembran auf. Die beiden Methoden analysieren somit die Vitalität der Zellen zu einem unterschiedlichen Zeitpunkt auf. Die Ergebnisse beider Modelle sind daher nicht direkt miteinander vergleichbar. Dennoch konnte mit beiden Analysemethoden die Wirksamkeit der MBDox und LIFU Applikation nachgewiesen werden.

Die hier genutzten 3D-Modelle, SISser und Perfusionskammer, nutzen eine Matrix für GBM-Zellen. Dabei ist die SISser ein eher starres Gerüst, wohingegen die Perfusionskammer mit dem darin enthaltenen Hydrogel ein eher dynamisches Modell ist. In beiden Modellen wurde nur ein Zelltyp (GBM-Zelllinien) kultiviert. Dies liegt fernab den *in vivo* Bedingungen eines GBM. Für ein besseres Microenvironment müssten die Modelle mit hirneigenen Mikroglia, T-Zellen, infiltrierenden Makrophagen als auch der ECM erweitert werden (Paolillo et al. 2021; Sood et al. 2019). Erst unter diesen Bedingungen ließe sich die Wirksamkeit der MBDox *in vitro* so evaluieren, dass *in vivo* Bedingungen simuliert würden.

7.2. Eignung von Tumorschnitten als *ex vivo* Modell

Da Hirnschnitt-Modelle noch nicht in der Laborroutine zum Drug-Screening eingesetzt werden, musste deren Eignung zur Austestung von MBDox mit LIFU zunächst einmal anhand einer etablierten und leicht handhabbaren Therapie überprüft werden. Hierfür wurden TTFields eingesetzt.

Die Lebend-Tod-Färbungen der OHSC zeigten eine hohe Vitalität während der Kultivierung. Auch die Integrität der histologischen Strukturen blieb erhalten. Dies zeichnet sie als ein sehr gutes 3D-Modell bezüglich ihrer Handhabung aus. Zusätzlich konnten Mikrotumoren aus GBM-Zelllinien, PZ als auch aus GBM-Organoiden generiert werden. Innerhalb weniger Tage war ein gutes Anwachsen belegbar. Das 3D-Modell konnte somit erfolgreich etabliert (Schulz et al. 2021) und mit Mikrotumoren aus PZ und Organoiden erweitert werden.

Die TTFIELDS-Applikation für 72 h führte zu einem Schrumpfen der Mikrotumoren. Hier konnte ein Ansprechen der GBM-Zelllinien und verschiedenen PZ auf die TTFIELDS-Therapie beobachtet werden. Allerdings zeigen GBM-Zelllinien als auch PZ aufgrund des Verlustes der Zell-Zell-Kontakte, langer Kultivierung, fehlender Tumormikroumgebung und hypoxischer Gradienten eine Veränderung in ihren Oberflächenantigenexpressionsmuster und unterliegen molekularen als auch auf Transkriptionsebene vorliegenden Veränderungen. Somit sind die Charakteristika des paternalen Tumors nicht mehr existent (Jacob et al. 2020). Auch die interpersonelle Heterogenität ist ein sehr wichtiger Punkt bei der Behandlung von GBM-Patienten (Qazi et al. 2017). Gerade hier fehlt es an geeigneten 3D-Modellen, insbesondere als Screening Tool für neue Therapieansätze. Erste Studien nutzen bereits aus Patientenmaterial generierte 2D-Zellkulturen und Organioide zum Drug-Screening. Hierbei zeigte sich, dass die 2D-Zellkultur sensitiver auf Chemotherapeutika anspricht (Lenin et al. 2021). Grund dafür ist das planare Wachstum der Zellen in der 2D-Zellkultur, wohingegen es sich bei Organoiden um 3-dimensionale Strukturen handelt, bei denen Zellen an der Oberfläche direkt dem Medium und der Behandlung ausgesetzt sind. Zellen, die sich jedoch im Kern der Organioide befinden nicht den direkten Kontakt zum Chemotherapeutikum haben, wodurch ein Konzentrationsgradient entsteht (Lenin et al. 2021; Jacob et al. 2020). Des Weiteren behalten Organioide das Expressionsmuster der Makrophagen/Mikroglia-Zellen und somit bestimmte Merkmale der Mikroumgebung des Patiententumors bei (Jacob et al. 2020). Eine intakte Tumormikroumgebung ist für die Untersuchung von neuen Therapieansätze von großer Bedeutung, da sie bei GBM sehr speziell ist und eine große Rolle bei der Tumorprogression spielt (Catalano et al. 2013). Sie ist auch für den Crosstalk mit dem umliegenden Gewebe wichtig (Paolillo et al. 2021). Humane Tumorschnitte könnten noch besser geeignet sein. Die Hirnschnitte werden direkt aus frisch reseziertem Tumormaterial gewonnen und ihre Histopathologie bleibt bis zu 16 Tage erhalten (Merz et al. 2013). Eine Behandlung mit Bestrahlung und TMZ-Behandlung, der Standardtherapie für GBM-Patienten, zeigte ein heterogenes Ansprechen, so wie es auch in der Klinik zu finden ist. Die humanen Tumorschnitte eignen sich daher als Testsystem für personalisierte Therapien und zur Aufklärung von

Tumorresistenzen (Merz et al. 2013). Der Vorteil wurde bereits in organotypischen hippocampalen Schnitten, bei denen die neuronale Subpopulationen der Zellen und grundlegende interneuronale Verbindungen erhalten blieben, ersichtlich (Eyüpoglu et al. 2003; Dehghani et al. 2003). Neben dem Erhalt der organotypischen Matrix zur Signalübermittlung bieten sich auch Vorteile bei der Handhabung im Labor: die Behandlung und Beobachtung der Schnitte ist über einen längeren Zeitraum möglich und der Überstand kann für weitere Untersuchungen abgenommen werden (Merz et al. 2013). Außerdem können aufeinanderfolgende Schnitte des selben Tumors bzw. des selben Patienten unterschiedlich und vergleichend behandelt werden.

In dieser Arbeit wurde ein Proof-of-Concept durchgeführt, bei dem humane GBM-Tumorschnitte als *ex vivo* Modell für neue Therapiemöglichkeiten eingesetzt werden sollten. Zunächst wurde die Auswirkung von TTFields, einer bereits etablierten Methode, angewendet. Da TTFields auf die Zellteilung während der Mitose einwirken und so die Proliferation hemmen (Giladi et al. 2015; Kirson et al. 2007), wurde hier zur Untersuchung eine Antikörperfärbung gegen den Proliferationsmarker Ki67 gewählt.

Die Untersuchungen von humanen Tumorschnitten von zwei GBM-Patienten zeigten ein diverses Ansprechen auf die TTFields-Behandlung. Während ein Tumor trotz TTFields-Applikation eine gesteigerte Proliferation aufzeigte, konnte dies beim zweiten Tumor nicht bestätigt werden. Hier war eine deutlich niedrigere Proliferationsrate der Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nachweisbar. Ki67 ist ein Proliferationsmarker, der Zellen, die sich im Zellzyklus befinden, identifiziert (Li et al. 2015). Somit werden Zellen, die sich in der G1-, S-, G2- oder M-Phase, jedoch nicht im späteren Verlauf, befinden sichtbar. Da TTFields einen Stillstand des Zellzyklus verursachen, werden nur Ki67-positive Zellen für einen gewissen Zeitraum detektiert.

Patienten, die sich einer Therapie mit TTFields unterziehen, müssen diese dauerhaft für mindestens 18 h am Tag beibehalten (Wenger et al. 2018). In dieser Untersuchung wurde die Proliferation bereits nach 72 h untersucht, sowie es auch für 2D-Zellkulturmodelle und OHSC angesetzt wurde. Es wäre daher denkbar, dass die TTFields-Behandlung erst nach längerer Applikation Effekte zeigt. Bei der Verabreichung von Chemotherapeutika sinkt der Effekt mit zunehmender Komplexität des Modelles (Lenin et al. 2021). Ähnliches wäre auch bei TTFields denkbar.

Humane Hirnschnitte sind ein *ex vivo* Modell, welches den *in vivo* Bedingungen sehr nahekommt. Da das TME in Organoiden gut erhalten ist (Jacob et al. 2020), liegt es nahe, dass dies ebenfalls in humanen Tumorschnitten gut konserviert ist. Somit ist die Immunantwort auch anders als in Mikrotumoren bestehend aus nur einem Zelltyp (Jacob et al. 2020). Obwohl TTFields unabhängig vom Immunsystem agieren und somit besonders gut für „kalte Tumoren“ so wie GBM geeignet sind (Wang et al. 2021), können sie doch einen Einfluss auf die T-Zell Proliferation haben (Simchony et al. 2019). Humane Tumorschnitte könnten daher auch gute zur Evaluierung der Rolle des Immunsystems herangezogen werden.

Der Proof-of-Concept Versuch hat auch seine Limitationen, nicht allein bei der Anzahl an untersuchten Patienten. Die Wirksamkeit der TTFields auf humane Tumorschnitte müsse daher in weiteren Wiederholungen mit anderen Patientenproben evaluiert werden. Auch hierbei spielt die Heterogenität des GBM und das damit verbundene variable Ansprechen auf Behandlungen eine entscheidende Rolle.

In den durchgeführten Versuchen konnte evaluiert werden, dass OHSC als auch humane Tumorschnitte sich zur Untersuchung von Kurz- und Langzeiteffekten eignen. Zukünftig kann auch die Wirksamkeit von MBDox und LIFU anhand dieser *ex vivo* Modelle untersucht werden.

7.3. Ausblick auf die MBDox-Therapie

Die vorliegende Arbeit konnte deutlich zeigen, dass eine Synthese von stabilen MBDox möglich ist. LIFU als auch die einzelnen Lipide hatten keine toxische Wirkung auf GBM-Zellen. Die Beladungseffizienz der MB mit Dox reichte aus, um eine zytotoxische Wirksamkeit in 2D- und 3D-GBM-Modellen in Kombination mit LIFU zu erzielen. Auch konnten mit Mikrotumoren auf OHSC und humanen Tumorschnitten zwei neue *ex vivo* Modelle etabliert werden, die sich zukünftig auch zur Testung von MBDox + LIFU einsetzen lassen. Die gewonnenen Erkenntnisse müssen als nächsten Schritt in ein Tierversuchsmodell übertragen werden. Dass dies möglich ist, wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben.

Letztendlich muss jeder neue Therapieansatz in der Klinik einen Benefit erbringen. Auch wenn das hier vorgestellte Therapiemodell noch weit entfernt von klinischen Studien ist, gibt es bereits einige Studien zu Drug Delivery Systemen, die dieses Vorhaben bekräftigen. In Phase 0 Studien wurde das Öffnen der BHS mittels US und MB bei GBM-Patienten bereits als lokal

begrenzt, sicher und kontrollierbar festgestellt (Anastasiadis et al. 2021). Auch bei Parkinson Patienten wird dieses Prinzip verwendet, hier bereits in Phase 1 Studien (Gasca-Salas et al. 2021). Studien, die zusätzlich Chemotherapeutika einsetzen sind nur vereinzelt veröffentlicht. Es konnte bislang in einer klinischen Studie gezeigt werden, dass das wiederholte temporäre Öffnen der BHS mit MB und LIFU in Kombination mit einer Carboplatinbehandlung für Patienten mit GBM gefahrlos ist und von den Patienten gut toleriert wird (Carpentier et al. 2016). Zum aktuellen Zeitpunkt gibt es keine klinische Studie, in der mit Chemotherapeutika beladene MB als Drug Delivery System in Kombination mit LIFU zur Behandlung von GBM eingesetzt werden. Dies schafft Raum für den Einsatz und die Entwicklung neuer Therapieansätze die MB mit LIFU als Drug-Delivery System kombinieren.

8. Anhang

8.1. Semiautomatisches Makro für immunhistochemische Färbung 2D-Zellkultur

8.1.1. DAPI

```
input = getDirectory("Input directory");
output = getDirectory("Output directory");
Dialog.create("File type");
Dialog.addString("File suffix: ", ".tif", 5);
Dialog.show();
suffix = Dialog.getString();
processFolder(input);
function processFolder(input) {
list = getFileList(input);
for (i = 0; i < list.length; i++) {
if(File.isDirectory(input + list[i]))
processFolder("" + input + list[i]);
if(endsWith(list[i], suffix))
processFile(input, output, list[i]);
}
}
function processFile(input, output, file) {
open(input + File.separator + file);
name=getTitle();
run("Conversions...", "scale");
run("8-bit"); run("Gaussian Blur...", "sigma=5");
setAutoThreshold("Default");
//run("Threshold..."); setThreshold(30, 255);
run("Convert to Mask");
run("Analyze Particles...", "size=0.05-2000 show=Outlines display results summarize");
run("Close All");
}
```

8.1.2. γ H2AX

```
input = getDirectory("Input directory");
output = getDirectory("Output directory");
Dialog.create("File type");
Dialog.addString("File suffix: ", ".tif", 5);
Dialog.show();
suffix = Dialog.getString();
processFolder(input);
function processFolder(input) {
list = getFileList(input);
for (i = 0; i < list.length; i++) {
if(File.isDirectory(input + list[i]))
processFolder("" + input + list[i]);
if(endsWith(list[i], suffix))
processFile(input, output, list[i]);
}
}
function processFile(input, output, file) {
```

```

open(input + File.separator + file);
name=getTitle();
run("Conversions...", "scale");
run("8-bit");
run("Gaussian Blur...", "sigma=5");
setAutoThreshold("Default");
//run("Threshold...");
setThreshold(70, 255);
run("Convert to Mask");
run("Analyze Particles...", "size=0.05-2000 show=Outlines display results summarize");
run("Close All");
}

```

8.2. Semiautomatisches Makro für immunhistochemische Färbung der SISser

8.2.1. DAPI

```

input = getDirectory("Input directory");
output = getDirectory("Output directory");
Dialog.create("File type");
Dialog.addString("File suffix: ", ".tif", 5);
Dialog.show();
suffix = Dialog.getString();
processFolder(input);
function processFolder(input) {
list = getFileList(input);
for (i = 0; i < list.length; i++) {
if(File.isDirectory(input + list[i]))
processFolder("'" + input + list[i]);
if(endsWith(list[i], suffix))
processFile(input, output, list[i]);
}
}
function processFile(input, output, file) {
open(input + File.separator + file);
name=getTitle();
run("Conversions...", "scale");
run("8-bit");
run("Gaussian Blur...", "sigma=5");
setAutoThreshold("Default");
//run("Threshold...");
setThreshold(40, 255);
run("Convert to Mask");
run("Analyze Particles...", "size=0-2000 show=Outlines display results summarize");
run("Close All");
}

```

8.2.2. γ H2AX

```

input = getDirectory("Input directory");
output = getDirectory("Output directory");
Dialog.create("File type");
Dialog.addString("File suffix: ", ".tif", 5);
Dialog.show();

```

```

suffix = Dialog.getString();
processFolder(input);
function processFolder(input) {
list = getFileList(input);
for (i = 0; i < list.length; i++) {
if(File.isDirectory(input + list[i]))
processFolder("" + input + list[i]);
if(endsWith(list[i], suffix))
processFile(input, output, list[i]);
}
}
function processFile(input, output, file) {
open(input + File.separator + file);
name=getTitle();
run("Conversions...", "scale");
run("8-bit");
run("Gaussian Blur...", "sigma=5");
setAutoThreshold("Default");
//run("Threshold...");
setThreshold(100, 255);
run("Convert to Mask");
run("Analyze Particles...", "size=0-2000 show=Outlines display results summarize");
run("Close All");
}

```

8.3. Semiautoamtisches Makro für Lebend-Tod-Färbung von GBM-Zellen in Perfusionskammer

```

input = getDirectory("Input directory");
output = getDirectory("Output directory");

```

```

Dialog.create("File type");
Dialog.addString("File suffix: ", ".tif", 5);
Dialog.show();
suffix = Dialog.getString();

```

```

processFolder(input);

```

```

function processFolder(input) {
list = getFileList(input);
for (i = 0; i < list.length; i++) {
if(File.isDirectory(input + list[i]))
processFolder("" + input + list[i]);
if(endsWith(list[i], suffix))
processFile(input, output, list[i]);
}
}

```

```

function processFile(input, output, file) {
open(input + File.separator + file);
name=getTitle();

```

```

run("Conversions...", "scale");
run("8-bit");
run("Gaussian Blur...", "sigma=5");
setAutoThreshold("Default");
//run("Threshold...");
setThreshold(20, 255);
run("Convert to Mask");
run("Analyze Particles...", "size=0-2000 summarize");

```

```

run("Close All");
}

```

8.4. Semiautomatisches Makro zur Auswertung der humanen Tumorschnitte nach TTFields Applikation

8.4.1. DAPI

```

input = getDirectory("Input directory");
output = getDirectory("Output directory");

```

```

Dialog.create("File type");
Dialog.addString("File suffix: ", ".tif", 5);
Dialog.show();
suffix = Dialog.getString();

```

```

processFolder(input);

```

```

function processFolder(input) {
list = getFileList(input);
for (i = 0; i < list.length; i++) {
if(File.isDirectory(input + list[i]))
processFolder("'" + input + list[i]);
if(endsWith(list[i], suffix))
processFile(input, output, list[i]);
}
}

```

```

function processFile(input, output, file) {
open(input + File.separator + file);
name=getTitle();

```

```

run("Conversions...", "scale");
run("8-bit");
run("Gaussian Blur...", "sigma=5");
setAutoThreshold("Default");
//run("Threshold...");
setThreshold(85, 255);
run("Convert to Mask");
run("Analyze Particles...", "size=0-2000 show=Outlines display results summarize");

```

```

run("Close All");
}

```

8.4.2. Ki67

```
input = getDirectory("Input directory");  
output = getDirectory("Output directory");
```

```
Dialog.create("File type");  
Dialog.addString("File suffix: ", ".tif", 5);  
Dialog.show();  
suffix = Dialog.getString();
```

```
processFolder(input);
```

```
function processFolder(input) {  
list = getFileList(input);  
for (i = 0; i < list.length; i++) {  
if(File.isDirectory(input + list[i]))  
processFolder("" + input + list[i]);  
if(endsWith(list[i], suffix))  
processFile(input, output, list[i]);  
}  
}
```

```
function processFile(input, output, file) {  
open(input + File.separator + file);  
name=getTitle();
```

```
run("Conversions...", "scale");  
run("8-bit");  
run("Gaussian Blur...", "sigma=5");  
setAutoThreshold("Default");  
//run("Threshold...");  
setThreshold(50, 255);  
run("Convert to Mask");  
run("Analyze Particles...", "size=0-2000 show=Outlines display results summarize");
```

```
run("Close All");  
}
```

8.5. Bestätigung der Veröffentlichungs- und Lizenzierungsrechte



49 Spadina Ave. Suite 200
Toronto ON M5V 2J1 Canada
www.biorender.com

Confirmation of Publication and Licensing Rights

April 15th, 2022
Science Suite Inc.

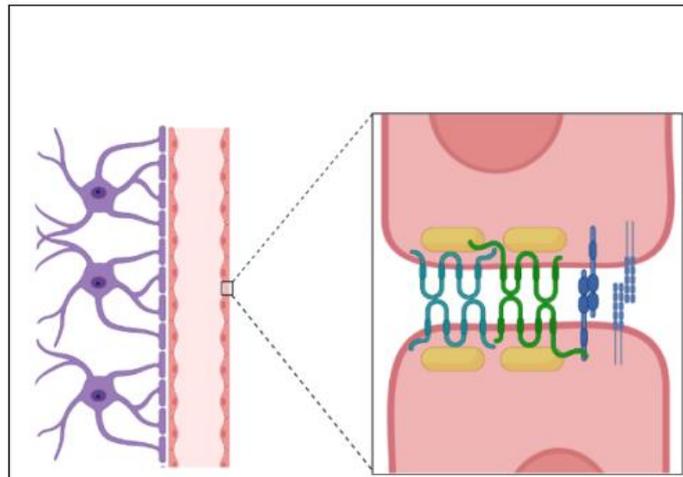
Subscription: Individual
Agreement number: HZ23STY3UX
Journal name: doctoral thesis

To whom this may concern,

This document is to confirm that Ellina Schulz has been granted a license to use the BioRender content, including icons, templates and other original artwork, appearing in the attached completed graphic pursuant to BioRender's [Academic License Terms](#). This license permits BioRender content to be sublicensed for use in journal publications.

All rights and ownership of BioRender content are reserved by BioRender. All completed graphics must be accompanied by the following citation: "Created with BioRender.com".

BioRender content included in the completed graphic is not licensed for any commercial uses beyond publication in a journal. For any commercial use of this figure, users may, if allowed, recreate it in BioRender under an Industry BioRender Plan.



For any questions regarding this document, or other questions about publishing with BioRender refer to our [BioRender Publication Guide](#), or contact BioRender Support at support@biorender.com.

Confirmation of Publication and Licensing Rights

April 15th, 2022
Science Suite Inc.

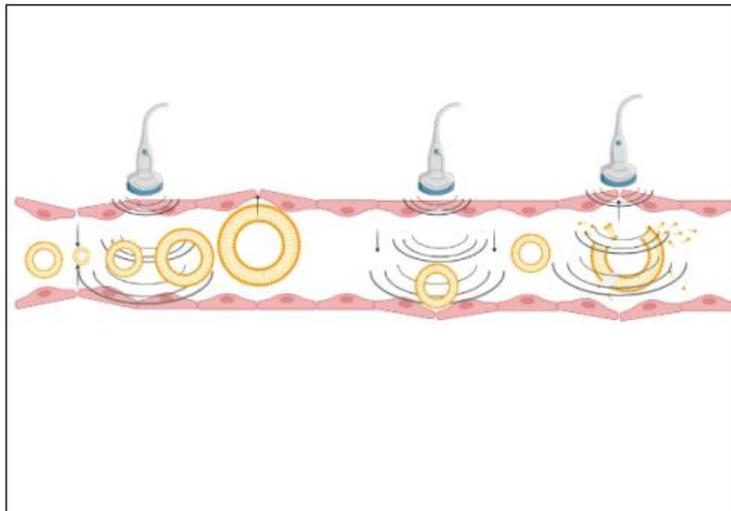
Subscription:	<i>Individual</i>
Agreement number:	<i>SQ23STV0R6</i>
Journal name:	<i>doctoral thesis</i>

To whom this may concern,

This document is to confirm that Ellina Schulz has been granted a license to use the BioRender content, including icons, templates and other original artwork, appearing in the attached completed graphic pursuant to BioRender's [Academic License Terms](#). This license permits BioRender content to be sublicensed for use in journal publications.

All rights and ownership of BioRender content are reserved by BioRender. All completed graphics must be accompanied by the following citation: "Created with BioRender.com".

BioRender content included in the completed graphic is not licensed for any commercial uses beyond publication in a journal. For any commercial use of this figure, users may, if allowed, recreate it in BioRender under an Industry BioRender Plan.



For any questions regarding this document, or other questions about publishing with BioRender refer to our [BioRender Publication Guide](#), or contact BioRender Support at support@biorender.com.

Confirmation of Publication and Licensing Rights

April 15th, 2022
Science Suite Inc.

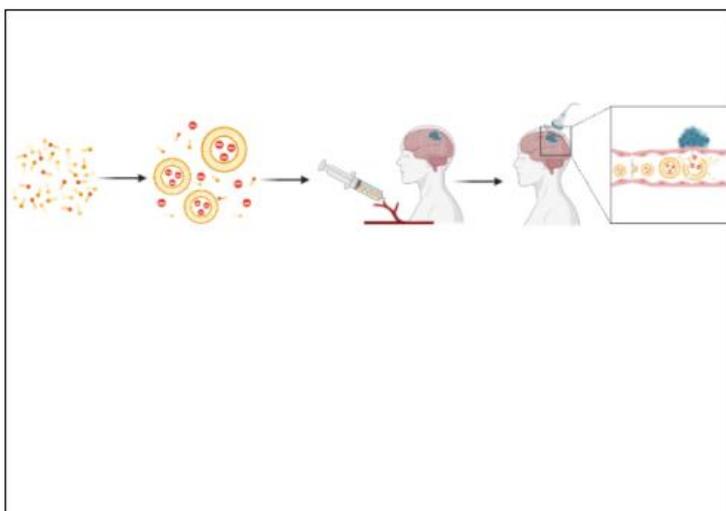
Subscription: Individual
Agreement number: QW23STVGCB
Journal name: doctoral thesis

To whom this may concern,

This document is to confirm that Ellina Schulz has been granted a license to use the BioRender content, including icons, templates and other original artwork, appearing in the attached completed graphic pursuant to BioRender's [Academic License Terms](#). This license permits BioRender content to be sublicensed for use in journal publications.

All rights and ownership of BioRender content are reserved by BioRender. All completed graphics must be accompanied by the following citation: "Created with BioRender.com".

BioRender content included in the completed graphic is not licensed for any commercial uses beyond publication in a journal. For any commercial use of this figure, users may, if allowed, recreate it in BioRender under an Industry BioRender Plan.



For any questions regarding this document, or other questions about publishing with BioRender refer to our [BioRender Publication Guide](#), or contact BioRender Support at support@biorender.com.

Confirmation of Publication and Licensing Rights

April 15th, 2022
Science Suite Inc.

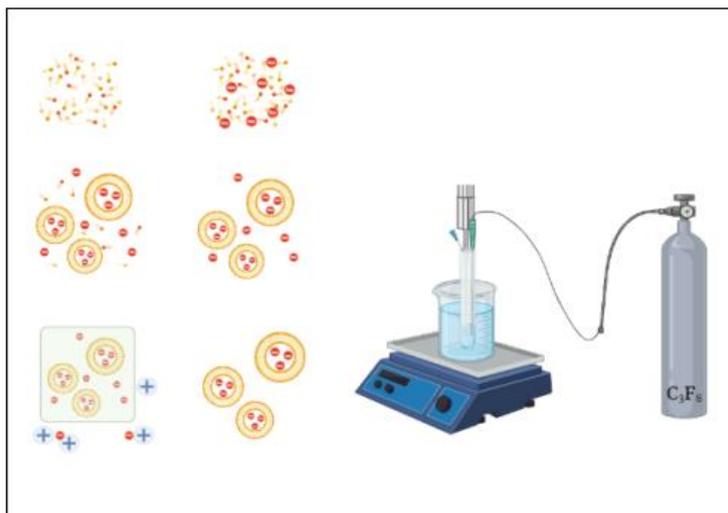
Subscription:	<i>Individual</i>
Agreement number:	<i>PU23STUK8U</i>
Journal name:	<i>doctoral thesis</i>

To whom this may concern,

This document is to confirm that Ellina Schulz has been granted a license to use the BioRender content, including icons, templates and other original artwork, appearing in the attached completed graphic pursuant to BioRender's [Academic License Terms](#). This license permits BioRender content to be sublicensed for use in journal publications.

All rights and ownership of BioRender content are reserved by BioRender. All completed graphics must be accompanied by the following citation: "Created with BioRender.com".

BioRender content included in the completed graphic is not licensed for any commercial uses beyond publication in a journal. For any commercial use of this figure, users may, if allowed, recreate it in BioRender under an Industry BioRender Plan.



For any questions regarding this document, or other questions about publishing with BioRender refer to our [BioRender Publication Guide](#), or contact BioRender Support at support@biorender.com.

Confirmation of Publication and Licensing Rights

April 15th, 2022
Science Suite Inc.

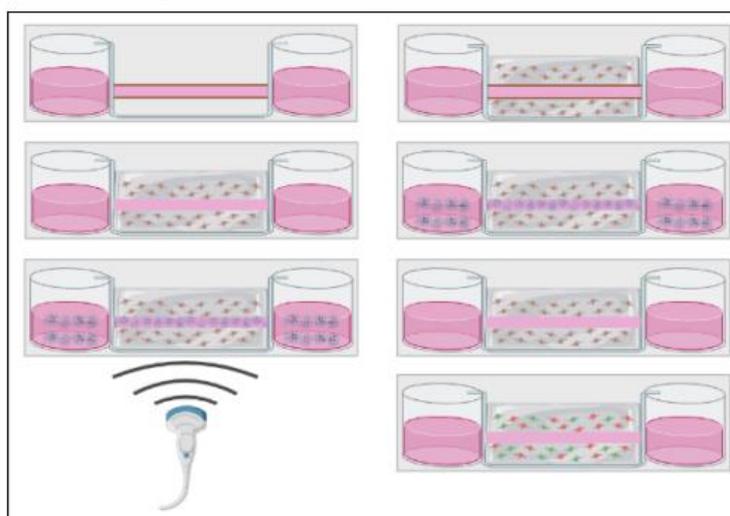
Subscription: Individual
Agreement number: NZ23STTZVX
Journal name: doctoral thesis

To whom this may concern,

This document is to confirm that Ellina Schulz has been granted a license to use the BioRender content, including icons, templates and other original artwork, appearing in the attached completed graphic pursuant to BioRender's [Academic License Terms](#). This license permits BioRender content to be sublicensed for use in journal publications.

All rights and ownership of BioRender content are reserved by BioRender. All completed graphics must be accompanied by the following citation: "Created with BioRender.com".

BioRender content included in the completed graphic is not licensed for any commercial uses beyond publication in a journal. For any commercial use of this figure, users may, if allowed, recreate it in BioRender under an Industry BioRender Plan.



For any questions regarding this document, or other questions about publishing with BioRender refer to our [BioRender Publication Guide](#), or contact BioRender Support at support@biorender.com.

Confirmation of Publication and Licensing Rights

April 15th, 2022
Science Suite Inc.

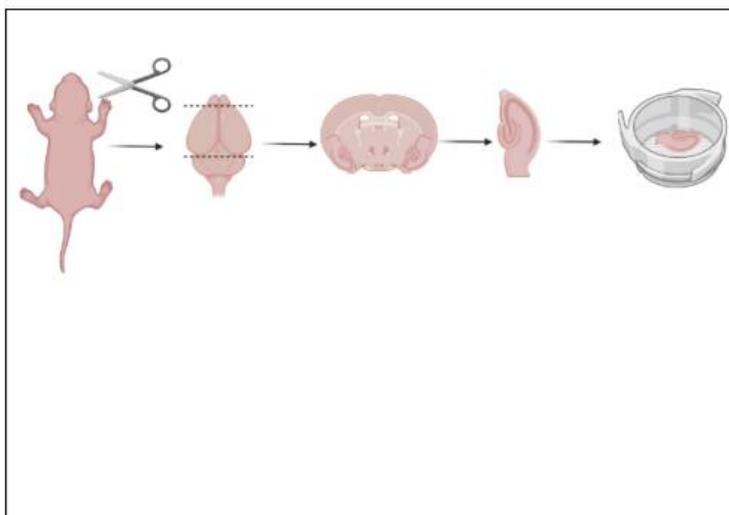
Subscription: Individual
Agreement number: KL23STVY8E
Journal name: doctoral thesis

To whom this may concern,

This document is to confirm that Ellina Schulz has been granted a license to use the BioRender content, including icons, templates and other original artwork, appearing in the attached completed graphic pursuant to BioRender's [Academic License Terms](#). This license permits BioRender content to be sublicensed for use in journal publications.

All rights and ownership of BioRender content are reserved by BioRender. All completed graphics must be accompanied by the following citation: "Created with BioRender.com".

BioRender content included in the completed graphic is not licensed for any commercial uses beyond publication in a journal. For any commercial use of this figure, users may, if allowed, recreate it in BioRender under an Industry BioRender Plan.



For any questions regarding this document, or other questions about publishing with BioRender refer to our [BioRender Publication Guide](#), or contact BioRender Support at support@biorender.com.

Confirmation of Publication and Licensing Rights

April 15th, 2022
Science Suite Inc.

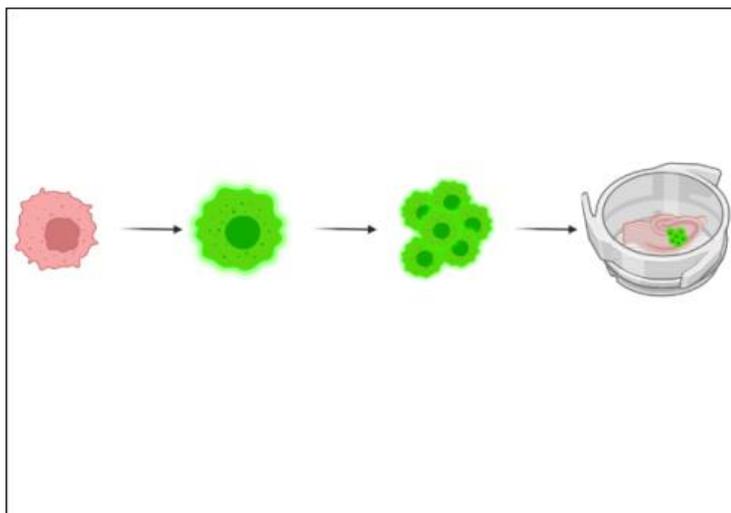
Subscription:	<i>Individual</i>
Agreement number:	<i>PU23STW6P8</i>
Journal name:	<i>doctoral thesis</i>

To whom this may concern,

This document is to confirm that Ellina Schulz has been granted a license to use the BioRender content, including icons, templates and other original artwork, appearing in the attached completed graphic pursuant to BioRender's [Academic License Terms](#). This license permits BioRender content to be sublicensed for use in journal publications.

All rights and ownership of BioRender content are reserved by BioRender. All completed graphics must be accompanied by the following citation: "Created with BioRender.com".

BioRender content included in the completed graphic is not licensed for any commercial uses beyond publication in a journal. For any commercial use of this figure, users may, if allowed, recreate it in BioRender under an Industry BioRender Plan.



For any questions regarding this document, or other questions about publishing with BioRender refer to our [BioRender Publication Guide](#), or contact BioRender Support at support@biorender.com.

9. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Aufbau der BHS. In der Vergrößerung sind die TJ-Proteine Occludin (blau), Claudin (grün) als auch JAM (dunkelblau) mit ZO-1 (gelb) und Cadherin (violett) zu sehen. BHS= Blut-Hirn-Schranke, JAM= junctional adhesion protein, TJ= Tight Junction, ZO-1= Zonula Occludens-1. Quelle: Created with Biorender 2022, eigene Darstellung 21
- Abbildung 2: Prinzipien zur Öffnung der BHS mittels MB und Ultraschall. A) Kompression der MB führt zur Einstülpung der Gefäßauskleidung. B) Expansion der MB drückt Auskleidung der Gefäße nach außen. C) Vaskuläre Permeabilität wird durch die Verschiebung von MB aufgrund von Druckgradienten und Strahlungskräfte erhöht. D) Kollabierung der MB führt zu Freisetzung von Wärme, hohem Druck und zur Öffnung der BHS durch Mikro-Jet Effekte. BHS= Blut-Hirnschranke, MB= Microbubbles. Quelle: Created with Biorender 2022, eigene Darstellung 24
- Abbildung 3: Prinzip und Ablauf der MB-Therapie. A) Phospholipide werden zur MB-Synthese genutzt. B) Bei der Synthese lagern sich die Lipide zu MB verschiedener Größen mit einem C_3F_8 -Kern an, dabei wird das frei liegende Dox (rot) in die MB integriert. C) Die MBDox-Lösung soll dem GBM-Patienten zukünftig intravenös injiziert werden. D) Mittels LIFU zerplatzen die im Blutkreislauf zirkulierenden MBDox im Tumor, öffnen die BHS und setzen Dox frei, sodass der Tumor lokal behandelt werden kann. GBM= Glioblastoma, LIFU= Low intensity focused ultrasound, MB= Microbubbles, MBDox= mit Dox beladene MB. Quelle: Created with Biorender 2022, eigene Darstellung 29
- Abbildung 4: Prinzip und Versuchsaufbau zur MB-Synthese. A) Lipide wurden in Chloroform gelöst, evaporiert und in der entstehenden Lipidfilm in Glycerol in Lösung genommen B) 10 μ M Dox wurden zur Lipidlösungen zu gegeben. C) Durch Begasung mit C_3F_8 und Sonikation bildeten sich aus den Lipiden MB und schlossen dabei Dox (rot) ein. D) In der MB-Lösung war noch frei zirkulierendes Dox enthalten. E) Durch Dialyse und Ionenaustausch-Chromatographie konnte das freie Dox aus der MB-Lösung entfernt und gebunden werden. F) Nach der Aufreinigung bestand die Lösung aus MBDox. G) Begasung der Lipidlösung mit C_3F_8 erfolgte bei 55 °C unter Rühren in einem Becherglas. Dabei wurde das Reaktionsgefäß luftdicht verschlossen. Eine Kanüle diente zum Luftausstrom. Der Sonikator wurde in die Lipidlösung getaucht. Dox= Doxorubicin, MB= Microbubbles, MBDox= mit Doxorubicin beladene Microbubbles. Quelle: Created with Biorender 2022, eigene Darstellung 43
- Abbildung 5: Vorbereitung und Behandlung der Perfusionskammer. A) Perfusionskammer mit zwei Reservoirs und Kanal aus PycloPrOx-Faser. B) Hydrogel aus GelMa und LAP mit GBM-

Zellen wird in die Perfusionskammer gefüllt. C) Die PycloPrOx-Faser wird herausgelöst, sodass ein perfundierbarer Kanal zurückbleibt D) MBDox-Lösung wird in den Kanal gefüllt. E) Durch LIFU-Applikation zerplatzen MBDox und setzen Dox frei. F) Nach 4 h Inkubationszeit wird die MBDox-Lösung durch frisches Medium ersetzt. G) Die Auswertung erfolgt nach 48 h mittels Lebend-Tod-Färbung. Dox= Doxorubicin, GBM= Glioblastoma, GelMa= Gelatin-methacryl, LAP= Lithium-Phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinat, LIFU= Low intensity focused ultrasound, MBDox= mit Doxorubicin beladene Microbubbles. Quelle: Created with Biorender 2022, eigene Darstellung 48

Abbildung 6: Präparation von Mäusen zur OHSC Herstellung. A) Junge Mäuse wurden dekapitiert und das Gehirn herauspräpariert. B) Das Hirn wurde anterior und posterior zugeschnitten. C) Es wurden 350 µm dicke Hirnschnitte hergestellt. D) Der Hippocampus wurde herauspräpariert. E) Die Kultivierung der OHSC erfolgte auf Zellkultureinsätzen mit semipermeabler Membran. OHSC= Organotypic hippocampal brain slice culture. Quelle: Created with Biorender 2022, eigene Darstellung 50

Abbildung 7: Herstellung der humanen Tumorschnitte. A) Histoacrylkleber wurde auf die röhrenförmige Halterung appliziert. B) Der zurechtgeschnittene Tumor wurde senkrecht festgeklebt und C) in Agarose eingegossen. D) Die Agarose härtete mit Hilfe eines vorgekühlten Kühlblocks schneller aus. D) Die Hirnschnitte wurden nach dem Slicen in der Präparationswanne, die mit Präparationsmedium gefüllt war, aufgefangen. D) Die fertigen Schnitte mussten vor der Kultivierung in Zellkultureinsätzen von der Agarose befreit werden. 51

Abbildung 8: Prinzip der Mikrotumoren auf OHSC. A) Zur Herstellung der Mikrotumoren wurden GBM oder PZ verwendet. B) Die Zellen wurden mit GFP transfiziert. C) Nach einigen Tagen bildeten sich Sphäroide aus PZ. D) Die GBM-Zellen bzw. Sphäroide der PZ wurden auf die OHSC gesetzt, wo sie als Mikrotumoren anwuchsen. GBM= Glioblastoma, GFP= green fluorescent protein, OHSC= Organotypic hippocampal brain slice culture, PZ= Primärzellen. Quelle: Created with Biorender 2022, eigene Darstellung 52

Abbildung 9: Experimentelles Setup der LIFU-Applikation. A) Der Agaroseblock wurde auf den Ultraschallkopf gesetzt. B) Zur Stabilisierung diente eine Kunststoffhalterung. C) Die Probe wurde in die Mulde des Agaroseblocks gelegt und D) mit Zellkulturmedium oder MB- bzw. MBDox-Lösung befüllt. LIFU= Low intensity focused ultrasound, MB= Microbubble, MBDox= mit Doxorubicin beladene MB..... 55

Abbildung 10: Probenvorbereitung für die TTFIELDS-Behandlung. A) Halterung für Einsätze. B) Das Insert wurde in den Halter eingesetzt. C) Glasdeckglas zum Schutz vor entstehender

Kondensation. D) Insert und Halter wurden in die TTFields-Keramikschaie gestellt. E) Die Keramikschaie wurde mit 2,5 ml Medium gefüllt. F) Die Hirnschnitte wurden mit einer breiten Glaspipette überführt und das überschüssige Medium wird abgesaugt. G) Die Hirnschnitte sollten zentriert auf dem Einsatz liegen. H) Glasdeckglas, Parafilm und Deckel verschlossen die Keramikschaie. I) Die Keramikschaie wurde in die Applikationsplatte gedreht und an den Generator angeschlossen. TTFields= Tumor Treating Fields 57

Abbildung 11: Stabilität und Charakterisierung der MB und deren Einfluss auf die Viabilität von GBM-Zellen. A) Einfluss der Lipide und 10 µM Dox auf GBM-Zelllinien GaMG, U251 und U87 nach 48 h Inkubation. Die Vitalität wurde mittels MTT-Assay ermittelt. Dabei wurde die Absorption bei 540 nm Wellenlänge nach 48 h Behandlung gemessen. n= 3. B) Repräsentative mikroskopische Aufnahme der MB bei einer Lagerung bei 4 °C zu den Zeitpunkten 0 h und 4 h nach Synthese. 40 x Objektiv, Skalierungsbalken 5 µm. C) Größenverteilung der MB in µm direkt nach Synthese. n= 3. D) Quantifizierung der MB-Anzahl pro ml bei 37 °C, Raumtemperatur und 4 °C n= 3. *= p≤0,005, **= p≤0,01, Dox= Doxorubicin, MB= Microbubbles, RT= Raumtemperatur 66

Abbildung 12: Einfluss von fokussiertem Ultraschall mit niedriger Intensität auf GBM-Zellen und MB. A) Absolute Zellzahl der GBM-Zelllinien GaMG, U87 und U138 nach 24 h, 48 h und 72 h nach Ultraschallapplikation., n= 3. B) Exemplarische mikroskopische Aufnahme von MB vor (links) und nach (rechts) Ultraschallapplikation. n= 3, Skalierungsbalken= 25 µm, Pulsfrequenz= 99 Hz, Pulsdauer= 1000 µs, Amplitude= 30 µm, Ultraschallfrequenz= 500 kHz, Dauer= 5 Minuten 67

Abbildung 13: Echtzeitproliferationsassay von GaMG GBM-Zellen unter der Behandlung von Palladium(II)- und Platin(II)-Komplexen für 72 h im xCELLigence RTCA System. A) Zellindex von GaMG-Zellen unter Behandlung mit 1 µM (grün) und 10 µM (blau) Palladium(II)-Komplex mit C8-Kette im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (schwarz). n= 3. B) Zellindex von GaMG-Zellen unter Behandlung mit 1 µM (grün) und 10 µM (blau) Platin(II)-Komplex mit C8-Kette im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (schwarz). n= 3. C) Zellindex von GaMG-Zellen unter Behandlung mit 1 µM (grün) und 10 µM (blau) Palladium(II)-Komplex mit C1-Kette im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (schwarz). n= 3. GBM= Glioblastoma 69

Abbildung 14: Echtzeitproliferationsassay von GaMG GBM-Zellen unter der Behandlung mit 10 µM (blau), 1 µM (grün), 0,5 µM (hellblau) und 100 nM (dunkelgrün) Doxorubicin für 96 h im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (schwarz), n= 3. GMB= Glioblastoma 70

Abbildung 15: Beladungseffizienz von Dox in MB. Exemplarische fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von MBDox A) nach der Synthese und B) nach Aufreinigung mittels Dialyse und Ionen-Austausch-Chromatographie, sowie Verlaufsdiagramm der HPLC-Messung. Dox= Doxorubicin, HPLC= Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, MB= Microbubbles, MBDox= mit Doxorubicin beladene Microbubbles..... 72

Abbildung 16: Behandlung von U138 GBM-Zellen mit beladenen und unbeladenen MB mit und ohne Ultraschallapplikation im 2D-Zellkulturmodell. A) Exemplarische immunhistochemische Fluoreszenzfärbung von U138 GBM-Zellen nach 48 h Behandlung. Blau= DAPI, grün= GFAP, rot= γ H2AX, 40x Objektiv, Skalierungsbalken= 25 μ m, n= 3. B) Quantifizierung der γ H2AX positiven Zellkerne nach 48 h Behandlung und Vergleich der verschiedenen Behandlungen. $p^* \leq 0,05$, n= 3. Dox= Doxorubicin, GBM= Glioblastoma, LIFU= Low intensity focused ultrasound, MB= Microbubbles, MBDox= mit Doxorubicin beladene Microbubbles 74

Abbildung 17: Behandlung von U87 GBM-Zellen mit beladenen und unbeladenen MB mit und ohne Ultraschallapplikation im 2D-Zellkulturmodell. A) Exemplarische immunhistochemische Fluoreszenzfärbung von U87 GBM-Zellen nach 48 h Behandlung. Blau= DAPI, grün= GFAP, rot= γ H2AX, 40xObjektiv, Skalierungsbalken= 100 μ m, n= 2. B) Quantifizierung der γ H2AX positiven Zellkerne nach 48 h Behandlung und Vergleich der verschiedenen Behandlungen. $p^* \leq 0,05$, n= 3. Dox= Doxorubicin, GBM= Glioblastoma, LIFU= Low intensity focused ultrasound, MB= Microbubbles, MBDox= mit Doxorubicin beladene Microbubbles 76

Abbildung 18: Behandlung von U87 GBM-Zellen im 3D-SISsermodell mit beladenen und unbeladenen MB mit und ohne Ultraschallapplikation. A) Exemplarische immunhistochemische Fluoreszenzfärbung von U87 GBM-Zellen nach 48 h Behandlung. Blau= DAPI, rot= γ H2AX, 40x Objektiv, Skalierungsbalken=25 μ m, n= 3. B) Quantifizierung der γ H2AX positiven Zellkerne nach 48 h Behandlung und Vergleich der verschiedenen Behandlungen. $* \leq 0,05$, n= 3, Dox= Doxorubicin, GBM= Glioblastoma, LIFU= Low intensity focused ultrasound, MB= Microbubbles, MBDox= mit Doxorubicin beladene Microbubbles 78

Abbildung 19: Wirkung von MBs auf GBM-Zellen im 3D-Bioreaktor. A) Exemplarische fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer Lebend-Tod-Färbung von U87 GBM-Zellen im Bioreaktor nach Behandlung mit MBDox+LIFU im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. grün= lebende Zellen, rot= tote Zellen 40x Objektiv, Skalierungsbalken= 50 μ m, n= 3. B) Quantifizierung toter Zellen nach 48 h Behandlung mit MBDox, MBDox+LIFU und 10 μ M Dox im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle., $* = p \leq 0,005$, $** = p \leq 0,01$, n=3 Dox=

Doxorubicin, GBM= Glioblastoma, LIFU= Low intensity focused ultrasound, MB= Microbubbles, MB_{Dox}= mit Doxorubicin beladene Microbubbles 79

Abbildung 20: Kultivierung von hippocampalen Brain Slice Kulturen aus der Maus. A) Lichtmikroskopische Aufnahme eines frisch präparierten OHSC. Granule Cell Layer (GCL), Cornu ammonis subfield (CA1 und CA3), hilus region (HI) und molecular layer (ML) (Schulz et al. 2021). 5x Objektiv, Skalierungsbalken= 500 µm. B) Immunhistochemische Fluoreszenzfärbung eines Paraffnischchnittes von OHSC frisch nach Präparation. DAPI= blau, GFAP=grün, 10x Objektiv, Skalierungsbalken= 250 µm. C) Lebend-Tod-Färbung von OHSC frisch nach der Präparation. 10x Objektiv, Skalierungsbalken= 250 µm. und D) nach 7 Tagen in Kultur. grün= lebende Zellen, rot= tote Zellen, 5x Objektiv, Skalierungsbalken= 500 µm. OHSC= Organotypic hippocampal brain slice cultures 80

Abbildung 21: Mikroskopische Aufnahmen des Wachstumsverlaufs von Mikrotumoren auf OHSC. A) Mikrotumoren aus GFP-transfizierten U87 GBM-Zellen auf OHSC nach Tag 0, 2, 4 und 6 nach Ausplattieren. 5x Objektiv, Skalierungsbalken= 500 µm. B) Mikrotumoren aus GFP-transfizierten PZ auf OHSC. 5x Objektiv, Skalierungsbalken= 250 µm. C) fluoreszenzmarkierte GBM-Organoiden auf OHSC. 10x Objektiv, Skalierungsbalken= 250 µm. Grün= fluoreszenzmarkierte Mikrotumoren. GBM= Glioblastoma, OHSC= organotypic brain slice cultures, PZ= Primärzellen..... 81

Abbildung 22: Einfluss von TTFields auf PZ und Mikrotumoren aus PZ und U87 GBM-Zellen
A) Statistische Auswertung der Zellzahl von PZ in 2D-Zellkultur als Monolayer unter der Behandlung von TTFields für 72 h im Vergleich zum Zeitpunkt 0 h vor der Behandlung. n= 3-18
B) Statistische Auswertung der Tumorgröße der Mikrotumoren aus U87 GBM-Zellen und PZ vor und nach TTFields-Applikation im Vergleich zur Kontrolle. PZ 1 n= 7, PZ 2 n= 7, PZ 3 n= 13, U87 n= 24.
C) Mikroskopische Aufnahmen von OHSC mit Mikrotumoren aus GFP-transfizierten U87 GBM-Zellen und PZ unter TTFields-Behandlung als auch die unbehandelte Kontrolle zum Zeitpunkt 0 h und nach 72 h Behandlung. Objektiv= 5x Skalierungsbalken= 250 µm. ****= $p \leq 0,0001$. GBM= Glioblastoma, GFP= Green fluorescent protein, OHSC= organotypic brain slice cultures, PZ= Primärzellen, TTFields= Tumor Treating Fields 83

Abbildung 23: Mikrotumoren aus Organoiden vor und nach 72 h TTFields-Applikation mit 200 kHz
A) Mikroskopische Aufnahmen von OHSC mit Mikrotumoren aus fluoreszenzmarkierten GBM-Organoiden unter TTFields-Behandlung als auch die unbehandelte Kontrolle zum Zeitpunkt 0 h und nach 72 h Behandlung. Objektiv= 5x Skalierungsbalken= 250 µm.
B) Statistische Auswertung der Tumorgröße vor und nach TTFields-Applikation im Vergleich zur

Kontrolle. n= 24, ****= $p \leq 0,000$. GBM= Glioblastoma, OHSC= Organotypic brain slice cultures, TTFIELDS= Tumor Treating Fields	84
Abbildung 24: Humane Brain Slices unter TTFIELDS-Behandlung bei 200 kHz. A) Exemplarische fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Antikörperfärbung gegen GFAP und Ki67 von humanen GBM-Tumorschnitten direkt nach der Präparation (0 h), nach 72 h Kultivierung als auch nach 72 h TTFIELDS-Applikation. Blau= DAPI, rot= Ki67, grün= GFAP, 40x Objektiv, Skalierungsbalken= 100 μm B) Quantifizierung Ki67-positiver Zellen in humanen GBM-Tumorschnitten nach 72 h Behandlung mit 200 kHz TTFIELDS als auch unbehandelter Kontrollen nach 0 h und 72 h. n= 3, *= $p \leq 0,005$, **= $p \leq 0,01$. GBM= Glioblastoma, TTFIELDS= Tumor Treating Fields	86

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis	6
Tabelle 2: Verwendete Geräte	30
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Medien	32
Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien	35
Tabelle 5: Verwendete Antikörper	37
Tabelle 6: Verwendete Zelllinien. DSMZ= German Collection of Authenticated Cell Cultures, ECACC= European Collection of Authenticated Cell Cultures, CLS= Cell Line Services GmbH	37
Tabelle 7: Verwendete KITS	38
Tabelle 8: Verwendete Software	38
Tabelle 9: Verwendete Lösungen und Medien	38
Tabelle 10: Klinische Charakteristika der GBM-Proben und die eingesetzten 3D-Zellkulturmodelle. ATRX= α thalassemia/mental retardation syndrome X-linked, GBM= Glioblastoma, ID= Identifikator, IDH= Isocitrat-Dehydrogenase, KPS= Karnofsky-Index, PZ= Primärzellen	54
Tabelle 11: Programm des Gewebereinbettungsautomaten mit Abschleuderfunktion zur Entwässerung der Serosa.....	62
Tabelle 12: Antikörperverdünnungen für die immunhistochemischen Fluoreszenzfärbung von 3D-Zellkulturmodellen.....	63
Tabelle 13: Daten der HPLC-Messung von unbeladenen MB, als auch mit MBDOX vor und nach der Aufreinigung mittels Dialyse und Ionen-Austausch-Chromatographie. Dox= Doxorubicin, MB= Microbubbles, MBDOX= mit Doxorubicin beladene Microbubbles.....	71

11. Literaturverzeichnis

- Abbott, N. J., Rönnbäck, L., & Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature reviews. Neuroscience*, 7(1), 41–53. <https://doi.org/10.1038/nrn1824>
- Abraham, S. A., Waterhouse, D. N., Mayer, L. D., Cullis, P. R., Madden, T. D., & Bally, M. B. (2005). The liposomal formulation of doxorubicin. *Methods in enzymology*, 391, 71–97. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)91004-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)91004-5)
- Aikawa, T., Okura, H., Kondo, T., & Yuasa, M. (2017). Comparison of Carboxybetaine with Sulfobetaine as Lipid Headgroup Involved in Intermolecular Interaction between Lipids in the Membrane. *ACS omega*, 2(9), 5803–5812. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b00574>
- Akay, M., Hite, J., Avci, N. G., Fan, Y., Akay, Y., Lu, G., & Zhu, J. J. (2018). Drug Screening of Human GBM Spheroids in Brain Cancer Chip. *Scientific reports*, 8(1), 15423. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33641-2>
- Al-Malky, H. S., Al Harthi, S. E., & Osman, A. M. (2020). Major obstacles to doxorubicin therapy: Cardiotoxicity and drug resistance. *Journal of oncology pharmacy practice : official publication of the International Society of Oncology Pharmacy Practitioners*, 26(2), 434–444. <https://doi.org/10.1177/1078155219877931>
- Amoabediny, G., Haghirsadat, F., Naderinezhad, S., Helder, M. N., Akhoundi Kharanaghi, E., Mohammadnejad Arough, J., & Zandieh-Doulabi, B. (2018). Overview of preparation methods of polymeric and lipid-based (niosome, solid lipid, liposome) nanoparticles: A comprehensive review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 67(6), 383-400.
- Anastasiadis, P., Gandhi, D., Guo, Y., Ahmed, A. K., Bentzen, S. M., Arvanitis, C., & Woodworth, G. F. (2021). Localized blood-brain barrier opening in infiltrating gliomas with MRI-guided acoustic emissions-controlled focused ultrasound. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(37), e2103280118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2103280118>
- Anderson, J. M., & Van Itallie, C. M. (2009). Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(2), a002584. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002584>.

- Angelow, S., Ahlstrom, R., & Yu, A. S. (2008). Biology of claudins. *American journal of physiology. Renal physiology*, 295(4), F867–F876. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.90264.2008>
- Angius, F., & Floris, A. (2015). Liposomes and MTT cell viability assay: an incompatible affair. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 29(2), 314–319. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.11.009>
- Apfel, R. E. (1997). Sonic effervescence: A tutorial on acoustic cavitation. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 101(3), 1227-1237.
- Arcamone, F., Cassinelli, G., Fantini, G., Grein, A., Orezzi, P., Pol, C., & Spalla, C. (1969). Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnology and bioengineering*, 11(6), 1101–1110. <https://doi.org/10.1002/bit.260110607>
- Ashley, N., & Poulton, J. (2009). Mitochondrial DNA is a direct target of anti-cancer anthracycline drugs. *Biochemical and biophysical research communications*, 378(3), 450–455. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.11.059>
- Aum, D. J., Kim, D. H., Beaumont, T. L., Leuthardt, E. C., Dunn, G. P., & Kim, A. H. (2014). Molecular and cellular heterogeneity: the hallmark of glioblastoma. *Neurosurgical focus*, 37(6), E11. <https://doi.org/10.3171/2014.9.FOCUS14521>
- Bader, K. B., & Holland, C. K. (2013). Gauging the likelihood of stable cavitation from ultrasound contrast agents. *Physics in medicine and biology*, 58(1), 127–144. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/58/1/127>
- Bagley, S. J., Desai, A. S., Linette, G. P., June, C. H., & O'Rourke, D. M. (2018). CAR T-cell therapy for glioblastoma: recent clinical advances and future challenges. *Neuro-oncology*, 20(11), 1429–1438. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noy032>.
- Barbierato, M., Argentini, C., & Skaper, S. D. (2012). Indirect immunofluorescence staining of cultured neural cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 846, 235–246. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-536-7_21.
- Bastiancich, C., Danhier, P., Pr eat, V., & Danhier, F. (2016). Anticancer drug-loaded hydrogels as drug delivery systems for the local treatment of glioblastoma. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 243, 29–42. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.09.034>.

- Beccaria, K., Canney, M., Goldwirt, L., Fernandez, C., Piquet, J., Perier, M. C., Lafon, C., Chapelon, J. Y., & Carpentier, A. (2016). Ultrasound-induced opening of the blood-brain barrier to enhance temozolomide and irinotecan delivery: an experimental study in rabbits. *Journal of neurosurgery*, *124*(6), 1602–1610. <https://doi.org/10.3171/2015.4.JNS142893>
- Belanich, M., Randall, T., Pastor, M. A., Kibitel, J. T., Alas, L. G., Dolan, M. E., Schold, S. C., Jr, Gander, M., Lejeune, F. J., Li, B. F., White, A. B., Wasserman, P., Citron, M. L., & Yarosh, D. B. (1996). Intracellular Localization and intercellular heterogeneity of the human DNA repair protein O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, *37*(6), 547–555. <https://doi.org/10.1007/s002800050427>
- Bodley, A., Liu, L. F., Israel, M., Seshadri, R., Koseki, Y., Giuliani, F. C., Kirschenbaum, S., Silber, R., & Potmesil, M. (1989). DNA topoisomerase II-mediated interaction of doxorubicin and daunorubicin congeners with DNA. *Cancer research*, *49*(21), 5969–5978.
- Borden, M. A., Kruse, D. E., Caskey, C. F., Zhao, S., Dayton, P. A., & Ferrara, K. W. (2005). Influence of lipid shell physicochemical properties on ultrasound-induced microbubble destruction. *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*, *52*(11), 1992–2002. <https://doi.org/10.1109/tuffc.2005.1561668>
- Bouquet, F., Muller, C., & Salles, B. (2006). The loss of gammaH2AX signal is a marker of DNA double strand breaks repair only at low levels of DNA damage. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, *5*(10), 1116–1122. <https://doi.org/10.4161/cc.5.10.2799>
- Branca, J., Maresca, M., Morucci, G., Mello, T., Becatti, M., Pazzagli, L., Colzi, I., Gonnelli, C., Carrino, D., Paternostro, F., Nicoletti, C., Ghelardini, C., Gulisano, M., Di Cesare Mannelli, L., & Pacini, A. (2019). Effects of Cadmium on ZO-1 Tight Junction Integrity of the Blood Brain Barrier. *International journal of molecular sciences*, *20*(23), 6010. <https://doi.org/10.3390/ijms20236010>
- Bregy, A., Shah, A. H., Diaz, M. V., Pierce, H. E., Ames, P. L., Diaz, D., & Komotar, R. J. (2013). The role of Gliadel wafers in the treatment of high-grade gliomas. *Expert review of anticancer therapy*, *13*(12), 1453–1461. <https://doi.org/10.1586/14737140.2013.840090>
- Breun, M., Martellotta, D. D., Leberle, A., Nietzer, S., Baur, F., Ernestus, R. I., Matthies, C., Löhr, M., & Hagemann, C. (2020). 3D in vitro test system for vestibular schwannoma. *Journal of neuroscience methods*, *336*, 108633. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2020.108633>

- Buchwalow, I., Samoilova, V., Boecker, W., & Tiemann, M. (2011). Non-specific binding of antibodies in immunohistochemistry: fallacies and facts. *Scientific reports*, *1*, 28. <https://doi.org/10.1038/srep00028>
- Buckner J. C. (2003). Factors influencing survival in high-grade gliomas. *Seminars in oncology*, *30*(6 Suppl 19), 10–14. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2003.11.031>
- Burks, S. R., Kersch, C. N., Witko, J. A., Pagel, M. A., Sundby, M., Muldoon, L. L., Neuwelt, E. A., & Frank, J. A. (2021). Blood-brain barrier opening by intracarotid artery hyperosmolar mannitol induces sterile inflammatory and innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *118*(18), e2021915118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2021915118>
- Carpentier, A., Canney, M., Vignot, A., Reina, V., Beccaria, K., Horodyckid, C., Karachi, C., Leclercq, D., Lafon, C., Chapelon, J. Y., Capelle, L., Cornu, P., Sanson, M., Hoang-Xuan, K., Delattre, J. Y., & Idbah, A. (2016). Clinical trial of blood-brain barrier disruption by pulsed ultrasound. *Science translational medicine*, *8*(343), 343re2. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf6086>
- Carvalho, B. F., Fernandes, A. C., Almeida, D. S., Sampaio, L. V., Costa, A., Caeiro, C., Osório, L., Castro, L., Linhares, P., Damasceno, M., & Vaz, R. C. (2015). Second-Line Chemotherapy in Recurrent Glioblastoma: A 2-Cohort Study. *Oncology research and treatment*, *38*(7-8), 348–354. <https://doi.org/10.1159/000431236>
- Catalano, V., Turdo, A., Di Franco, S., Dieli, F., Todaro, M., & Stassi, G. (2013). Tumor and its microenvironment: a synergistic interplay. *Seminars in cancer biology*, *23*(6 Pt B), 522–532. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.08.007>
- Cha, G. D., Kang, T., Baik, S., Kim, D., Choi, S. H., Hyeon, T., & Kim, D. H. (2020). Advances in drug delivery technology for the treatment of glioblastoma multiforme. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, *328*, 350–367. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.09.002>
- Chan, M. H., Chen, W., Li, C. H., Fang, C. Y., Chang, Y. C., Wei, D. H., Liu, R. S., & Hsiao, M. (2021). An Advanced *In Situ* Magnetic Resonance Imaging and Ultrasonic Theranostics Nanocomposite Platform: Crossing the Blood-Brain Barrier and Improving the Suppression of Glioblastoma Using Iron-Platinum Nanoparticles in Nanobubbles. *ACS applied materials & interfaces*, *13*(23), 26759–26769. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c04990>

- Chen, N. T., Wu, C. Y., Chung, C. Y., Hwu, Y., Cheng, S. H., Mou, C. Y., & Lo, L. W. (2012). Probing the dynamics of doxorubicin-DNA intercalation during the initial activation of apoptosis by fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM). *PloS one*, *7*(9), e44947. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044947>
- Chen, Z., Feng, X., Herting, C. J., Garcia, V. A., Nie, K., Pong, W. W., Rasmussen, R., Dwivedi, B., Seby, S., Wolf, S. A., Gutmann, D. H., & Hambardzumyan, D. (2017). Cellular and Molecular Identity of Tumor-Associated Macrophages in Glioblastoma. *Cancer research*, *77*(9), 2266–2278. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2310>
- Chomas, J. E., Dayton, P., May, D., & Ferrara, K. (2001). Threshold of fragmentation for ultrasonic contrast agents. *Journal of biomedical optics*, *6*(2), 141–150. <https://doi.org/10.1117/1.1352752>
- Crisafuli, F. A., Ramos, E. B., & Rocha, M. S. (2015). Characterizing the interaction between DNA and GelRed fluorescent stain. *European biophysics journal : EBJ*, *44*(1-2), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s00249-014-0995-4>
- Cutts, S. M., Nudelman, A., Rephaeli, A., & Phillips, D. R. (2005). The power and potential of doxorubicin-DNA adducts. *IUBMB life*, *57*(2), 73–81. <https://doi.org/10.1080/15216540500079093>
- Danchenko, M., Csaderova, L., Fournier, P. E., & Sekeyova, Z. (2019). Optimized fixation of actin filaments for improved indirect immunofluorescence staining of rickettsiae. *BMC research notes*, *12*(1), 657. <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4699-9>
- Darrow D. P. (2019). Focused Ultrasound for Neuromodulation. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, *16*(1), 88–99. <https://doi.org/10.1007/s13311-018-00691-3>
- Dasari, S., & Tchounwou, P. B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European journal of pharmacology*, *740*, 364–378. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>
- Dasgupta, A., Liu, M., Ojha, T., Storm, G., Kiessling, F., & Lammers, T. (2016). Ultrasound-mediated drug delivery to the brain: principles, progress and prospects. *Drug discovery today. Technologies*, *20*, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2016.07.007>
- Dehghani, F., Hischebeth, G. T., Wirjatijasa, F., Kohl, A., Korf, H. W., & Hailer, N. P. (2003). The immunosuppressant mycophenolate mofetil attenuates neuronal damage after excitotoxic

injury in hippocampal slice cultures. *The European journal of neuroscience*, 18(5), 1061–1072. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02821.x>.

Diaz, G., Melis, M., Musin, A., Piludu, M., Piras, M., & Falchi, A. M. (2007). Localization of MTT formazan in lipid droplets. An alternative hypothesis about the nature of formazan granules and aggregates. *European journal of histochemistry : EJH*, 51(3), 213–218.

Dundar, B., Markwell, S. M., Sharma, N. V., Olson, C. L., Mukherjee, S., & Brat, D. J. (2020). Methods for in vitro modeling of glioma invasion: Choosing tools to meet the need. *Glia*, 68(11), 2173–2191. <https://doi.org/10.1002/glia.23813>.

Dyke, J. P., Sanelli, P. C., Voss, H. U., Serventi, J. V., Stieg, P. E., Schwartz, T. H., Ballon, D., Shungu, D. C., & Pannullo, S. C. (2007). Monitoring the effects of BCNU chemotherapy Wafers (Gliadel) in glioblastoma multiforme with proton magnetic resonance spectroscopic imaging at 3.0 Tesla. *Journal of neuro-oncology*, 82(1), 103–110. <https://doi.org/10.1007/s11060-006-9254-6>

Ekstrand, A. J., Sugawa, N., James, C. D., & Collins, V. P. (1992). Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(10), 4309–4313. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.10.4309>

Elias, W. J., Huss, D., Voss, T., Loomba, J., Khaled, M., Zadicario, E., Frysinger, R. C., Sperling, S. A., Wylie, S., Monteith, S. J., Druzgal, J., Shah, B. B., Harrison, M., & Wintermark, M. (2013). A pilot study of focused ultrasound thalamotomy for essential tremor. *The New England journal of medicine*, 369(7), 640–648. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1300962>

Escoffre, J. M., Mannaris, C., Geers, B., Novell, A., Lentacker, I., Averkiou, M., & Bouakaz, A. (2013). Doxorubicin liposome-loaded microbubbles for contrast imaging and ultrasound-triggered drug delivery. *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*, 60(1), 78–87. <https://doi.org/10.1109/TUFFC.2013.2539>

Etame, A. B., Diaz, R. J., Smith, C. A., Mainprize, T. G., Hynynen, K., & Rutka, J. T. (2012). Focused ultrasound disruption of the blood-brain barrier: a new frontier for therapeutic delivery in molecular neurooncology. *Neurosurgical focus*, 32(1), E3. <https://doi.org/10.3171/2011.10.FOCUS11252>

Evans, K. D., Weiss, B., & Knopp, M. (2007). High-intensity focused ultrasound (HIFU) for specific therapeutic treatments: a literature review. *Journal of Diagnostic Medical*

- Sonography*, 23(6), 319-327. Exner, A. A., & Kolios, M. C. (2021). Bursting Microbubbles: How Nanobubble Contrast Agents Can Enable the Future of Medical Ultrasound Molecular Imaging and Image-Guided Therapy. *Current opinion in colloid & interface science*, 54, 101463. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2021.101463>
- Eyüpoglu, I. Y., Savaskan, N. E., Bräuer, A. U., Nitsch, R., & Heimrich, B. (2003). Identification of neuronal cell death in a model of degeneration in the hippocampus. *Brain research. Brain research protocols*, 11(1), 1–8. [https://doi.org/10.1016/s1385-299x\(02\)00186-1](https://doi.org/10.1016/s1385-299x(02)00186-1)
- Farine, L., Niemann, M., Schneider, A., & Bütikofer, P. (2015). Phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine biosynthesis by the Kennedy pathway occurs at different sites in *Trypanosoma brucei*. *Scientific reports*, 5, 16787. <https://doi.org/10.1038/srep16787>
- Farino, C. J., Pradhan, S., & Slater, J. H. (2020). The Influence of Matrix-Induced Dormancy on Metastatic Breast Cancer Chemoresistance. *ACS applied bio materials*, 3(9), 5832–5844. <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c00549>
- Feldheim, J., Kessler, A. F., Schmitt, D., Salvador, E., Monoranu, C. M., Feldheim, J. J., Ernestus, R. I., Löhr, M., & Hagemann, C. (2020). Ribosomal Protein S27/Metallopanstimulin-1 (RPS27) in Glioma-A New Disease Biomarker?. *Cancers*, 12(5), 1085. <https://doi.org/10.3390/cancers12051085>
- Fix, S. M., Borden, M. A., & Dayton, P. A. (2015). Therapeutic gas delivery via microbubbles and liposomes. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 209, 139–149. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.04.027>
- Florczyk, S. J., Wang, K., Jana, S., Wood, D. L., Sytsma, S. K., Sham, J., Kievit, F. M., & Zhang, M. (2013). Porous chitosan-hyaluronic acid scaffolds as a mimic of glioblastoma microenvironment ECM. *Biomaterials*, 34(38), 10143–10150. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.09.034>
- Fonkem, E., & Wong, E. T. (2012). NovoTTF-100A: a new treatment modality for recurrent glioblastoma. *Expert review of neurotherapeutics*, 12(8), 895–899. <https://doi.org/10.1586/ern.12.80>
- Furuse M. (2010). Molecular basis of the core structure of tight junctions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(1), a002907. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002907>

- Gallego, J. M., Barcia, J. A., & Barcia-Mariño, C. (2007). Fatal outcome related to carmustine implants in glioblastoma multiforme. *Acta neurochirurgica*, *149*(3), 261–265. <https://doi.org/10.1007/s00701-006-1097-6>
- Gasca-Salas, C., Fernández-Rodríguez, B., Pineda-Pardo, J. A., Rodríguez-Rojas, R., Obeso, I., Hernández-Fernández, F., Del Álamo, M., Mata, D., Guida, P., Ordás-Bandera, C., Montero-Roblas, J. I., Martínez-Fernández, R., Foffani, G., Rachmilevitch, I., & Obeso, J. A. (2021). Blood-brain barrier opening with focused ultrasound in Parkinson's disease dementia. *Nature communications*, *12*(1), 779. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21022-9>
- Geldenhuis, W., Wehrung, D., Groshev, A., Hirani, A., & Sutariya, V. (2015). Brain-targeted delivery of doxorubicin using glutathione-coated nanoparticles for brain cancers. *Pharmaceutical development and technology*, *20*(4), 497–506. <https://doi.org/10.3109/10837450.2014.892130>
- Giladi, M., Schneiderman, R. S., Voloshin, T., Porat, Y., Munster, M., Blat, R., Sherbo, S., Bomzon, Z., Urman, N., Itzhaki, A., Cahal, S., Shteingauz, A., Chaudhry, A., Kirson, E. D., Weinberg, U., & Palti, Y. (2015). Mitotic Spindle Disruption by Alternating Electric Fields Leads to Improper Chromosome Segregation and Mitotic Catastrophe in Cancer Cells. *Scientific reports*, *5*, 18046. <https://doi.org/10.1038/srep18046>
- Greene, C., Hanley, N., & Campbell, M. (2019). Claudin-5: gatekeeper of neurological function. *Fluids and barriers of the CNS*, *16*(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s12987-019-0123-z>
- Guan, X., Hasan, M. N., Maniar, S., Jia, W., & Sun, D. (2018). Reactive Astrocytes in Glioblastoma Multiforme. *Molecular neurobiology*, *55*(8), 6927–6938. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-0880-8>
- Guzmán, H. R., McNamara, A. J., Nguyen, D. X., & Prausnitz, M. R. (2003). Bioeffects caused by changes in acoustic cavitation bubble density and cell concentration: a unified explanation based on cell-to-bubble ratio and blast radius. *Ultrasound in medicine & biology*, *29*(8), 1211–1222. [https://doi.org/10.1016/s0301-5629\(03\)00899-8](https://doi.org/10.1016/s0301-5629(03)00899-8)
- Hagemann, C., Fuchs, S., Monoranu, C. M., Herrmann, P., Smith, J., Hohmann, T., Grabiec, U., Kessler, A. F., Dehghani, F., Löhr, M., Ernestus, R. I., Vince, G. H., & Stein, U. (2013). Impact of MACC1 on human malignant glioma progression and patients' unfavorable prognosis. *Neuro-oncology*, *15*(12), 1696–1709. <https://doi.org/10.1093/neuonc/not136>

Haines, A. M., Tobe, S. S., Kobus, H. J., & Linacre, A. (2015). Properties of nucleic acid staining dyes used in gel electrophoresis. *Electrophoresis*, *36*(6), 941–944. <https://doi.org/10.1002/elps.201400496>

Han, X., Zhou, Y., & Liu, W. (2017). Precision cardio-oncology: understanding the cardiotoxicity of cancer therapy. *NPJ precision oncology*, *1*(1), 31. <https://doi.org/10.1038/s41698-017-0034-x>

Han, Y., & Park, J. H. (2020). Convection-enhanced delivery of liposomal drugs for effective treatment of glioblastoma multiforme. *Drug delivery and translational research*, *10*(6), 1876–1887. <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00773-w>

Harary, M., Segar, D. J., Huang, K. T., Tafel, I. J., Valdes, P. A., & Cosgrove, G. R. (2018). Focused ultrasound in neurosurgery: a historical perspective. *Neurosurgical focus*, *44*(2), E2. <https://doi.org/10.3171/2017.11.FOCUS17586>

Hegi, M. E., Diserens, A. C., Gorlia, T., Hamou, M. F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J. M., Hainfellner, J. A., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, J. E., Hau, P., Mirimanoff, R. O., Cairncross, J. G., Janzer, R. C., & Stupp, R. (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *The New England journal of medicine*, *352*(10), 997–1003. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043331>

Hiltensberger, J. (2021): Nachweis der zytotoxischen Wirkung von Doxorubicin auf Glioblastomzellen mittels immunhistochemischer Fluoreszenzfärbung im 2D und 3D Zellkulturmodell. Bachelorthesis.

Horodyckid, C., Canney, M., Vignot, A., Boisgard, R., Drier, A., Huberfeld, G., François, C., Prigent, A., Santin, M. D., Adam, C., Willer, J. C., Lafon, C., Chapelon, J. Y., & Carpentier, A. (2017). Safe long-term repeated disruption of the blood-brain barrier using an implantable ultrasound device: a multiparametric study in a primate model. *Journal of neurosurgery*, *126*(4), 1351–1361. <https://doi.org/10.3171/2016.3.JNS151635>

Howie, D., Waldmann, H., & Cobbold, S. (2014). Nutrient Sensing via mTOR in T Cells Maintains a Tolerogenic Microenvironment. *Frontiers in immunology*, *5*, 409. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00409>

Jablonowski, L. J., Teraphongphom, N. T., & Wheatley, M. A. (2017). Drug Delivery from a Multi-faceted Ultrasound Contrast Agent: Influence of Shell Composition. *Molecular pharmaceutics*, *14*(10), 3448–3456. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00451>

Jacob, F., Salinas, R. D., Zhang, D. Y., Nguyen, P., Schnoll, J. G., Wong, S., Thokala, R., Sheikh, S., Saxena, D., Prokop, S., Liu, D. A., Qian, X., Petrov, D., Lucas, T., Chen, H. I., Dorsey, J. F., Christian, K. M., Binder, Z. A., Nasrallah, M., Brem, S., ... Song, H. (2020). A Patient-Derived Glioblastoma Organoid Model and Biobank Recapitulates Inter- and Intra-tumoral Heterogeneity. *Cell*, *180*(1), 188–204.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.11.036>

Jamur, M. C., & Oliver, C. (2010). Permeabilization of cell membranes. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *588*, 63–66. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-324-0_9

Jin, M. Z., Han, R. R., Qiu, G. Z., Ju, X. C., Lou, G., & Jin, W. L. (2018). Organoids: An intermediate modeling platform in precision oncology. *Cancer letters*, *414*, 174–180. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.11.021>

Johnsson, M., & Edwards, K. (2003). Liposomes, disks, and spherical micelles: aggregate structure in mixtures of gel phase phosphatidylcholines and poly(ethylene glycol)-phospholipids. *Biophysical journal*, *85*(6), 3839–3847. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74798-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74798-5)

Johnston, C. T., Khan, B., Barth, E. F., Chattopadhyay, S., & Boyd, S. A. (2012). Nature of the interlayer environment in an organoclay optimized for the sequestration of dibenzo-p-dioxin. *Environmental science & technology*, *46*(17), 9584–9591. <https://doi.org/10.1021/es300699y>

Kane J. R. (2019). The Role of Brain Vasculature in Glioblastoma. *Molecular neurobiology*, *56*(9), 6645–6653. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1561-y>

Karg, T. J., & Golic, K. G. (2018). Photoconversion of DAPI and Hoechst dyes to green and red-emitting forms after exposure to UV excitation. *Chromosoma*, *127*(2), 235–245. <https://doi.org/10.1007/s00412-017-0654-5>

Kauffman, M. K., Kauffman, M. E., Zhu, H., Jia, Z., & Li, Y. R. (2016). Fluorescence-Based Assays for Measuring Doxorubicin in Biological Systems. *Reactive oxygen species (Apex, N.C.)*, *2*(6), 432–439. <https://doi.org/10.20455/ros.2016.873>

Ke, N., Wang, X., Xu, X., & Abassi, Y. A. (2011). The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *740*, 33–43. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_6

Keller, C. (2020): Nachweis von apoptotischen Glioblastomzellen in einem 3D-Zellkulturmodell mittels immunhistochemischer Fluoreszenzfärbung. Bachelorthesis.

- Khazaei, M., Pazhouhi, M., & Khazaei, S. (2019). Temozolomide and tranilast synergistic antiproliferative effect on human glioblastoma multiforme cell line (U87MG). *Medical journal of the Islamic Republic of Iran*, *33*, 39. <https://doi.org/10.34171/mjiri.33.39>
- Kievit, F. M., Florczyk, S. J., Leung, M. C., Wang, K., Wu, J. D., Silber, J. R., Ellenbogen, R. G., Lee, J. S., & Zhang, M. (2014). Proliferation and enrichment of CD133(+) glioblastoma cancer stem cells on 3D chitosan-alginate scaffolds. *Biomaterials*, *35*(33), 9137–9143. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.07.037>
- Kim, D. G., Kim, K. H., Seo, Y. J., Yang, H., Marcusson, E. G., Son, E., Lee, K., Sa, J. K., Lee, H. W., & Nam, D. H. (2016). Anti-miR delivery strategies to bypass the blood-brain barrier in glioblastoma therapy. *Oncotarget*, *7*(20), 29400–29411. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8837>
- Kirson, E. D., Dbalý, V., Tovarys, F., Vymazal, J., Soustiel, J. F., Itzhaki, A., Mordechovich, D., Steinberg-Shapira, S., Gurvich, Z., Schneiderman, R., Wasserman, Y., Salzberg, M., Ryffel, B., Goldsher, D., Dekel, E., & Palti, Y. (2007). Alternating electric fields arrest cell proliferation in animal tumor models and human brain tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(24), 10152–10157. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702916104>
- Kirson, E. D., Gurvich, Z., Schneiderman, R., Dekel, E., Itzhaki, A., Wasserman, Y., Schatzberger, R., & Palti, Y. (2004). Disruption of cancer cell replication by alternating electric fields. *Cancer research*, *64*(9), 3288–3295. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-04-0083>
- Kovacs, Z., Werner, B., Rassi, A., Sass, J. O., Martin-Fiori, E., & Bernasconi, M. (2014). Prolonged survival upon ultrasound-enhanced doxorubicin delivery in two syngenic glioblastoma mouse models. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, *187*, 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.05.033>
- Kunwar, S., Chang, S., Westphal, M., Vogelbaum, M., Sampson, J., Barnett, G., Shaffrey, M., Ram, Z., Piepmeier, J., Prados, M., Croteau, D., Pedain, C., Leland, P., Husain, S. R., Joshi, B. H., Puri, R. K., & PRECISE Study Group (2010). Phase III randomized trial of CED of IL13-PE38QQR vs Gliadel wafers for recurrent glioblastoma. *Neuro-oncology*, *12*(8), 871–881. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nop054>
- de la Rosa, J., Sáenz Antoñanzas, A., Shahi, M. H., Meléndez, B., Rey, J. A., & Castresana, J. S. (2016). Laminin-adherent versus suspension-non-adherent cell culture conditions for the isolation of cancer stem cells in the DAOY medulloblastoma cell line. *Tumour biology : the*

journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, 37(9), 12359–12370. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5119-6>

Larkin, J., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Grob, J. J., Rutkowski, P., Lao, C. D., Cowey, C. L., Schadendorf, D., Wagstaff, J., Dummer, R., Ferrucci, P. F., Smylie, M., Hogg, D., Hill, A., Márquez-Rodas, I., Haanen, J., Guidoboni, M., Maio, M., Schöffski, P., Carlino, M. S., ... Wolchok, J. D. (2019). Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *The New England journal of medicine*, 381(16), 1535–1546. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1910836>

Latt, S. A., & Wohlleb, J. C. (1975). Optical studies of the interaction of 33258 Hoechst with DNA, chromatin, and metaphase chromosomes. *Chromosoma*, 52(4), 297–316. <https://doi.org/10.1007/BF00364015>

Eng L. F. (1985). Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *Journal of neuroimmunology*, 8(4-6), 203–214. [https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(85\)80063-1](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(85)80063-1)

Leite, D. M., Zvar Baskovic, B., Civita, P., Neto, C., Gumbleton, M., & Pilkington, G. J. (2020). A human co-culture cell model incorporating microglia supports glioblastoma growth and migration, and confers resistance to cytotoxics. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 34(1), 1710–1727. <https://doi.org/10.1096/fj.201901858RR>.

Lenin, S., Ponthier, E., Scheer, K. G., Yeo, E., Tea, M. N., Ebert, L. M., Oksdath Mansilla, M., Poonnoose, S., Baumgartner, U., Day, B. W., Ormsby, R. J., Pitson, S. M., & Gomez, G. A. (2021). A Drug Screening Pipeline Using 2D and 3D Patient-Derived In Vitro Models for Pre-Clinical Analysis of Therapy Response in Glioblastoma. *International journal of molecular sciences*, 22(9), 4322. <https://doi.org/10.3390/ijms22094322>

Lentacker, I., De Cock, I., Deckers, R., De Smedt, S. C., & Moonen, C. T. (2014). Understanding ultrasound induced sonoporation: definitions and underlying mechanisms. *Advanced drug delivery reviews*, 72, 49–64. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.11.008>

Lesniak, W. G., Chu, C., Jablonska, A., Du, Y., Pomper, M. G., Walczak, P., & Janowski, M. (2019). A Distinct Advantage to Intraarterial Delivery of ⁸⁹Zr-Bevacizumab in PET Imaging of Mice With and Without Osmotic Opening of the Blood-Brain Barrier. *Journal of nuclear*

medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine, 60(5), 617–622.
<https://doi.org/10.2967/jnumed.118.218792>

Li, L. T., Jiang, G., Chen, Q., & Zheng, J. N. (2015). Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review). *Molecular medicine reports*, 11(3), 1566–1572.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2914>

Li, S. Y., & Guo, S. L. (2019). Optimal construction and pharmacokinetic study of CZ48-loaded poly (lactic acid) microbubbles for controlled drug delivery. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 178, 269–275. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.02.047>

Liebner, S., Fischmann, A., Rascher, G., Duffner, F., Grote, E. H., Kalbacher, H., & Wolburg, H. (2000). Claudin-1 and claudin-5 expression and tight junction morphology are altered in blood vessels of human glioblastoma multiforme. *Acta neuropathologica*, 100(3), 323–331.
<https://doi.org/10.1007/s004010000180>

Lim, C., Shin, Y., Jung, J., Kim, J. H., Lee, S., & Kim, D. H. (2018). Stretchable conductive nanocomposite based on alginate hydrogel and silver nanowires for wearable electronics. *APL Materials*, 7(3), 031502.

Lin, C., , Yang, X., , Li, H., , Zou, Y., , Mohammad, I. S., , Rong, H., , Rao, Y., , Song, J., , Leung, S., , & Hu, H., (2021). Self-assembled nanomedicine combining a berberine derivative and doxorubicin for enhanced antitumor and antimetastatic efficacy via mitochondrial pathways. *Nanoscale*, 13(13), 6605–6623. <https://doi.org/10.1039/d1nr00032b>

Liu, E. K., Sulman, E. P., Wen, P. Y., & Kurz, S. C. (2020). Novel Therapies for Glioblastoma. *Current neurology and neuroscience reports*, 20(7), 19.
<https://doi.org/10.1007/s11910-020-01042-6>

Long D. M. (1970). Capillary ultrastructure and the blood-brain barrier in human malignant brain tumors. *Journal of neurosurgery*, 32(2), 127–144.
<https://doi.org/10.3171/jns.1970.32.2.0127>

Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P., & Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta neuropathologica*, 131(6), 803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>

Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H. K., Pfister, S. M., Reifenberger, G., Soffietti, R., von Deimling, A., & Ellison, D.

- W. (2021). The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-oncology*, 23(8), 1231–1251. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>
- Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M., & Myrtek, D. (2014). Antikörper. In *Der Experimentator: Immunologie* (pp. 1-50). Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg..
- Lyubimova, N. V., Timofeev, Y. S., Mitrofanov, A. A., Bekyashev, A. K., Goncharova, Z. A., & Kushlinskii, N. E. (2020). Glial Fibrillary Acidic Protein in the Diagnosis and Prognosis of Malignant Glial Tumors. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 168(4), 503–506. <https://doi.org/10.1007/s10517-020-04741-9>
- Maeda H. (2015). Toward a full understanding of the EPR effect in primary and metastatic tumors as well as issues related to its heterogeneity. *Advanced drug delivery reviews*, 91, 3–6. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.01.002>
- Magaki, S., Hojat, S. A., Wei, B., So, A., & Yong, W. H. (2019). An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1897, 289–298. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_25
- Majtnerová, P., & Roušar, T. (2018). An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. *Molecular biology reports*, 45(5), 1469–1478. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4258-9>
- Mansouri, A., Hachem, L. D., Mansouri, S., Nassiri, F., Laperriere, N. J., Xia, D., Lindeman, N. I., Wen, P. Y., Chakravarti, A., Mehta, M. P., Hegi, M. E., Stupp, R., Aldape, K. D., & Zadeh, G. (2019). MGMT promoter methylation status testing to guide therapy for glioblastoma: refining the approach based on emerging evidence and current challenges. *Neuro-oncology*, 21(2), 167–178. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noy132>
- Marmottant, P., & Hilgenfeldt, S. (2003). Controlled vesicle deformation and lysis by single oscillating bubbles. *Nature*, 423(6936), 153–156. <https://doi.org/10.1038/nature01613>
- Marques-Torrejon, M. A., Gangoso, E., & Pollard, S. M. (2018). Modelling glioblastoma tumour-host cell interactions using adult brain organotypic slice co-culture. *Disease models & mechanisms*, 11(2), dmm031435. <https://doi.org/10.1242/dmm.031435>
- Mawamba Kemo, V. (2020): Beladung von Microbubbles mit Platin(II)- oder Palladium(II)-Komplexen und Freisetzung unter Einwirkung von Ultraschall zur Behandlung von Glioblastomen. Doctoralthesis. Universität Würzburg.

- McDannold, N., Arvanitis, C. D., Vykhodtseva, N., & Livingstone, M. S. (2012). Temporary disruption of the blood-brain barrier by use of ultrasound and microbubbles: safety and efficacy evaluation in rhesus macaques. *Cancer research*, *72*(14), 3652–3663. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0128>
- Merz, F., Gaunitz, F., Dehghani, F., Renner, C., Meixensberger, J., Gutenberg, A., Giese, A., Schopow, K., Hellwig, C., Schäfer, M., Bauer, M., Stöcker, H., Taucher-Scholz, G., Durante, M., & Bechmann, I. (2013). Organotypic slice cultures of human glioblastoma reveal different susceptibilities to treatments. *Neuro-oncology*, *15*(6), 670–681. <https://doi.org/10.1093/neuonc/not003>
- Miller, D. L., & Quddus, J. (2000). Sonoporation of monolayer cells by diagnostic ultrasound activation of contrast-agent gas bodies. *Ultrasound in medicine & biology*, *26*(4), 661–667. [https://doi.org/10.1016/s0301-5629\(99\)00170-2](https://doi.org/10.1016/s0301-5629(99)00170-2)
- Miyamoto, Y., Ikeuchi, M., Noguchi, H., & Hayashi, S. (2018). Long-term Cryopreservation of Human and other Mammalian Cells at -80 °C for 8 Years. *Cell medicine*, *10*, 2155179017733148. <https://doi.org/10.1177/2155179017733148>
- Montesano, G., Bartucci, R., Belsito, S., Marsh, D., & Sportelli, L. (2001). Lipid membrane expansion and micelle formation by polymer-grafted lipids: scaling with polymer length studied by spin-label electron spin resonance. *Biophysical journal*, *80*(3), 1372–1383. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)76110-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)76110-3)
- Mrugala, M. M., Engelhard, H. H., Dinh Tran, D., Kew, Y., Cavaliere, R., Villano, J. L., Annenelie Bota, D., Rudnick, J., Love Sumrall, A., Zhu, J. J., & Butowski, N. (2014). Clinical practice experience with NovoTTF-100A™ system for glioblastoma: The Patient Registry Dataset (PRiDe). *Seminars in oncology*, *41* Suppl 6, S4–S13. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2014.09.010>
- Nam, L., Coll, C., Erthal, L., de la Torre, C., Serrano, D., Martínez-Mañez, R., Santos-Martínez, M. J., & Ruiz-Hernández, E. (2018). Drug Delivery Nanosystems for the Localized Treatment of Glioblastoma Multiforme. *Materials (Basel, Switzerland)*, *11*(5), 779. <https://doi.org/10.3390/ma11050779>
- Nietzer, S., Baur, F., Sieber, S., Hansmann, J., Schwarz, T., Stoffer, C., Häfner, H., Gasser, M., Waaga-Gasser, A. M., Walles, H., & Dandekar, G. (2016). Mimicking Metastases Including Tumor Stroma: A New Technique to Generate a Three-Dimensional Colorectal Cancer Model

Based on a Biological Decellularized Intestinal Scaffold. *Tissue engineering. Part C, Methods*, 22(7), 621–635. <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2015.0557>

Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., Furuse, M., & Tsukita, S. (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *The Journal of cell biology*, 161(3), 653–660. <https://doi.org/10.1083/jcb.200302070>

Nomngongo, P. N., Catherine Ngila, J., Kamau, J. N., Msagati, T. A., Marjanovic, L., & Moodley, B. (2013). Pre-concentration of trace elements in short chain alcohols using different commercial cation exchange resins prior to inductively coupled plasma-optical emission spectrometric detection. *Analytica chimica acta*, 787, 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.05.041>.

O'Brien W. D., Jr (2007). Ultrasound-biophysics mechanisms. *Progress in biophysics and molecular biology*, 93(1-3), 212–255. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2006.07.010>

Ohgaki, H., & Kleihues, P. (2013). The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 19(4), 764–772. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3002>

Ohtsuki, S., Sato, S., Yamaguchi, H., Kamoi, M., Asashima, T., & Terasaki, T. (2007). Exogenous expression of claudin-5 induces barrier properties in cultured rat brain capillary endothelial cells. *Journal of cellular physiology*, 210(1), 81–86. <https://doi.org/10.1002/jcp.20823>

Olczyk, P., Małyszczak, A., & Kuształ, M. (2018). Dialysis membranes: A 2018 update. *Polimery w medycynie*, 48(1), 57–63. <https://doi.org/10.17219/pim/102974>

Omata, D., Maruyama, T., Unga, J., Hagiwara, F., Munakata, L., Kageyama, S., Shima, T., Suzuki, Y., Maruyama, K., & Suzuki, R. (2019). Effects of encapsulated gas on stability of lipid-based microbubbles and ultrasound-triggered drug delivery. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 311-312, 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.08.023>

Omid, Y., Kianinejad, N., Kwon, Y., & Omidian, H. (2021). Drug delivery and targeting to brain tumors: considerations for crossing the blood-brain barrier. *Expert review of clinical pharmacology*, 14(3), 357–381. <https://doi.org/10.1080/17512433.2021.1887729>

Omuro, A., Vlahovic, G., Lim, M., Sahebjam, S., Baehring, J., Cloughesy, T., Voloschin, A., Ramkissoon, S. H., Ligon, K. L., Latek, R., Zwirter, R., Strauss, L., Paliwal, P., Harbison, C.

T., Reardon, D. A., & Sampson, J. H. (2018). Nivolumab with or without ipilimumab in patients with recurrent glioblastoma: results from exploratory phase I cohorts of CheckMate 143. *Neuro-oncology*, *20*(5), 674–686. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nox208>

Onken, J., Goerling, U., Heinrich, M., Pleissner, S., Krex, D., Vajkoczy, P., & Misch, M. (2019). Patient Reported Outcome (PRO) Among High-Grade Glioma Patients Receiving TTFields Treatment: A Two Center Observational Study. *Frontiers in neurology*, *10*, 1026. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.01026>

Ortiz, R., Perazzoli, G., Cabeza, L., Jiménez-Luna, C., Luque, R., Prados, J., & Melguizo, C. (2021). Temozolomide: An Updated Overview of Resistance Mechanisms, Nanotechnology Advances and Clinical Applications. *Current neuropharmacology*, *19*(4), 513–537. <https://doi.org/10.2174/1570159X18666200626204005>

Pacioni, S., D'Alessandris, Q. G., Buccarelli, M., Boe, A., Martini, M., Larocca, L. M., Bolasco, G., Ricci-Vitiani, L., Falchetti, M. L., & Pallini, R. (2019). Brain Invasion along Perivascular Spaces by Glioma Cells: Relationship with Blood-Brain Barrier. *Cancers*, *12*(1), 18. <https://doi.org/10.3390/cancers12010018>

Pal, S., Samanta, N., Das Mahanta, D., Mitra, R. K., & Chattopadhyay, A. (2018). Effect of Phospholipid Headgroup Charge on the Structure and Dynamics of Water at the Membrane Interface: A Terahertz Spectroscopic Study. *The journal of physical chemistry. B*, *122*(19), 5066–5074. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b01633>

Paolillo, M., Comincini, S., & Schinelli, S. (2021). In Vitro Glioblastoma Models: A Journey into the Third Dimension. *Cancers*, *13*(10), 2449. <https://doi.org/10.3390/cancers13102449>

Park, Y., Luce, A. C., Whitaker, R. D., Amin, B., Cabodi, M., Nap, R. J., Szleifer, I., Cleveland, R. O., Nagy, J. O., & Wong, J. Y. (2012). Tunable diacetylene polymerized shell microbubbles as ultrasound contrast agents. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, *28*(8), 3766–3772. <https://doi.org/10.1021/la204510h>

Patel, A. S., Saeed, M., Yee, E. J., Yang, J., Lam, G. J., Losey, A. D., Lillaney, P. V., Thorne, B., Chin, A. K., Malik, S., Wilson, M. W., Chen, X. C., Balsara, N. P., & Hetts, S. W. (2014). Development and Validation of Endovascular Chemotherapy Filter Device for Removing High-Dose Doxorubicin: Preclinical Study. *Journal of medical devices*, *8*(4), 0410081–410088. <https://doi.org/10.1115/1.4027444>

Pawlowska, E., Szczepanska, J., Szatkowska, M., & Blasiak, J. (2018). An Interplay between Senescence, Apoptosis and Autophagy in Glioblastoma Multiforme-Role in Pathogenesis and

Therapeutic Perspective. *International journal of molecular sciences*, 19(3), 889. <https://doi.org/10.3390/ijms19030889>

Pencer, J., White, G. F., & Hallett, F. R. (2001). Osmotically induced shape changes of large unilamellar vesicles measured by dynamic light scattering. *Biophysical journal*, 81(5), 2716–2728. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)75914-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75914-0)

Pencheva, N., de Gooijer, M. C., Vis, D. J., Wessels, L., Würdinger, T., van Tellingen, O., & Bernards, R. (2017). Identification of a Druggable Pathway Controlling Glioblastoma Invasiveness. *Cell reports*, 20(1), 48–60. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.06.036>

Peng, K., Mawamba, V., Schulz, E., Löhr, M., Hagemann, C., & Schatzschneider, U. (2019). iClick Reactions of Square-Planar Palladium(II) and Platinum(II) Azido Complexes with Electron-Poor Alkynes: Metal-Dependent Preference for N1 vs N2 Triazolate Coordination and Kinetic Studies with ¹H and ¹⁹F NMR Spectroscopy. *Inorganic chemistry*, 58(17), 11508–11521. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.9b01304>

Pepelanova, I., Kruppa, K., Scheper, T., & Lavrentieva, A. (2018). Gelatin-Methacryloyl (GelMA) Hydrogels with Defined Degree of Functionalization as a Versatile Toolkit for 3D Cell Culture and Extrusion Bioprinting. *Bioengineering (Basel, Switzerland)*, 5(3), 55. <https://doi.org/10.3390/bioengineering5030055>

Perrin, S. L., Samuel, M. S., Koszyca, B., Brown, M. P., Ebert, L. M., Oksdath, M., & Gomez, G. A. (2019). Glioblastoma heterogeneity and the tumour microenvironment: implications for preclinical research and development of new treatments. *Biochemical Society transactions*, 47(2), 625–638. <https://doi.org/10.1042/BST20180444>

Perry, J. R., Laperriere, N., O'Callaghan, C. J., Brandes, A. A., Menten, J., Phillips, C., Fay, M., Nishikawa, R., Cairncross, J. G., Roa, W., Osoba, D., Rossiter, J. P., Sahgal, A., Hirte, H., Laigle-Donadey, F., Franceschi, E., Chinot, O., Golfopoulos, V., Fariselli, L., Wick, A., ... Trial Investigators (2017). Short-Course Radiation plus Temozolomide in Elderly Patients with Glioblastoma. *The New England journal of medicine*, 376(11), 1027–1037. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1611977>

Pismenskaya, N., Sarapulova, V., Klevtsova, A., Mikhaylin, S., & Bazinet, L. (2020). Adsorption of Anthocyanins by Cation and Anion Exchange Resins with Aromatic and Aliphatic Polymer Matrices. *International journal of molecular sciences*, 21(21), 7874. <https://doi.org/10.3390/ijms21217874>

Plappert-Helbig, U., Libertini, S., Frieauff, W., Theil, D., & Martus, H. J. (2019). Gamma-H2AX immunofluorescence for the detection of tissue-specific genotoxicity in vivo. *Environmental and molecular mutagenesis*, *60*(1), 4–16. <https://doi.org/10.1002/em.22238>

Pouliopoulos, A. N., Jimenez, D. A., Frank, A., Robertson, A., Zhang, L., Kline-Schoder, A. R., Bhaskar, V., Harpale, M., Caso, E., Papapanou, N., Anderson, R., Li, R., & Konofagou, E. E. (2020). Temporal stability of lipid-shelled microbubbles during acoustically-mediated blood-brain barrier opening. *Frontiers in physics*, *8*, 137. <https://doi.org/10.3389/fphy.2020.00137>

Prager, J. M., Grenier, Y., Cozzens, J. W., Chiowanich, P., Gorey, M. T., & Meyer, J. R. (2000). Serial CT and MR imaging of carmustine wafers. *AJNR. American journal of neuroradiology*, *21*(1), 119–123.

Prasanna, P. L., Renu, K., & Valsala Gopalakrishnan, A. (2020). New molecular and biochemical insights of doxorubicin-induced hepatotoxicity. *Life sciences*, *250*, 117599. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117599>

Profaci, C. P., Munji, R. N., Pulido, R. S., & Daneman, R. (2020). The blood-brain barrier in health and disease: Important unanswered questions. *The Journal of experimental medicine*, *217*(4), e20190062. <https://doi.org/10.1084/jem.20190062>

Qazi, M. A., Vora, P., Venugopal, C., Sidhu, S. S., Moffat, J., Swanton, C., & Singh, S. K. (2017). Intratumoral heterogeneity: pathways to treatment resistance and relapse in human glioblastoma. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, *28*(7), 1448–1456. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx169>

Qin, Q., Zhao, L., Liu, Z., Liu, T., Qu, J., Zhang, X., Li, R., Yan, L., Yan, J., Jin, S., Wang, J., & Qiao, J. (2020). Bioinspired l-Proline Oligomers for the Cryopreservation of Oocytes via Controlling Ice Growth. *ACS applied materials & interfaces*, *12*(16), 18352–18362. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c02719>

Quartararo, C. E., Reznik, E., deCarvalho, A. C., Mikkelsen, T., & Stockwell, B. R. (2015). High-Throughput Screening of Patient-Derived Cultures Reveals Potential for Precision Medicine in Glioblastoma. *ACS medicinal chemistry letters*, *6*(8), 948–952. <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.5b00128>

- Rabab'h, O., Al-Ramadan, A., Shah, J., Lopez-Negrete, H., & Gharaibeh, A. (2021). Twenty Years After Glioblastoma Multiforme Diagnosis: A Case of Long-Term Survival. *Cureus*, *13*(6), e16061. <https://doi.org/10.7759/cureus.16061>
- Raghavan, S., Baskin, D. S., & Sharpe, M. A. (2020). A "Clickable" Probe for Active MGMT in Glioblastoma Demonstrates Two Discrete Populations of MGMT. *Cancers*, *12*(2), 453. <https://doi.org/10.3390/cancers12020453>
- Ramachandran, R., Junnuthula, V. R., Gowd, G. S., Ashokan, A., Thomas, J., Peethambaran, R., Thomas, A., Unni, A. K., Panikar, D., Nair, S. V., & Koyakutty, M. (2017). Theranostic 3-Dimensional nano brain-implant for prolonged and localized treatment of recurrent glioma. *Scientific reports*, *7*, 43271. <https://doi.org/10.1038/srep43271>
- Raudenska, M., Balvan, J., Fojtu, M., Gumulec, J., & Masarik, M. (2019). Unexpected therapeutic effects of cisplatin. *Metallomics : integrated biometal science*, *11*(7), 1182–1199. <https://doi.org/10.1039/c9mt00049f>
- Rippke, C. (2016): Assessment of a newly developed Low Intensity Focused Ultrasound Device with Applications in Neuromodulation and Cancer Treatment. Bachelorthesis
- Rivankar S. (2014). An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *Journal of cancer research and therapeutics*, *10*(4), 853–858. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.139267>
- Rodig S. J. (2021). Preparing Paraffin Tissue Sections for Staining. *Cold Spring Harbor protocols*, *2021*(3), 10.1101/pdb.prot099663. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot099663>
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., & Bonner, W. M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *The Journal of biological chemistry*, *273*(10), 5858–5868. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.10.5858>
- Romeis, B. (2015): Mikroskopische Technik (19. Aufl.). Walter de Gruyter GmbH & Co KG. *Springer Spektrum*.
- Rominiyi, O., Vanderlinden, A., Clenton, S. J., Bridgewater, C., Al-Tamimi, Y., & Collis, S. J. (2021). Tumour treating fields therapy for glioblastoma: current advances and future directions. *British journal of cancer*, *124*(4), 697–709. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01136-5>
- Rotman, B., & Papermaster, B. W. (1966). Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. *Proceedings of the National Academy of*

Sciences of the United States of America, 55(1), 134–141.
<https://doi.org/10.1073/pnas.55.1.134>

Ruan, S., Hu, C., Tang, X., Cun, X., Xiao, W., Shi, K., He, Q., & Gao, H. (2016). Increased Gold Nanoparticle Retention in Brain Tumors by in Situ Enzyme-Induced Aggregation. *ACS nano*, 10(11), 10086–10098. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b05070>

Ryma, M., Tylek, T., Liebscher, J., Blum, C., Fernandez, R., Böhm, C., Kastenmüller, W., Gasteiger, G., & Groll, J. (2021). Translation of Collagen Ultrastructure to Biomaterial Fabrication for Material-Independent but Highly Efficient Topographic Immunomodulation. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 33(33), e2101228. <https://doi.org/10.1002/adma.202101228>

Sanderson, M. J., Smith, I., Parker, I., & Bootman, M. D. (2014). Fluorescence microscopy. *Cold Spring Harbor protocols*, 2014(10), pdb.top071795. <https://doi.org/10.1101/pdb.top071795>

Schlicher, R. K., Radhakrishna, H., Tolentino, T. P., Apkarian, R. P., Zarnitsyn, V., & Prausnitz, M. R. (2006). Mechanism of intracellular delivery by acoustic cavitation. *Ultrasound in medicine & biology*, 32(6), 915–924. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2006.02.1416>

Schmid, T. E., & Multhoff, G. (2012). Non-targeted effects of photon and particle irradiation and the interaction with the immune system. *Frontiers in oncology*, 2, 80. <https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00080>

Schmidt, F., Fischer, J., Herrlinger, U., Dietz, K., Dichgans, J., & Weller, M. (2006). PCV chemotherapy for recurrent glioblastoma. *Neurology*, 66(4), 587–589. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000197792.73656.c2>

Schulz, E., Hohmann, T., Hohmann, U., Ernestus, R. I., Löhr, M., Dehghani, F., & Hagemann, C. (2021). Preparation and Culture of Organotypic Hippocampal Slices for the Analysis of Brain Metastasis and Primary Brain Tumor Growth. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2294, 59–77. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1350-4_5

Schulz, E., Mawamba, V., Löhr, M., Hagemann, C., Friedrich, A., & Schatzschneider, U. Structure-activity relations of Pd (II) and Pt (II) thiosemicarbazone complexes on different human glioblastoma cell lines. *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie*.

Sebaugh J. L. (2011). Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharmaceutical statistics*, 10(2), 128–134. <https://doi.org/10.1002/pst.426>

Shah, S., Chandra, A., Kaur, A., Sabnis, N., Lacko, A., Gryczynski, Z., Fudala, R., & Gryczynski, I. (2017). Fluorescence properties of doxorubicin in PBS buffer and PVA films. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, *170*, 65–69. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.03.024>

Shen, Y., Lv, W., Yang, H., Cai, W., Zhao, P., Zhang, L., Zhang, J., Yuan, L., & Duan, Y. (2019). FA-NBs-IR780: Novel multifunctional nanobubbles as molecule-targeted ultrasound contrast agents for accurate diagnosis and photothermal therapy of cancer. *Cancer letters*, *455*, 14–25. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.04.023>

Shi, J., Ren, Y., Ma, J., Luo, X., Li, J., Wu, Y., Gu, H., Fu, C., Cao, Z., & Zhang, J. (2021). Novel CD44-targeting and pH/redox-dual-stimuli-responsive core-shell nanoparticles loading triptolide combats breast cancer growth and lung metastasis. *Journal of nanobiotechnology*, *19*(1), 188. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00934-0>

Shimamura, M., Sato, N., Taniyama, Y., Yamamoto, S., Endoh, M., Kurinami, H., Aoki, M., Ogihara, T., Kaneda, Y., & Morishita, R. (2004). Development of efficient plasmid DNA transfer into adult rat central nervous system using microbubble-enhanced ultrasound. *Gene therapy*, *11*(20), 1532–1539. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302323>

Silver, D. P., Richardson, A. L., Eklund, A. C., Wang, Z. C., Szallasi, Z., Li, Q., Juul, N., Leong, C. O., Calogrias, D., Buraimoh, A., Fatima, A., Gelman, R. S., Ryan, P. D., Tung, N. M., De Nicolò, A., Ganesan, S., Miron, A., Colin, C., Sgroi, D. C., Ellisen, L. W., ... Garber, J. E. (2010). Efficacy of neoadjuvant Cisplatin in triple-negative breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, *28*(7), 1145–1153. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.22.4725>

Simchony, H., Diamant, D., Ram, Z., & Volovitz, I. (2019). Evaluation of the Compatibility of Electric Tumor Treating Fields with Key Anti-tumoral T-Cell Functions. *The Israel Medical Association journal : IMAJ*, *21*(7), 503.

Sirsi, S. R., Fung, C., Garg, S., Tianning, M. Y., Mountford, P. A., & Borden, M. A. (2013). Lung surfactant microbubbles increase lipophilic drug payload for ultrasound-targeted delivery. *Theranostics*, *3*(6), 409–419. <https://doi.org/10.7150/thno.5616>

Song, F., Gao, H., Li, D., Petrov, A. V., Petrov, V. V., Wen, D., & Sukhorukov, G. B. (2021). Low intensity focused ultrasound responsive microcapsules for non-ablative ultrafast intracellular release of small molecules. *Journal of materials chemistry. B*, *9*(10), 2384–2393. <https://doi.org/10.1039/d0tb02788j>

- Sood, D., Tang-Schomer, M., Pouli, D., Mizzoni, C., Raia, N., Tai, A., Arkun, K., Wu, J., Black, L. D., 3rd, Scheffler, B., Georgakoudi, I., Steindler, D. A., & Kaplan, D. L. (2019). 3D extracellular matrix microenvironment in bioengineered tissue models of primary pediatric and adult brain tumors. *Nature communications*, *10*(1), 4529. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12420-1>
- Souza, A. G., Silva, I., Campos-Fernandez, E., Barcelos, L. S., Souza, J. B., Marangoni, K., Goulart, L. R., & Alonso-Goulart, V. (2018). Comparative Assay of 2D and 3D Cell Culture Models: Proliferation, Gene Expression and Anticancer Drug Response. *Current pharmaceutical design*, *24*(15), 1689–1694. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180404152304>
- Stieger, S. M., Caskey, C. F., Adamson, R. H., Qin, S., Curry, F. R., Wisner, E. R., & Ferrara, K. W. (2007). Enhancement of vascular permeability with low-frequency contrast-enhanced ultrasound in the chorioallantoic membrane model. *Radiology*, *243*(1), 112–121. <https://doi.org/10.1148/radiol.2431060167>
- Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Eisenhauer, E., Mirimanoff, R. O., European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups, ... National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England journal of medicine*, *352*(10), 987–996. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>
- Stupp, R., Taillibert, S., Kanner, A., Read, W., Steinberg, D., Lhermitte, B., Toms, S., Idbaih, A., Ahluwalia, M. S., Fink, K., Di Meco, F., Lieberman, F., Zhu, J. J., Stragliotto, G., Tran, D., Brem, S., Hottinger, A., Kirson, E. D., Lavy-Shahaf, G., Weinberg, U., ... Ram, Z. (2017). Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*, *318*(23), 2306–2316. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.18718>
- Suvà, M. L., & Tirosh, I. (2020). The Glioma Stem Cell Model in the Era of Single-Cell Genomics. *Cancer cell*, *37*(5), 630–636. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.04.001>
- Tacar, O., Sriamornsak, P., & Dass, C. R. (2013). Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, *65*(2), 157–170. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2012.01567.x>

- Takenaka, M. C., Gabriely, G., Rothhammer, V., Mascanfroni, I. D., Wheeler, M. A., Chao, C. C., Gutiérrez-Vázquez, C., Kenison, J., Tjon, E. C., Barroso, A., Vandeventer, T., de Lima, K. A., Rothweiler, S., Mayo, L., Ghannam, S., Zandee, S., Healy, L., Sherr, D., Farez, M. F., Prat, A., ... Quintana, F. J. (2019). Control of tumor-associated macrophages and T cells in glioblastoma via AHR and CD39. *Nature neuroscience*, 22(5), 729–740. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0370-y>
- Tan, A. C., Ashley, D. M., López, G. Y., Malinzak, M., Friedman, H. S., & Khasraw, M. (2020). Management of glioblastoma: State of the art and future directions. *CA: a cancer journal for clinicians*, 70(4), 299–312. <https://doi.org/10.3322/caac.21613>
- Tangpong, J., Cole, M. P., Sultana, R., Joshi, G., Estus, S., Vore, M., St Clair, W., Ratanachaiyavong, S., St Clair, D. K., & Butterfield, D. A. (2006). Adriamycin-induced, TNF-alpha-mediated central nervous system toxicity. *Neurobiology of disease*, 23(1), 127–139. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.02.013>
- Tavener, A. M., Phelps, M. C., & Daniels, R. L. (2021). Anthracycline-induced cytotoxicity in the GL261 glioma model system. *Molecular biology reports*, 48(1), 1017–1023. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-06109-8>
- Tawakoli, P. N., Al-Ahmad, A., Hoth-Hannig, W., Hannig, M., & Hannig, C. (2013). Comparison of different live/dead stainings for detection and quantification of adherent microorganisms in the initial oral biofilm. *Clinical oral investigations*, 17(3), 841–850. <https://doi.org/10.1007/s00784-012-0792-3>
- Tewey, K. M., Rowe, T. C., Yang, L., Halligan, B. D., & Liu, L. F. (1984). Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science (New York, N.Y.)*, 226(4673), 466–468. <https://doi.org/10.1126/science.6093249>
- Thibodeaux, S. R., & Milone, M. C. (2019). Immunotherapy Using Chimeric Antigen Receptor-Engineered T Cells: A Novel Cellular Therapy with Important Implications for the Clinical Laboratory. *Clinical chemistry*, 65(4), 519–529. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2016.258988>
- Thigpen, J. T., Brady, M. F., Homesley, H. D., Malfetano, J., DuBeshter, B., Burger, R. A., & Liao, S. (2004). Phase III trial of doxorubicin with or without cisplatin in advanced endometrial carcinoma: a gynecologic oncology group study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 22(19), 3902–3908. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.02.088>

- Tinkov, S., Bekeredjian, R., Winter, G., & Coester, C. (2009). Microbubbles as ultrasound triggered drug carriers. *Journal of pharmaceutical sciences*, 98(6), 1935–1961. <https://doi.org/10.1002/jps.21571>
- Treat, L. H., McDannold, N., Vykhodtseva, N., Zhang, Y., Tam, K., & Hynynen, K. (2007). Targeted delivery of doxorubicin to the rat brain at therapeutic levels using MRI-guided focused ultrasound. *International journal of cancer*, 121(4), 901–907. <https://doi.org/10.1002/ijc.22732>
- Treat, L. H., McDannold, N., Zhang, Y., Vykhodtseva, N., & Hynynen, K. (2012). Improved anti-tumor effect of liposomal doxorubicin after targeted blood-brain barrier disruption by MRI-guided focused ultrasound in rat glioma. *Ultrasound in medicine & biology*, 38(10), 1716–1725. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2012.04.015>
- Truong, D., Fiorelli, R., Barrientos, E. S., Melendez, E. L., Sanai, N., Mehta, S., & Nikkhah, M. (2019). A three-dimensional (3D) organotypic microfluidic model for glioma stem cells - Vascular interactions. *Biomaterials*, 198, 63–77. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.07.048>
- Unga, J., Omata, D., Kudo, N., Ueno, S., Munakata, L., Shima, T., Suzuki, R., & Maruyama, K. (2019). Development and evaluation of stability and ultrasound response of DSPC-DPSG-based freeze-dried microbubbles. *Journal of liposome research*, 29(4), 368–374. <https://doi.org/10.1080/08982104.2018.1556294>
- van Wijk, F. H., Aapro, M. S., Bolis, G., Chevallier, B., van der Burg, M. E., Poveda, A., de Oliveira, C. F., Tumolo, S., Scotto di Palumbo, V., Piccart, M., Franchi, M., Zanaboni, F., Lacave, A. J., Fontanelli, R., Favalli, G., Zola, P., Guastalla, J. P., Rosso, R., Marth, C., Nooij, M., ... European Organisation for Research and Treatment of Cancer Gynaecological Cancer Group (2003). Doxorubicin versus doxorubicin and cisplatin in endometrial carcinoma: definitive results of a randomised study (55872) by the EORTC Gynaecological Cancer Group. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 14(3), 441–448. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdg112>
- Villanueva-Meyer, J. E., Wood, M. D., Choi, B. S., Mabray, M. C., Butowski, N. A., Tihan, T., & Cha, S. (2018). MRI Features and IDH Mutational Status of Grade II Diffuse Gliomas: Impact on Diagnosis and Prognosis. *AJR. American journal of roentgenology*, 210(3), 621–628. <https://doi.org/10.2214/AJR.17.18457>

Vogelbaum, M. A., & Aghi, M. K. (2015). Convection-enhanced delivery for the treatment of glioblastoma. *Neuro-oncology*, *17* Suppl 2(Suppl 2), ii3–ii8. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou354>

Wahab, R. A., Choi, M., Liu, Y., Krauthamer, V., Zderic, V., & Myers, M. R. (2012). Mechanical bioeffects of pulsed high intensity focused ultrasound on a simple neural model. *Medical physics*, *39*(7), 4274–4283. <https://doi.org/10.1118/1.4729712>

Wang, C., Tong, X., & Yang, F. (2014). Bioengineered 3D brain tumor model to elucidate the effects of matrix stiffness on glioblastoma cell behavior using PEG-based hydrogels. *Molecular pharmaceutics*, *11*(7), 2115–2125. <https://doi.org/10.1021/mp5000828>

Wang, J., Li, P., Tian, R., Hu, W., Zhang, Y., Yuan, P., Tang, Y., Jia, Y., & Zhang, L. (2016). A Novel Microbubble Capable of Ultrasound-Triggered Release of Drug-Loaded Nanoparticles. *Journal of biomedical nanotechnology*, *12*(3), 516–524. <https://doi.org/10.1166/jbn.2016.2181>

Wang, M., Zander, T., Liu, X., Liu, C., Raj, A., Florian Wieland, D. C., Garamus, V. M., Willumeit-Römer, R., Claesson, P. M., & Dédinaite, A. (2015). The effect of temperature on supported dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) bilayers: structure and lubrication performance. *Journal of colloid and interface science*, *445*, 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.12.042>

Wang, M., Zhang, C., Wang, X., Yu, H., Zhang, H., Xu, J., Zhao, J., & Jiang, X. (2021). Tumor-treating fields (TTFields)-based cocktail therapy: a novel blueprint for glioblastoma treatment. *American journal of cancer research*, *11*(4), 1069–1086.

Wei, J., Wu, A., Kong, L. Y., Wang, Y., Fuller, G., Fokt, I., Melillo, G., Priebe, W., & Heimberger, A. B. (2011). Hypoxia potentiates glioma-mediated immunosuppression. *PLoS one*, *6*(1), e16195. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016195>

Wei, S. C., Anang, N., Sharma, R., Andrews, M. C., Reuben, A., Levine, J. H., Cogdill, A. P., Mancuso, J. J., Wargo, J. A., Pe'er, D., & Allison, J. P. (2019). Combination anti-CTLA-4 plus anti-PD-1 checkpoint blockade utilizes cellular mechanisms partially distinct from monotherapies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(45), 22699–22709. <https://doi.org/10.1073/pnas.1821218116>

Weller, M., Butowski, N., Tran, D. D., Recht, L. D., Lim, M., Hirte, H., Ashby, L., Mechtler, L., Goldlust, S. A., Iwamoto, F., Drappatz, J., O'Rourke, D. M., Wong, M., Hamilton, M. G., Finocchiaro, G., Perry, J., Wick, W., Green, J., He, Y., Turner, C. D., ... ACT IV trial

investigators (2017). Rindopepimut with temozolomide for patients with newly diagnosed, EGFRvIII-expressing glioblastoma (ACT IV): a randomised, double-blind, international phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*, *18*(10), 1373–1385. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30517-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30517-X)

Wen, L., Wang, K., Zhang, F., Tan, Y., Shang, X., Zhu, Y., Zhou, X., Yuan, H., & Hu, F. (2020). AKT activation by SC79 to transiently re-open pathological blood brain barrier for improved functionalized nanoparticles therapy of glioblastoma. *Biomaterials*, *237*, 119793. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.119793>

Wenger, C., Miranda, P. C., Salvador, R., Thielscher, A., Bomzon, Z., Giladi, M., Mrugala, M. M., & Korshoej, A. R. (2018). A Review on Tumor-Treating Fields (TTFields): Clinical Implications Inferred From Computational Modeling. *IEEE reviews in biomedical engineering*, *11*, 195–207. <https://doi.org/10.1109/RBME.2017.2765282>

Witzel, F., Fritsche-Guenther, R., Lehmann, N., Sieber, A., & Blüthgen, N. (2015). Analysis of impedance-based cellular growth assays. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *31*(16), 2705–2712. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv216>

Wu, H. L., Tong, Y., Peng, Q., Li, N., & Ye, S. (2016). Phase transition behaviors of the supported DPPC bilayer investigated by sum frequency generation (SFG) vibrational spectroscopy and atomic force microscopy (AFM). *Physical chemistry chemical physics : PCCP*, *18*(3), 1411–1421. <https://doi.org/10.1039/c5cp04960a>

Wu, J., & Nyborg, W. L. (2008). Ultrasound, cavitation bubbles and their interaction with cells. *Advanced drug delivery reviews*, *60*(10), 1103–1116. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.03.009>

Xiao, N., Liu, J., Liao, L., Sun, J., Jin, W., & Shu, X. (2019). Improved delivery of doxorubicin by altering the tumor microenvironment using ultrasound combined with microbubbles and chemotherapy. *Journal of B.U.ON. : official journal of the Balkan Union of Oncology*, *24*(2), 844–852.

Xiao, W., Deng, Z., Huang, J., Huang, Z., Zhuang, M., Yuan, Y., Nie, J., & Zhang, Y. (2019). Highly Sensitive Colorimetric Detection of a Variety of Analytes via the Tyndall Effect. *Analytical chemistry*, *91*(23), 15114–15122. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03824>

Xue, J., Zhao, Z., Zhang, L., Xue, L., Shen, S., Wen, Y., Wei, Z., Wang, L., Kong, L., Sun, H., Ping, Q., Mo, R., & Zhang, C. (2017). Neutrophil-mediated anticancer drug delivery for

suppression of postoperative malignant glioma recurrence. *Nature nanotechnology*, 12(7), 692–700. <https://doi.org/10.1038/nnano.2017.54>

Yanagida, K., Liu, C. H., Faraco, G., Galvani, S., Smith, H. K., Burg, N., Anrather, J., Sanchez, T., Iadecola, C., & Hla, T. (2017). Size-selective opening of the blood-brain barrier by targeting endothelial sphingosine 1-phosphate receptor 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(17), 4531–4536. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618659114>

Yang, F., Teves, S. S., Kemp, C. J., & Henikoff, S. (2014). Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochimica et biophysica acta*, 1845(1), 84–89. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2013.12.002>

Yang, Z., & Wang, K. K. (2015). Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends in neurosciences*, 38(6), 364–374. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2015.04.003>

Yemm, K. E., Alwan, L. M., Malik, A. B., & Salazar, L. G. (2019). Renal toxicity with liposomal doxorubicin in metastatic breast cancer. *Journal of oncology pharmacy practice : official publication of the International Society of Oncology Pharmacy Practitioners*, 25(7), 1738–1742. <https://doi.org/10.1177/1078155218798157>

Yi, H. G., Jeong, Y. H., Kim, Y., Choi, Y. J., Moon, H. E., Park, S. H., Kang, K. S., Bae, M., Jang, J., Youn, H., Paek, S. H., & Cho, D. W. (2019). A bioprinted human-glioblastoma-on-a-chip for the identification of patient-specific responses to chemoradiotherapy. *Nature biomedical engineering*, 3(7), 509–519. <https://doi.org/10.1038/s41551-019-0363-x>

Zhang, C., Burger, M. C., Jennewein, L., Genßler, S., Schönfeld, K., Zeiner, P., Hattingen, E., Harter, P. N., Mittelbronn, M., Tonn, T., Steinbach, J. P., & Wels, W. S. (2015). ErbB2/HER2-Specific NK Cells for Targeted Therapy of Glioblastoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 108(5), 10.1093/jnci/djv375. <https://doi.org/10.1093/jnci/djv375>

Zhang, J., Liu, Z., Zhou, S., Teng, Y., Zhang, X., & Li, J. (2020). Novel Span-PEG Multifunctional Ultrasound Contrast Agent Based on CNTs as a Magnetic Targeting Factor and a Drug Carrier. *ACS omega*, 5(49), 31525–31534. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c03325>

Zhang, L., Han, L., Sun, X., Gao, D., Qin, J., & Wang, J. (2012). The use of PEGylated liposomes to prolong the circulation lifetime of salvianolic acid B. *Fitoterapia*, 83(4), 678–689. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2012.02.004>

- Zhang, M., & Lemay, S. G. (2019). Interaction of Anionic Bulk Nanobubbles with Cationic Liposomes: Evidence for Reentrant Condensation. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 35(11), 4146–4151. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b03927>
- Zhang, S., Liu, X., Bawa-Khalife, T., Lu, L. S., Lyu, Y. L., Liu, L. F., & Yeh, E. T. (2012). Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nature medicine*, 18(11), 1639–1642. <https://doi.org/10.1038/nm.2919>
- Zhang, Y., Sun, C., Zhang, Q., Deng, Y., Hu, X., & Chen, P. (2020). Intranasal delivery of Paclitaxel encapsulated nanoparticles for brain injury due to Glioblastoma. *Journal of applied biomaterials & functional materials*, 18, 2280800020977170. <https://doi.org/10.1177/2280800020977170>
- Zhao, Y. Z., Du, L. N., Lu, C. T., Jin, Y. G., & Ge, S. P. (2013). Potential and problems in ultrasound-responsive drug delivery systems. *International journal of nanomedicine*, 8, 1621–1633. <https://doi.org/10.2147/IJN.S43589>
- Zhu, M. Q., Chen, T., Zhang, G. F., Li, C., Gong, W. L., Chen, Z. Q., & Aldred, M. P. (2014). Spiropyran-based biodegradable polymer all-optical transistors integrate the switching and modulation of visible light frequency. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 50(20), 2664–2666. <https://doi.org/10.1039/c3cc49016e>
- Zhu, Y., Jiang, Y., Meng, F., Deng, C., Cheng, R., Zhang, J., Feijen, J., & Zhong, Z. (2018). Highly efficacious and specific anti-glioma chemotherapy by tandem nanomicelles co-functionalized with brain tumor-targeting and cell-penetrating peptides. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 278, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.03.025>.

12. Danksagung

Mein Dank gilt all den lieben Menschen, die mich während meiner Promotion und dem gesamten Studium begleitet und stets unterstützt haben:

Vielen Dank an die Jörg-Bernards-Stiftung (Köln, Deutschland), die dieses Projekt finanziell gefördert und somit meine Promotion ermöglicht haben.

Ein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. Carsten Hagemann für die Begleitung und Betreuung meiner Promotion. Deine Tür war für Fragen immer offen.

Ebenso gilt der Dank Prof. Dr. Schatzschneider für den Einfluss der chemischen Komponente dieser Arbeit, die Betreuung und fachliche Hilfestellung.

Prof. Dr. Dandekar für die Übernahme der Drittkorrektur.

Prof. Dr. Mario Löhr danke ich für das Einbringen der klinischen Aspekte.

Dr. Vera Dufner möchte ich besonders für die tolle Zusammenarbeit an neuen Projekten danken. Du hast mich sehr motiviert und meinen Horizont erweitert.

Elli Karl für die aufmunternden Worte, die fröhliche Art und tatkräftige Unterstützung.

Siggi Kühnel für ihr Engagement, die ehrlichen Worte und fachliche Kompetenz.

Dr. Carina Blum für ihre Zeit und Engagement bei meinen finalen Versuchen, die diese Arbeit vervollständigt haben.

Julia Hörmann, mit der ich nicht nur eine tolle Zeit im Labor hatte, sondern in der ich auch eine Freundin gefunden habe.

Clara Keller, die mich tatkräftig unterstützt hat und frischen Wind ins Labor gebracht hat

Danke an alle, die ein Teil dieses Weges mit mir im Labor gegangen sind.

Ein herzlicher Dank geht an meine Familie.

Mama und Papa, Danke, dass ich immer den Freiraum und die vollste Unterstützung hatte meinem beruflichen Traum nachzugehen. Ihr steht immer hinter mir.

Danke Lena, du bist meine seelische Stütze und immer für mich da

Danke Kevin, für deine liebevolle Unterstützung und Motivation auf diesem Weg, den wir gemeinsam gehen konnten.

13. Eidesstaatliche Erklärungen nach §7 Abs. 2 Satz 3,4,5 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „**Lokale Ultraschall-vermittelte Zytostatika-Applikation zur Behandlung von Hirntumoren**“, eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Weiterhin erkläre ich, dass bei allen Abbildungen und Texten bei denen die Verwertungsrechte (Copyright) nicht bei mir liegen, diese von den Rechtsinhabern eingeholt wurden und die Textstellen bzw. Abbildungen entsprechend den rechtlichen Vorgaben gekennzeichnet sind sowie bei Abbildungen, die dem Internet entnommen wurden, der entsprechende Hypertextlink angegeben wurde.

Affidavit

I hereby declare that my thesis entitled: „**local ultrasound mediated cytostatic drug application for the treatment of brain tumors**” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore I verify that the thesis has not been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Besides I declare that if I do not hold the copyright for figures and paragraphs, I obtained it from the rights holder and that paragraphs and figures have been marked according to law or for figures taken from the internet the hyperlink has been added accordingly.

Würzburg, den _____