

**Lokale Chemosensitivierung von
Ovarialkarzinomzellen mittels einmaliger
Laserbehandlung
Einsatz von PARP-Inhibitoren**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Helen Katharina Becker

aus Dachau

2025

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Alexander Mustea
2. Gutachterin: Prof. Dr. Eleni Gkika

Tag der Mündlichen Prüfung: 01.08.2025

Aus der Klinik und Poliklinik für Gynäkologie und Gynäkologische Onkologie

Für meinen Vater, Peter Becker.

Du hast mich immer unterstützt und deine Spuren werden mich weiter begleiten.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	9
1.1 Das Ovarialkarzinom	9
1.1.1 PARP-Inhibitoren	9
1.2 Laser	11
1.2.1 Laser in der Medizin	11
1.2.2 Laser in onkologischen Anwendungen	12
1.3 Fragestellung	13
2. Material und Methoden	14
2.1 Material	14
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	14
2.1.2 Chemikalien und kommerzielle Lösungen	16
2.1.3 Zelllinien	16
2.1.4 Zellkultur: Medien und Zusätze	16
2.2 Zellbiologische Methoden	17
2.2.1 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	17
2.2.2 Kultivierung und Normalpassage von Zellen	17
2.2.3 Aussaat/ Ernte von Zellen und Bestimmung der Zellzahl	18
2.2.4 Behandlung mit den PARP-Inhibitoren	18
2.3 Behandlung mit Laserstrahlung	19
2.3.1 Bestimmung der applizierten Dosis	20
2.3.2 Thermische Effekte durch Laserbehandlung	22
2.3.3 Auswirkungen auf den pH-Wert des Nährmediums durch Laserbehandlung	22
2.3.4 Einfluss von Laserbehandlung auf das Zellwachstum in angrenzenden Wells	22

2.3.5	Kombinierter Einsatz von Laserbehandlung und PARP-Inhibitoren	23
2.3.6	Statistische Auswertung	24
3.	Ergebnisse	25
3.1	Etablierung eines geeigneten Zellkultur-Modellsystems	25
3.2	Bestimmung der geeigneten Konzentration der PARPi	26
3.3	Biologisch relevante Effekte von 445 nm Laserstrahlen im in vitro OC-Modellsystem	27
3.3.1	Thermische Effekte durch 445 nm Laserstrahlen	27
3.3.2	pH-Wert Änderungen des Zellkulturmediums durch 445 nm Laserstrahlen	29
3.3.3	Ausschluss eines Wachstums-inhibierenden Effektes auf Zellen in angrenzenden Vertiefungen der Mikrotiterplatte	30
3.4	Wachstumsinhibition der Zelllinien nach Laserbehandlung	32
3.5	Kombination von PARPi und Laserbehandlung	35
4.	Diskussion	41
4.1	Titration der PARPi	42
4.2	Biologische Effekte von Laserlicht im blauen Spektrum	43
4.3	Wachstumsinhibierender Effekt	45
4.4	Kombination von PARPi und Laserbehandlung	46
4.5	Klinischer Nutzen	49
5.	Zusammenfassung	54
6.	Abbildungsverzeichnis	55
7.	Literaturverzeichnis	57
8.	Erklärung zum Eigenanteil	70
9.	Danksagung	71

Abkürzungsverzeichnis

Φ	Strahlungsdosis
A	Bestrahlungsfläche
Abb.	Abbildung
BRCA1	Tumorsuppressorgen: BReast CAncer 1
BRCA2	Tumorsuppressorgen: BReast CAncer 2
D	Applizierte Dosis
DMEM/ F12	Zellkulturmedium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbeccos Phosphatgepufferte Salzlösung
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (Franz.)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HIPEC	Hyperthermische intraperitoneale Chemotherapie
HR	Homologe Rekombination
HRD	Homologe-Rekombinations-Defizienz
HSP	Hitzeschockproteine
I	Intensität
IC	Inhibitorische Konzentration
Ktrl.	Kontrolle
LAHIPEC	Laser assistierte Hypertherme intraperitoneale Chemotherapie

LLLT	Low-Level-Lasertherapie
MW	Mittelwert
NA	Numerische Apertur
Nira	Niraparib
OC	Ovarialkarzinom
Ola	Olaparib
OVCAR-3	Ovarialkarzinomzelllinie
P	Leistung
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PARPi	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase-Inhibitor
PBM	Photobiomodulation
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPMI 1640	Zellkulturmedium
Ruca	Rucaparib
Seq.	Sequentiell
Sim.	Simultan
SK-OV-3	Ovarialkarzinomzelllinie
StAbw.	Standardabweichung
t	Behandlungsdauer
T	Temperatur
UV-Bereich	Ultravioletter Bereich
x g	Zentrifugalkraft

1. Einleitung

1.1 Das Ovarialkarzinom

Im Laufe des Lebens erkrankt etwa eine von 76 Frauen an einem Ovarialkarzinom (OC). Trotz der heutigen operativen und medikamentösen Behandlungsmöglichkeiten ist die Prognose im Vergleich zu anderen Krebserkrankungen ungünstig. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei etwa 42 %. Circa 76 % der Fälle werden in einem fortgeschrittenen Stadium (FIGO Stadium III/IV) diagnostiziert, da die Diagnostik limitiert ist durch einen häufig symptomarmen Verlauf und ein fehlendes effektives Screening (Robert Koch Institut/ Zentrum für Krebsregisterdaten, 2022). Die Therapie des OC beginnt mit der operativen Resektion des Tumors unter gleichzeitigem intraoperativem Staging, um die weitere Behandlungsstrategie zu planen. Die meisten Patientinnen profitieren zudem von einer adjuvanten Chemotherapie. Häufig kommen Carboplatin und Taxane zum Einsatz und je nach Stadium Bevacizumab und/ oder PARP-Inhibitoren (PARPi) (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022). Trotz makroskopischer Komplettresektion, sind verbliebene Tumorreste möglich und peritoneale Rezidive treten häufig auf, was sich ebenfalls negativ auf die Prognose ausübt (Roett und Evans, 2009).

1.1.1 PARP-Inhibitoren

Die Einführung von Poly-ADP-Ribose-Polymerasen-Inhibitoren (PARPi) hat zu einer bedeutenden Veränderung der Behandlungsansätze für das OC während des gesamten Therapieverlaufs geführt. PARPi werden in der Therapie des OC insbesondere zur Erhaltungstherapie nach Operation und Chemotherapie eingesetzt (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022).

PARPi hemmen die Wirkung von PARP. PARPs sind Enzyme, die an der effizienten Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen beteiligt sind (Hoeijmakers, 2001). PARPi binden an das aktive Zentrum der DNA-assoziierten PARPs, sodass keine Dissoziation mehr möglich ist („PARP Trapping“). Somit verbleiben die Enzyme an der DNA und blockieren den Zugang für weitere Reparatur-Enzyme. Treffen die Replikationsgabeln auf das PARP-DNA-Addukt führt dies zu Doppelstrangbrüchen. In gesunden Zellen werden Doppelstrangbrüche durch Homologe Rekombination (HR) repariert. Krebszellen, die eine Defizienz in der HR aufweisen (bspw. durch Mutationen in BRCA1 oder BRCA2)

können Doppelstrangbrüche nicht ausreichend reparieren. Ersatzweise werden andere Reparaturwege initiiert, wie die nicht-homologe-Endverknüpfung, die jedoch fehleranfälliger sind. Dies führt zu einer genomischen Instabilität der Tumorzelle, die schließlich zur Einleitung der Apoptose führt. Klinisch kann eine Rückbildung des Tumors beobachtet werden (Chan et al., 2021; Chen, 2011). Abbildung 1 verdeutlicht den Prozess.

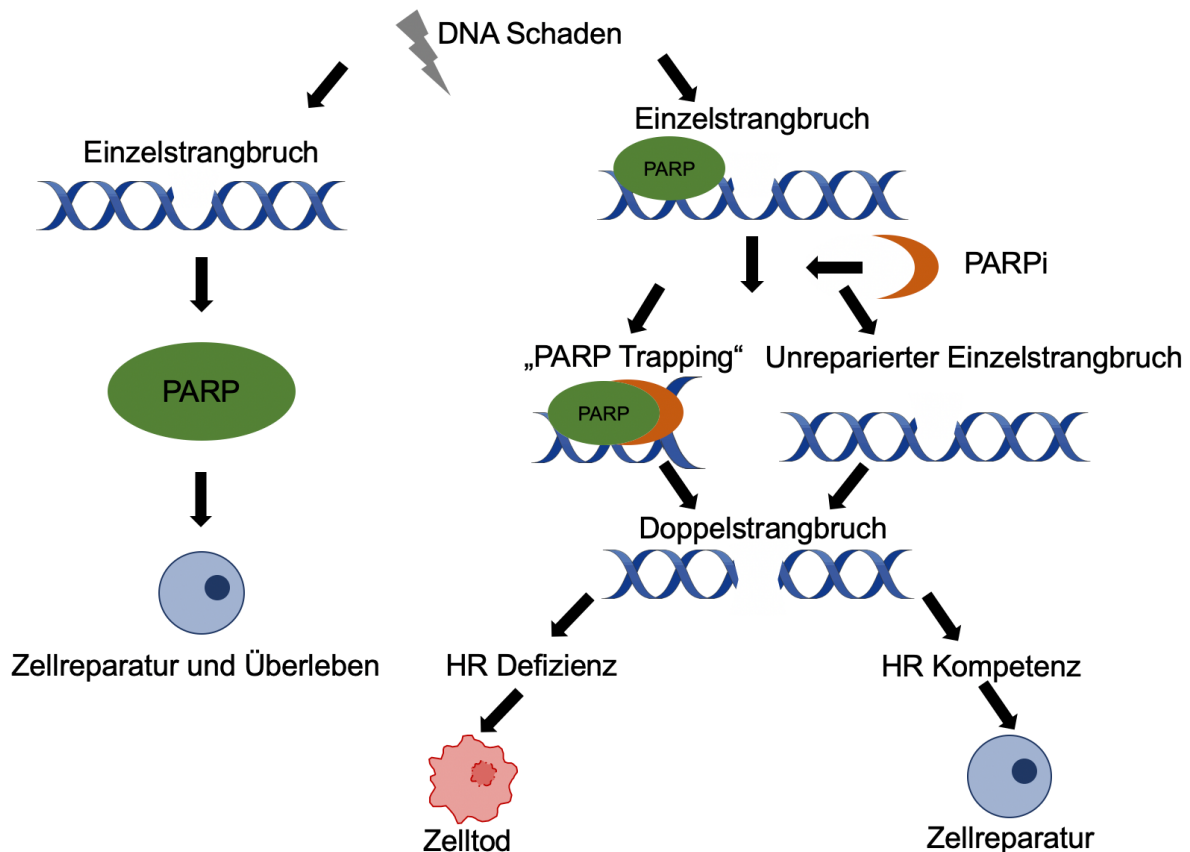


Abb. 1: Wirkweise von PARP-Inhibitoren (Chan et al., 2021)

Aktuell sind drei PARPi zur Therapie des OC zugelassen. Im Jahr 2014 wurde der erste PARPi Olaparib (Lynparza; AstraZeneca) von der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) in der EU zugelassen. Voraussetzung für die Behandlung ist ein nachgewiesener positiver Status der Homologen-Rekombinations-Defizienz (HRD), definiert als BRCA1/2-Mutation oder genomische Instabilität (EMA, 2022). Jedoch konnte eine signifikante Verbesserung des mittleren progressionsfreien Überlebens, sowohl für Patientinnen mit BRCA-Mutation als auch für BRCA-Wildtyp-Patientinnen nachgewiesen werden (Ledermann et al., 2014). Der zweite PARPi Niraparib (Zejula; Tesaro) erhielt im Jahr 2017 seine Zulassung in der EU zur Behandlung vom OC mit HRD (EMA, 2020). Im

Unterschied zu Olaparib ist die Indikation unabhängig vom BRCA Status und/oder einer HRD (Mirza et al., 2016). Als dritter PARPi erhielt Rucaparib (Rubraca; Clovis Oncology) 2018 die Zulassung in der EU zur Behandlung des OC (EMA, 2023). Auch für Rucaparib konnte eine signifikante Wirksamkeit unabhängig vom BRCA Status nachgewiesen werden (Ledermann et al., 2020).

Trotz der signifikanten Verbesserung des krankheitsfreien Überlebens unter PARPi Therapie zeigen sich Herausforderungen. So zum Beispiel die niedrige Bioverfügbarkeit und schlechte Tumoranreicherung der Inhibitoren (Herman und Santos, 2023; Baldwin et al., 2018; Heo und Dhillon, 2018; Singh et al., 2020). Darüber hinaus entwickeln etwa 40-70 % der Tumoren im Verlauf einer Langzeiteinnahme eine Resistenz gegen diese Therapie (Kim und Nam, 2022). Daher ist es von entscheidender Bedeutung, Strategien zu entwickeln, um die PARPi Therapie weiter zu optimieren. Ein vielversprechender Ansatz ist die kombinierte Behandlung mit Laserlicht.

1.2 Laser

Der Begriff Laser ist ein Akronym und erklärt sich aus seiner Wirkweise. Er steht für „Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation“ (Lichtverstärkung durch stimulierte Aussendung von Strahlung) (Cios et al., 2021). Laserwirkungen werden durch mehrere Parameter charakterisiert, wobei die Wellenlänge der entscheidende Parameter ist. Sie bestimmt die Eindringtiefe des Lichts - je höher die Wellenlänge, desto größer ist die Durchdringung des Gewebes. Dies ist jedoch auch mit thermischen Effekten verbunden, die ebenfalls mit steigender Wellenlänge zunehmen (Ash et al., 2017). Weitere Parameter sind die Energie und die Dauer der Bestrahlung. Beide Parameter spezifizieren die insgesamt von den Zellen aufgenommene Laserbestrahlungsdosis, die wiederum den Zellstoffwechsel unterschiedlich beeinflusst (Basso et al., 2018). Außerdem beeinflusst die Betriebsart des Lasers - kontinuierlich (Dauerstrichbetrieb) oder pulsierend - die Auswirkungen der Laserstrahlung auf das Gewebe (Cios et al., 2021).

1.2.1 Laser in der Medizin

Im Jahr 1961 fand Laser zum ersten Mal in der Medizin Anwendung, als Campbell Netzhautablösungen damit behandelte (Campbell et al., 1963). In den letzten Jahren hat

sich die Laser-Technologie bedeutend weiterentwickelt, was dazu geführt hat, dass Laser in zahlreichen medizinischen Bereichen sowohl als therapeutisches als auch als diagnostisches Werkzeug eingesetzt werden. In der Gynäkologie werden Laser insbesondere bei chirurgischen Eingriffen für die Exzision und die Ablation von Gewebe verwendet (Phillips et al., 2020). Durch die Vielzahl an veränderbaren Parametern gibt es jedoch ein breites Anwendungsgebiet. Die Lasersysteme, die für medizinische Zwecke zur Verfügung stehen, emittieren elektromagnetische Strahlung von ultravioletter (180 nm) bis mittlerem infrarotem (10 µm) Spektralbereich (Meister et al., 2004). Je nach medizinischem Anwendungsgebiet unterscheiden sich die verwendeten Leistungsbereiche erheblich. Während bei chirurgischen Anwendungen hochenergetische Laser zum Einsatz kommen, um präzise Gewebeablation oder Koagulation zu ermöglichen (Katta et al., 2022), gibt es auch Laseranwendungen im Bereich der niedrigen Leistungen, die unter den Begriffen „Photobiomodulation“ (PBM)/ „Low-Level-Lasertherapie“ (LLLT) zusammengefasst werden (Fornaini et al., 2021). Der Leistungsbereich ist nicht eindeutig definiert. Autoren sprechen bei der PBM/ LLLT von applizierten Dosen zwischen 4 und 50 J/cm² (Zein et al., 2018). Die zelluläre Wirkung der PBM/ LLLT ist vielseitig. Es werden sowohl stimulierende (King, 1989; Wu et al., 2012), als auch hemmende (Schindl et al., 2000) Effekte beschrieben.

1.2.2 Laser in onkologischen Anwendungen

Bisher wurden nur wenige Untersuchungen zur biologischen Wirkung von Laserstrahlen im Bereich potenzieller onkologischer Anwendungen, außerhalb der chirurgischen Anwendung, durchgeführt. Die vorhandenen Studien untersuchten die Auswirkungen auf Zellproliferation und Migrationsverhalten im Bereich der PBM/ LLLT (Zhang et al., 2008; Liang et al., 2015). Für potenzielle zukünftige Therapieansätze sind jedoch auch thermische Auswirkungen und die Auswirkungen auf die Membranpermeabilität von großem Interesse.

Die thermischen Effekte auf Gewebe unterscheiden sich je nach erreichter Temperatur und Expositionsdauer (Dewey, 2009). Der hyperthermische Bereich umfasst Temperaturen von circa 40-47 °C. In diesem Temperaturintervall werden Proteine entfaltet und hydrophobe Gruppen freigelegt, die miteinander reagieren und Aggregate

bilden können. Diese Prozesse sind durch das Vorhandensein von molekularen Chaperonen, wie HSP70, reversibel und daher für die meisten nicht malignen Gewebe nicht dauerhaft schädigend (Roti Roti, 2008). Tumorzellen reagieren jedoch empfindlicher auf Hyperthermie, was auch therapeutische Möglichkeiten eröffnet (Zhou et al., 2011; Ahmed und Zaidi, 2013). Im Gegensatz dazu kommt es im Temperaturbereich von circa 48-60 °C bei allen Geweben zu starken Protein-Denaturierungen, die größtenteils irreversibel sind (Roti Roti, 2008). Daher ist es von entscheidender Bedeutung einen therapeutischen Bereich für die Laserbehandlung zu definieren, in dem gesundes Gewebe nicht geschädigt wird, aber die antitumorale Therapie effektiv unterstützt wird.

Durch Laser mit geeigneter Wellenlänge und Leistung kann die Funktionalität der Zytoplasmamembran gestört werden und die Membran wird durchlässiger für niedermolekulare Substanzen inklusive Chemotherapeutika. Dies wird nicht nur durch die Wirkung von Laserlicht selbst vermittelt (Caruso-Davis et al., 2011; Neira et al., 2002; Montag et al., 2000), sondern auch durch die von Laser hervorgerufene ROS-Bildung (Kim, 2002; Shields et al., 2021) und Hyperthermie (Ahmed und Zaidi, 2013).

1.3 Fragestellung

Die Forschungshypothese der vorliegenden Arbeit ist, dass der kombinierte Einsatz von Laserbehandlung und PARPi eine potenzierte antiproliferative Wirksamkeit im OC-Zellmodell aufweisen wird. Dies basiert auf der Annahme, dass die Laserbehandlung und die damit verbundene Hyperthermie die Membrangängigkeit erhöhen und die Wirkung der PARPi verstärken kann. Im klinischen Kontext könnte die gezielte intraoperative Chemosensitivierung durch Laser in den Bereichen des Tumorgewebes dazu führen, dass die Tumorzellen eine größere Menge an Chemotherapeutika aufnehmen. Dies wiederum könnte zu besseren therapeutischen Ergebnissen führen, da niedrigere Dosen der Chemotherapie verwendet werden könnten, was potenziell zu weniger unerwünschten Nebenwirkungen führt. Darüber hinaus könnte diese Methode dazu beitragen, Resistenzen zu durchbrechen und somit die Effektivität der Behandlung zu erhöhen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Die Tabellen 2.1.1 bis 2.1.4 geben einen Überblick über die verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien und Zelllinien.

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät/Verbrauchsmaterial	Hersteller
15 ml Röhrchen	Corning, Inc. (Corning, USA)
50 ml Falcon	Greiner Bio-One GmbH (Kremsmünster, Österreich)
Absaugvorrichtung Integra VacuSafe	Integra Biosciences AG (Zizers, Schweiz)
Absaugvorrichtung uniVACUUSYS1	Lab Logistics Group GmbH (Meckenheim)
CASY Model TT – Cell counter and Analyzer	OMNI Life Science GmbH & Co KG (Bremen)
CASYcup	OMNI Life Science GmbH & Co KG (Bremen)
Feinwaage ABS 120-4	KERN & Sohn GmbH (Balingen-Frommern)
Glaspasteurpipette	VWR International GmbH (Darmstadt)
Inkubator HeraCell 240	Heraeus Holding GmbH (Hanau)
Inkubator MCO-170 AICD-PE	PHC Europe B.V. (Etten-Leur, Niederlande)
Inkubator INCO2 108	Memmert GmbH + Co. KG (Schwabach)
Kryoröhrchen 2 ml	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht)
Laser Wolf Diode 445 nm 10 W	A.R.C. Laser GmbH (Nürnberg)
Energie-/ Leistungsmessgerät LabMax-TOP	Coherent, Inc. (Santa Clara, USA)
PM10-Detektor	Coherent, Inc. (Santa Clara, USA)
Lineartisch, Positioniertisch XYZ Achse VT-80	PI MiCos GmbH (Eschbach)
Mikroskop AE31E	Motic Deutschland GmbH (Wetzlar)

pH-Meter FiveEasy™ FE20	Mettler-Toledo GmbH (Schwerzenbach, Schweiz)
Pipettensatz, 0,5-1000 µl	Eppendorf SE (Hamburg)
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co. KG (Nürmbrecht)
Pipettierhilfe Pibetboy acu	Integra Biosciences GmbH (Biebertal)
Pipettierhilfe accu-jet® pro	Brand GmbH (Wertheim)
Probenröhre 75 x 12 mm	Sarstedt AG & Co. KG (Nürmbrecht)
Reagiergefäß 0,5 ml, 1,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG (Nürmbrecht)
Serologische Pipette 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt AG & Co. KG (Nürmbrecht)
Sterilbank BSB3A	Gelaire Laminar Air Flow (Sydney, Australien)
Sterilbank HERA safe	Heraeus Holding GmbH (Hanau)
Sterilbank safe 2020	Thermo Fischer Scientific, Inc. (Massachusetts, USA)
Temperaturanzeigergerät TDA-3000	Jumo GmbH & Co. KG (Fulda)
Vortex Mixer RS-VA10	Phoenix Instrument GmbH (Garbsen)
Wasserbad WNE 22	Memmert GmbH + Co.KG (Schwabach)
Wasserbad Exatherm U3 (ZK)	Julabo GmbH (Seelbach)
Zellkulturflasche 75 cm ²	Sarstedt AG & Co. KG (Nürmbrecht)
Zellkulturplatte 24 Well	Sarstedt AG & Co. KG (Nürmbrecht)
Zentrifuge 2-7 (ZK)	Sigma Laborzentrifugen GmbH (Osterode am Harz)
Zentrifuge 5415R (ZK)	Eppendorf SE (Hamburg)
Zentrifuge 5804R	Eppendorf SE (Hamburg)
Tisch-pH-Meter pH 50 VioLab Basic	XS Instruments (Capri (MO), Italien)
Vornado miniature vortex mixer	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf)
pH-Einstabmesskette für allgemein wässrige Lösungen	Dostmann electronic GmbH (Wertheim-Reicholzheim)

2.1.2 Chemikalien und kommerzielle Lösungen

Chemikalie	Hersteller
Olaparib 10 mM	Selleck Chemicals LLC (Houston, USA)
Niraparib 10 mM	Selleck Chemicals LLC (Houston, USA)
Rucaparib 10 mM	Selleck Chemicals LLC (Houston, USA)

Kommerzielle Lösung	Hersteller
CASYblue	Roche Diagnostics (Basel, Schweiz)
CASYclean	Roche Diagnostics (Basel, Schweiz)
CASYton	Roche Diagnostics (Basel, Schweiz)
Dimethylsulfoxid	PanReac AppliChem ITW Reagents (Glenview, USA)
Kalibrierlösungen pH	Dostmann electronic GmbH (Wertheim-Reicholzheim)

2.1.3 Zelllinien

Zelllinie	Hersteller
OVCAR-3	CLS Cell Lines Service GmbH (Eppelheim)
SK-OV-3	CLS Cell Lines Service GmbH (Eppelheim)

2.1.4 Zellkultur: Medien und Zusätze

Produkt	Hersteller/Herstellung
DMEM/F12	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach)
DPBS	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach)
Fetales Rinderserum FBS	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach)
Gentamycin	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach)
Insulin-Transferrin-Selenium-Ethanolamine (ITS-X)	Thermo Fischer Scientific, Inc. (Massachusetts, USA)
RPMI 1640	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach)
Trypsin 10 x	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach)
Trypsin 1 x	5 ml 10x-Trypsin, 45 ml DPBS

Zelllinie	Medium und Zusätze
OVCAR-3	RPMI 1640, 50 ml FBS, 620 µl Gentamycin, 500 µl Insulin
SK-OV-3	DMEM/F12, 25 ml FBS, 620 µl Gentamycin

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Die für diese Arbeit verwendeten Zelllinien SK-OV-3 und OVCAR-3 wurden zur längerfristigen Lagerung in niedriger Passage schonend eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert. Dafür wurden die adhärennten Zellen vom Boden der Kultivierungsflasche, zuerst mit 10 ml DPBS gewaschen, anschließend durch Zugabe von 2 ml 1x Trypsin gelöst. Durch Zugabe von 4 ml serumhaltigen Mediums wurde die Enzymreaktion gestoppt und die Zellen wurden in dem Medium resuspendiert. Anschließend wurden sie 3 min lang bei 300 x g zentrifugiert. Das hierdurch gewonnene Zellsediment wurde in 3 ml Einfriermedium (Kultur Medium + 10 % DMSO) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde nun in zwei Kryoröhrchen aufgeteilt und bei -80 °C für 24 h tiefgekühlt. Zur permanenten Lagerung wurden die Zellen bei -196 °C im Stickstofftank eingefroren.

Zum Auftauen der Zellen dampften die Kryoröhrchen bei Raumtemperatur aus, anschließend wurden sie für 30 s in ein 37 °C warmes Wasserbad gestellt. Danach wurden die Zellen in 10 ml Zelllinien-spezifischem Medium resuspendiert. Daraufhin wurden sie für 3 min bei 300 x g zentrifugiert. Das so erhaltene Zellpellet wurde in eine T75 Zellkulturflasche mit 10 ml vorgelegtem Medium überführt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit.

2.2.2 Kultivierung und Normalpassage von Zellen

Die Konfluenz der Zellkulturflaschen wurde täglich lichtmikroskopisch geprüft. Beim Erreichen einer Konfluenz von 80-90 % wurde das verbrauchte Medium aus den Zellkulturflaschen abgesaugt und mit die Zellen 10 ml DPBS gewaschen. Zum Ablösen der adhärennten Zellen erfolgte die Zugabe des proteolytischen Enzyms Trypsin (2 ml 1 x Trypsin). Die Zellen wurden mit dem Trypsin bei 37 °C bis zum Ablösen der Zellen vom Flaschenboden inkubiert. Anschließend wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von

Zellkulturmedium gestoppt. Nach Resuspension der Zellen in dem Medium erfolgte die Zentrifugation bei 300 x g für 3 min. Schließlich wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in einem definierten Volumen frischen Mediums gelöst und resuspendiert. Die Suspension wurde in einem Umsetzverhältnis von 1:10 bis 1:3 in T75 Zellkulturflaschen mit 10 ml vorgelegtem Medium überführt. Für Versuche wurden ausschließlich Zellen der Passage 3-30 verwendet.

2.2.3 Aussaat/ Ernte von Zellen und Bestimmung der Zellzahl

Für die Versuche wurden 24-Well-Zellkultur-Platten verwendet. Um den Zellen ein exponentielles Wachstum innerhalb der entsprechend vorgesehenen Inkubationszeit zu ermöglichen, wurde für jede Zelllinie eine definierte Anfangszellzahl pro Well ermittelt. So wurden für OVCAR-3 $3,0 \times 10^4$ Zellen und für SK-OV-3 $2,0 \times 10^4$ Zellen zu Beginn in je ein Well gesät. Die entsprechende Zellzahl wurde, suspendiert in 1ml Medium, in das jeweilige Well überführt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit.

Zur Ernte der Zellen wurde das verbrauchte Medium aus den Wells abgesaugt. Danach erfolgte eine Waschung mit 0,5 ml DPBS. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37 °C für 5 min mit 100 µl Trypsin. Die Zellen wurden daraufhin in 900 µl Medium suspendiert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellzählung erfolgte automatisch mit dem Gerät CASY TT. Bei diesem System beruht die Zählung auf einer Messung der Widerstandsänderung, bei der 50 µl der Zellsuspension in 10 ml CASYTon® dilutiert werden. Das Gerät saugt automatisch ein Aliquot davon durch eine Messkapillare, an der eine Spannung angelegt ist. Jede Zelle führt beim Passieren der Kapillare zu einer Änderung des Widerstandes. Die Anzahl der gemessenen Widerstandsänderungen entspricht der Zellzahl.

2.2.4 Behandlung mit den PARP-Inhibitoren

24 h nach Aussaat der Zellen in den 24-Well-Titerplatten wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Das neue Medium wurde zuvor mit den PARPi in definierter Konzentration versetzt. Da die PARPi in DMSO gelöst wurden, wurde als Kontrolle Medium mit DMSO versetzt. Pro Well wurde 1 ml des Gemisches den adhären Zellen zugeführt. Die anschließende Inkubation erfolgte bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit.

2.3 Behandlung mit Laserstrahlung

Für die Versuche wurde ein Diodenlaser mit der Wellenlänge 445 nm gewählt, der für den klinischen Einsatz zugelassen ist. Um eine kontinuierliche Ausgangsleistung zu gewährleisten wurde der Laser im Dauerstrichbetrieb betrieben. Die in den Versuchen angegebenen Laserleistungen [W] entsprechen der Ausgabeleistung des Lasers.

Die Versuche wurden bei minimaler Umgebungsbeleuchtung durchgeführt. Die Laserstrahlung wurde über eine Lichtleitfaser (Außendurchmesser $\varnothing = 320 \mu\text{m}$ und Innendurchmesser $\varnothing = 283 \mu\text{m}$) zu der 24-Well-Titerplatte geführt. Das distale Ende der Faser wurde mithilfe einer metallischen Führungshülse fixiert. Die Faser ragte 20 mm aus der Führungshülse heraus. Der Strahlaustritt erfolgte kegelförmig (θ (Vollwinkel) $25,4^\circ$ bzw. $443,3 \text{ mrad}$; NA: 0,22 mit $\text{NA} = \sin(\alpha/2)$).

Der Abstand zwischen Strahlaustritt und dem Boden der Mikrotiterplatte wurde so gewählt, dass die bestrahlte Fläche dem Durchmesser eines Wells entspricht. So wurde eine gleichmäßige Bestrahlung der gesamten Bodenfläche des Wells gewährleistet. Der Abstand vom Strahlaustritt der Lichtleitfaser zum Boden der Well-Platte betrug hierbei 41,7 mm, die Fläche eines Wells: $1,9 \text{ cm}^2$. Um äußere Einflüsse, wie bspw. Austrocknung oder eine mögliche Kontamination zu minimieren, blieb der Deckel der Well-Platte während der Behandlung mit Laserstrahlung geschlossen. Während der Laserbehandlung war der Zellrasen in jedem Well von $300,0 \mu\text{l}$ Medium bedeckt.

Die applizierte Dosis der Laserbehandlung konnte durch die Parameter Laserleistung P und Bestrahlungsdauer t variiert werden. Die auf dem Zellrasen generierte Intensität I ergibt sich hierbei aus der emittierten Laserleistung P und der Bestrahlungsfläche A wie folgt:

$$I = \frac{P}{A}$$

Die applizierte Strahlungsdosis Φ ergibt sich jetzt aus

$$\Phi = I \times t$$

Die applizierte Dosis Φ ist eine leistungs- und zeitabhängige Größe der Form $\Phi = \Phi(P, t)$.

Laser und Lichtleitfaser waren während der Versuche auf der optischen Bank fixiert. Um den Lichtstrahl gezielt dem zu behandelnden Well zuzuführen, wurde die Wellplatte auf einem computergesteuerten XYZ-Positioniertisch, der eine Positionierung mit einer Präzision von $1,0\text{ }\mu\text{m}$ ermöglichte, befestigt. Als Nullposition wurde die Einstellung gewählt, die eine gleichmäßige Bestrahlung der gesamten Bodenfläche des Wells, in der oberen, linken Ecke der Wellplatte, gewährleistet. Durch eine Verschiebung des Positioniertisches um je $18,6\text{ mm}$ pro Well konnten gezielt die anderen Wells der Platte angefahren und behandelt werden.

2.3.1 Bestimmung der applizierten Dosis

Die am Laser eingestellte Leistung P entsprach nicht der Leistung, die im Versuchsaufbau zu den Zellen gelangte. Daher wurde diese Leistung mithilfe eines Laserleistungsmessgerätes in Verbindung mit einem PM10-Detektor bestimmt.

Der Zellrasen befand sich in einer Entfernung von $41,7\text{ mm}$ von dem distalen Ende der Lichtleitfaser. Zusätzlich lagen der Deckel der Well-Platte sowie das Zellkulturmedium im Strahlengang. Für die Messung wurde der Detektor des Laserleistungsmessgerätes ebenfalls in einer Entfernung von $41,7\text{ mm}$ angebracht. Durch das Einbringen des Well-Platten-Deckels sowie des Zellkulturmediums in den Strahlengang konnte schließlich so auf die tatsächliche Leistung geschlossen werden und ein Anpassungsfaktor ermittelt werden.

Bei der Messung in einem Abstand von $41,7\text{ mm}$ zum Strahlenausstritt wurde eine Leistung von $78,67\text{ \%} \pm 2,00\text{ \%}$ der ursprünglich eingestellten Laser-Leistung detektiert (*Abb. 2 a*). Nach Einbringen des Bodens der Wellplatte in den Strahlengang, konnten noch $68,10\text{ \%} \pm 1,74\text{ \%}$ der Ausgangsleistung gemessen werden (*Abb. 2 b*). Als sowohl der Wellplatten-Deckel als auch das Nährmedium und der Wellplatten-Boden in den Strahlengang gebracht wurden, wurden nur noch $59,76\text{ \%} \pm 1,50\text{ \%}$ der ursprünglich eingestellten Leistung gemessen (*Abb. 2 c*).

Daher kann angenommen werden, dass etwa $70\text{ \%}$ der ursprünglich eingestellten Leistung den Zellrasen, der sich oberhalb des Wellplatten Bodens befindet, erreichen. Dies liegt daran, dass der Wellplatten-Boden eine Leistungsminderung von etwa $10\text{ \%}$ verursacht ((a)-(b)). Diese Minderung kann aus den $59,76\text{ \%} \pm 1,50\text{ \%}$ (c)

herausgerechnet werden, um auf näherungsweise 70 % zu gelangen, die tatsächlich bei den Zellen ankommen. Dies entspricht einem Anpassungsfaktor von 0,7.

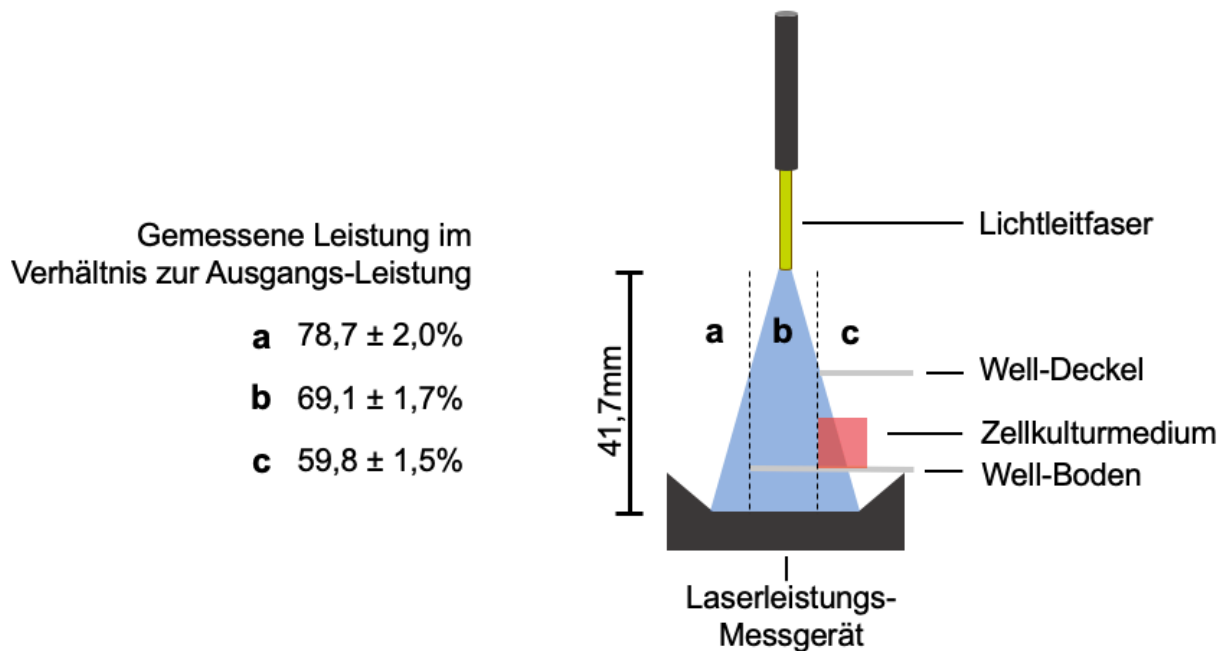


Abb. 2: Bestimmung der Laserleistung, die im Versuchsaufbau auf die Zellen wirkt. Das Laserleistungsmessgerät ist in 41,7 mm Abstand zum Strahlenausgang des Lasers angebracht. (a) Kein Hindernis liegt im Strahlengang. (b) Der Mikrotiterplatten-Boden liegt im Strahlengang. (c) Mikrotiterplatten-Deckel und -Boden sowie das Zellkulturmedium liegen im Strahlengang.

Um einen Vergleich der Leistung mit den in der Literatur gefundenen Ergebnissen zu ermöglichen, wurde die applizierte Dosis D in der Einheit J/cm^2 ermittelt. Dies wurde unter der Voraussetzung durchgeführt, dass bei einer Entfernung von 41,7 mm genau eine Well-Fläche beleuchtet wurde. Die Fläche A eines Wells, der Teil einer 24-Well Platte ist, beträgt $1,9 \text{ cm}^2$. Daher wurde die Leistung pro $1,9 \text{ cm}^2$ vom Laserleistungsmessgerät erfasst. Um die applizierte Dosis D in J/cm^2 auszudrücken, wurde folgende Formel verwendet:

$$D = \frac{P \times \text{Anpassungsfaktor} \times t}{A}$$

2.3.2 Thermische Effekte durch Laserbehandlung

Zur Analyse der thermischen Effekte durch Laserbehandlung wurden zwei Ansätze mit verschiedener Starttemperatur gewählt. Im ersten Ansatz wurde das Zellkulturmedium bei Raumtemperatur vorbereitet. Pro Well wurden 300 µl des Mediums mit einer Temperatur von $20,0 \pm 0,2$ °C eingebracht. Vor der Behandlung wurde die Temperatur des Mediums gemessen. Anschließend wurde der Deckel der Wellplatte geschlossen und die Laserbehandlung durchgeführt. Unmittelbar nach der Behandlung wurde die Temperatur des Mediums erneut gemessen.

Im zweiten Ansatz wurde die mit 300 µl Nährmedium pro Well befüllte Wellplatte direkt aus dem Inkubator genommen, um sicherzustellen, dass das Medium der Inkubator Temperatur von $37 \pm 0,5$ °C entsprach. Zusätzlich wurde eine Zellkulturflasche randvoll mit Wasser gefüllt und ebenfalls bei 37,0 °C im Inkubator gelagert. Während der Laserbehandlung wurde die Wellplatte über die mit Wasser gefüllte Flasche positioniert, um eine Kühlung durch Exposition bei Raumtemperatur zu vermeiden. Vor der Behandlung wurde die Starttemperatur des Mediums gemessen und unmittelbar nach der Behandlung erneut.

2.3.3 Auswirkungen auf den pH-Wert des Nährmediums durch Laserbehandlung

Bei Raumtemperatur und circa 0,04 % CO₂ in der Raumluft wurden 300 µl Zellkulturmedium pro Well eingebracht. Der pH-Wert des Nährmediums wurde unmittelbar vor der Laserbehandlung bestimmt. Während der Laserbehandlung wurde der Deckel der Wellplatte geschlossen. Direkt nach der Behandlung wurde der pH-Wert erneut bestimmt.

2.3.4 Einfluss von Laserbehandlung auf das Zellwachstum in angrenzenden Wells

Ein auf der 24-Well Platte zentral liegendes Well wurde mit Laser (90 s, 5 W/ 10 W) behandelt (Abb. 2). Nach 24 h, 72 h und 120 h wurden die Zellzahlen bestimmt. Außerdem wurden die Zellzahlen der Wells bestimmt, die direkt an das Behandelte angrenzen („1. Reihe“), sowie die derjenigen, die mit einem Well Abstand an das Behandelte angrenzen („2. Reihe“). Als Kontrollgruppe wurde auf einer separaten Wellplatte ausgesät, die zu keinem Zeitpunkt mit dem Laserlicht in Berührung kam.

Jedoch wurde die Kontroll-Mikrotiterplatte ebenfalls für 90 s der Raumtemperatur exponiert um vergleichbare Bedingungen zu erzeugen.

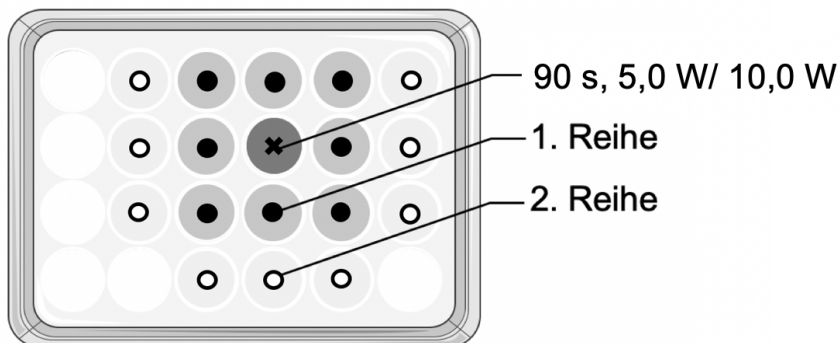


Abb. 3: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus: Einfluss von Laserbehandlung auf das Zellwachstum in angrenzenden Wells

2.3.5 Kombiniertes Einsatz von Laserbehandlung und PARP-Inhibitoren

Für die kombinierte Behandlung der Zellen mit Laser und PARPi wurden zwei unterschiedliche Vorgehensweisen entwickelt. Der erste Ansatz beinhaltete eine kombinierte, sequentielle Behandlung, bei der der Zellrasen 24 h nach der Aussaat zunächst mit Laser behandelt wurde. Während dieser Behandlung befanden sich 300 µl reines Medium pro Well. Nach der Laserbehandlung wurden 700 µl mit PARP-Inhibitoren versetztes Medium hinzugefügt. Die Konzentration der PARPi im Medium wurde hierbei so gewählt, dass die gewünschte Endkonzentration im Gesamtvolumen von 1000 µl erreicht wurde. Der zweite Ansatz umfasste eine simultane Behandlung, bei der die Laserbehandlung in Anwesenheit von PARPi durchgeführt wurde. Den Zellen wurden 300 µl Medium mit PARPi in definierter Konzentration zugeführt, danach erfolgte die Laserbehandlung. Im Anschluss wurden weitere 700 µl mit PARPi versetztes Medium hinzugefügt.

Den Zellen der Kontrollgruppe wurde mit DMSO versetztes Medium zugeführt. Es bestand kein Laserkontakt, jedoch wurden die Kontrollen auch gleichlang wie die behandelten Zellen der Raumtemperatur exponiert.

Die anschließende Inkubation erfolgte bei 37,0 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit.

2.3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und Analyse der Daten erfolgte mittels Microsoft Excel 2016. Die Ergebnisse stammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten und wurden als Mittelwert der absoluten Zellzahl $\pm$ StAbw der absoluten Zellzahlen dargestellt. Die Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p < 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***).

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung eines geeigneten Zellkultur-Modellsystems

Um für die nachfolgenden Inkubationsversuche mit den Zelllinien SK-OV-3 und OVCAR-3 ein geeignetes Modell zu etablieren, wurden die Zelllinien mit vier unterschiedlichen initialen Zellzahlen ausgesät und der Wachstumsverlauf über 120 h verfolgt. Ziel war es, den Zelllinien optimale Wachstumsbedingungen zu gewährleisten.

SK-OV-3 Zellen zeigten für die Startzellzahlen $1,0 \times 10^4$, $2,0 \times 10^4$ und $3,0 \times 10^4$ im Verlauf über 120 h ein stetig steigendes Wachstum, wohingegen der Ansatz mit $4,0 \times 10^4$ Zellen nach 96 h die maximale Wachstumsdichte erreichte, was dazu führte, dass die Zellen begannen abzusterben (*Abb. 4 A*). OVCAR-3 Zellen zeigten für alle vier Startzellzahlen im Verlauf über 120 h ein stetig steigendes Wachstum (*Abb. 4 B*). Insgesamt zeigten beide Zelllinien ein ähnliches Wachstumsverhalten. Bei einer Aussaat von $3,0 \times 10^4$ SK-OV-3- und $4,0 \times 10^4$ OVCAR-3-Zellen erreichten beide Zelllinien nach 120 h etwa $2,5 \times 10^5$ Zellen. Für die anschließenden Experimente wurden daher als Startzellzahl für SK-OV-3 $3,0 \times 10^4$ und für OVCAR-3 $4,0 \times 10^4$ Zellen gewählt.

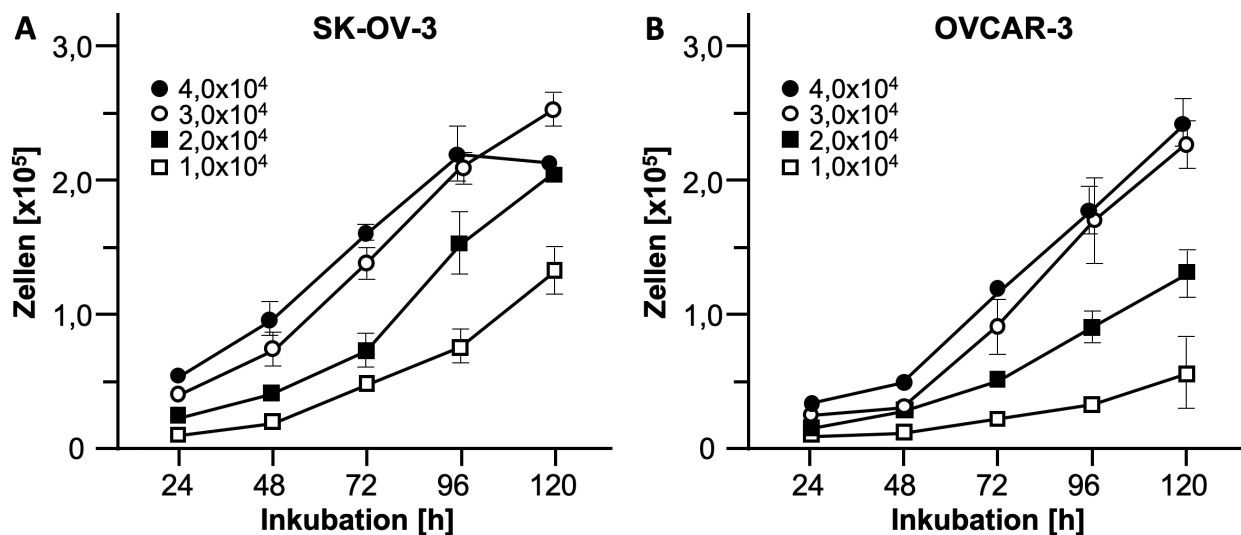


Abb. 4: Wachstumskinetiken von SK-OV-3 (A) und OVCAR-3 (B) Zellen in 24-Well-Zellkulturplatten mit unterschiedlichen initialen Zellzahlen. Die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten werden als MW $\pm$ StAbw der absoluten Zellzahlen dargestellt.

3.2 Bestimmung der geeigneten Konzentration der PARPi

Nachdem ein geeignetes Modell für die Inkubationsversuche mit den Zelllinien SK-OV-3 und OVCAR-3 etabliert worden war, wurden diese Zelllinien mit den PARPi Ola, Ruca und Nira behandelt, um den Wachstums-inhibierenden Effekt zu untersuchen. Ziel war es, eine Konzentration zu bestimmen, welche eine inhibitorische Wirkung des Zellwachstums von circa 25 % im Vergleich zu der DMSO-Kontrollgruppe zeigte (IC_{25}). Die IC_{25} wurde gewählt, um im Kernversuch, der die Kombination von PARPi und Laser beinhaltet, additive bzw. potenzierte Effekte besser zu erkennen. Die Behandlung der beiden Zelllinien mit den PARPi zeigte, erwartungsgemäß, einen Konzentrations-abhängigen, Wachstums-inhibierenden Effekt.

Nach 120 h Inkubation mit DMSO zeigte die Kontrollgruppe der SK-OV-3 Zelllinie eine durchschnittliche Zellzahl von $2,8 \times 10^5 \pm 6,0 \times 10^3$. Für den PARPi Ola konnte näherungsweise eine IC_{25} von $10,0 \mu M$ ermittelt werden (120 h: Ola $10,0 \mu M$ $2,3 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^4$, $p=0,0005$). Für Ruca wurde näherungsweise eine IC_{25} von $1,0 \mu M$ ermittelt (120 h: Ruca $1,0 \mu M$ $2,1 \times 10^5 \pm 4,1 \times 10^3$, $p=0,0001$). Für Nira konnte näherungsweise eine IC_{25} von $0,4 \mu M$ ermittelt werden (120 h: Nira $0,4 \mu M$ $2,2 \times 10^5 \pm 8,8 \times 10^3$, $p=0,0004$) (Abb. 5 A).

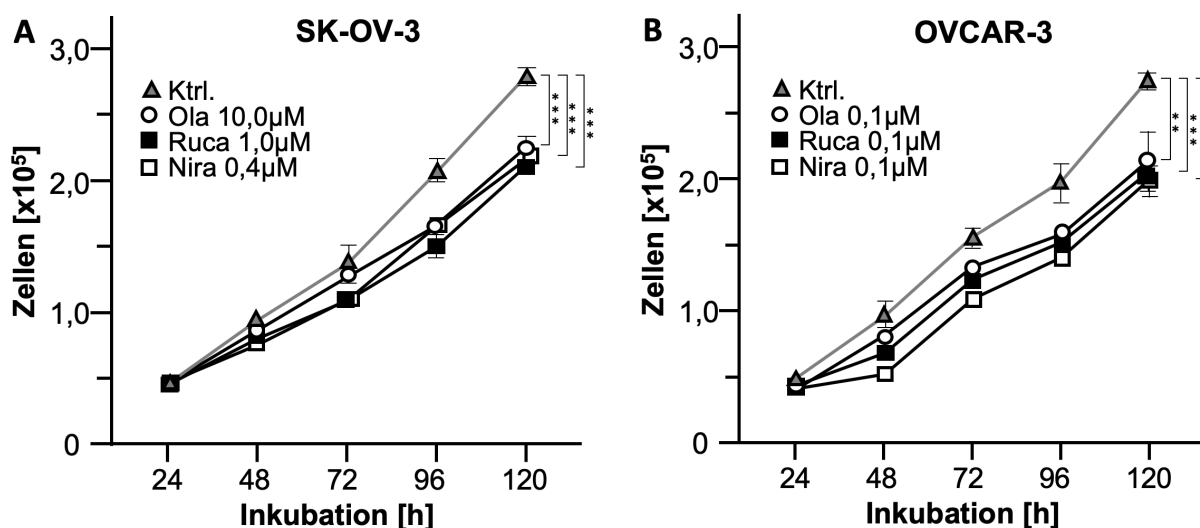


Abb. 5: Wachstumskinetik von SK-OV-3 (A) und OVCAR-3 (B) Zellen nach Inkubation mit den PARPi Ola, Ruca und Nira. Die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten werden als MW $\pm$ StAbw der absoluten Zellzahlen dargestellt. Die Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p < 0,0500$ (*), $p \leq 0,0100$ (**), $p \leq 0,0010$ (***) .

Nach 120 h Inkubation mit DMSO zeigte die Kontrollgruppe der OVCAR-3 Zelllinie eine durchschnittliche Zellzahl von $2,8 \times 10^5 \pm 2,6 \times 10^3$. Bei Verwendung des PARPi Ola konnte näherungsweise eine IC_{25} von $0,1 \mu M$ ermittelt werden (120 h: Ola $0,1 \mu M$ $2,2 \times 10^5 \pm 1,9 \times 10^3$, $p=0,0093$). Für Ruca konnte näherungsweise eine IC_{25} von $0,1 \mu M$ titriert werden (120 h: Ruca $0,1 \mu M$ $2,1 \times 10^5 \pm 7,5 \times 10^3$, $p=0,0000$). Eine IC_{25} von ungefähr $0,1 \mu M$ wurde für den PARPi Nira ermittelt. (120 h: Nira $0,1 \mu M$ $2,0 \times 10^5 \pm 1,7 \times 10^4$, $p=0,0002$) (*Abb. 5 B*).

3.3 Biologisch relevante Effekte von 445 nm Laserstrahlen im in vitro OC-Modellsystem

Im Folgenden wurden die Effekte der 445 nm Laserwellenlänge auf die OC-Zelllinien untersucht. Es wurden Veränderungen von Temperatur und pH-Wert des Zellkulturmediums analysiert. Dies ist von Relevanz, weil diese Faktoren einen erheblichen Einfluss auf Zellantworten wie das Wachstum und den Stoffwechsel haben können (Dewey, 2009), (Flinck et al., 2018). Des Weiteren wurde der Einfluss auf das Wachstum der Zellen des behandelten Wells betrachtet. Ein Wachstums-modifizierender Einfluss auf Zellen in angrenzenden Vertiefungen der Mikrotiterplatte konnte hingegen ausgeschlossen werden.

3.3.1 Thermische Effekte durch 445 nm Laserstrahlen

Durch die Absorption von Laserstrahlung im Gewebe entsteht Wärmeenergie und die Temperatur erhöht sich (Ansari et al., 2013). Insbesondere hinsichtlich eines potenziellen Einsatzes dieses Verfahrens bei Patientinnen, ist es wichtig, thermische Effekte zu charakterisieren. Ziel war es, ein Behandlungsfenster zu definieren, in welchem die Zellen und das Kulturmedium höchstens in einem hyperthermen Bereich erwärmt werden (bis $45,0 \text{ } ^\circ C$). In diesem Temperaturbereich kommt es bei kurzen Behandlungszeiten zu kaum irreversiblen Schäden des Gewebes (Dewey, 2009), (Fajardo, 1984). Außerdem sind antitumorale Effekte von Hyperthermie beschrieben (Zhou et al., 2011), (Manning et al., 1982).

Die Zellen wurden bis kurz vor der Behandlung bei $37,0 \text{ } ^\circ C$ inkubiert, waren jedoch während der Laserbehandlung der Raumtemperatur von ca. $20,0 \text{ } ^\circ C$ ausgesetzt. Daher wurden für die Temperaturcharakterisierung zwei Ansätze gewählt, einer mit der Starttemperatur von $37,0 \pm 0,5 \text{ } ^\circ C$ und der andere mit der Starttemperatur von $20,0 \pm 0,2 \text{ } ^\circ C$.

So konnte eine Aussage getroffen werden über die Temperaturänderungen im Medium während der Versuche.

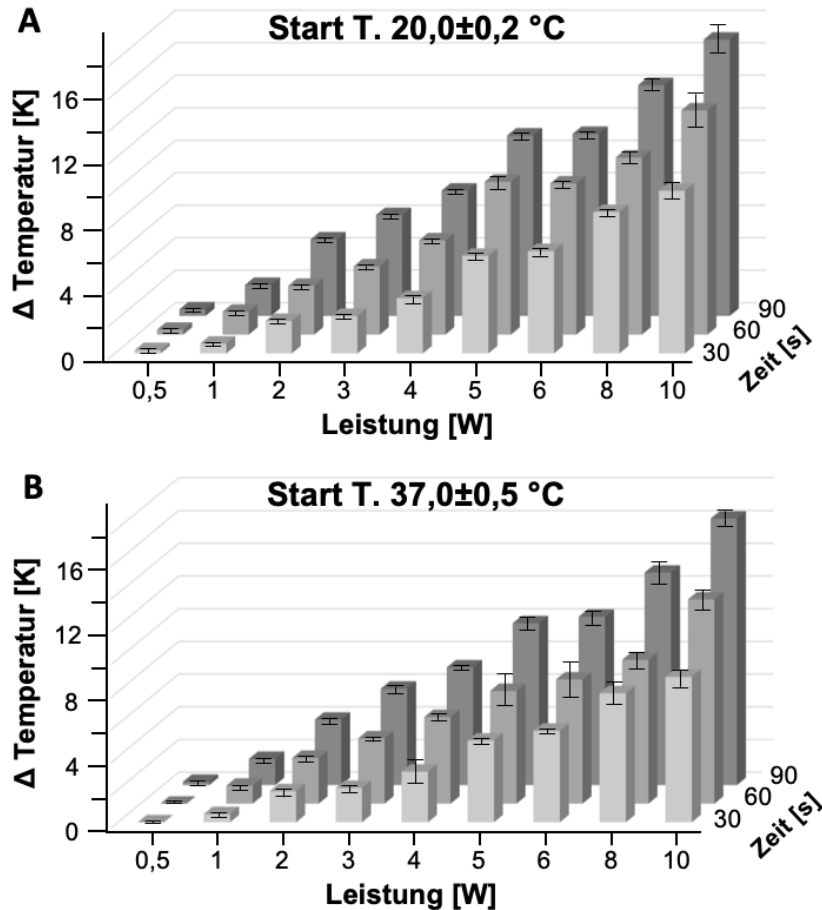


Abb. 6: Einfluss von 445 nm Laserstrahlen auf die Temperaturentwicklung im Zellkulturmedium bei einer Starttemperatur von $20,0 \pm 0,2$ °C (A) und $37,0 \pm 0,5$ °C (B). Die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten werden als MW $\pm$ StAbw der absoluten Zahlen dargestellt.

Die in Abbildung 6 abgebildeten Messwerte wurden mittels linearer Regression ausgewertet. Ausgehend von einer Ausgangstemperatur von $20,0 \pm 0,2$ °C führte eine 30 s Bestrahlung zu einem Temperaturanstieg von 1,1 K pro Watt Ausgangsleistung ($y = 1,1 \times \text{Leistung [W]} - 0,4$; $R^2 = 97,2$ %). Bei einer Ausgangstemperatur von $37,0 \pm 0,5$ °C führte dieselbe Bestrahlungsdauer zu einem vergleichbaren Temperaturanstieg von 1,0 K pro Watt ($y = 1 \times \text{Leistung [W]} - 0,4$; $R^2 = 95,5$ %).

60s Bestrahlungsdauer führten, ausgehend von $20,0 \pm 0,2$ °C, zu einem Anstieg der Temperatur von 1,4 K pro Watt ($y = 1,43 \times \text{Leistung [W]} + 0,2$; $R^2 = 94,8$ %). Bei einer

Starttemperatur von $37,0 \pm 0,5$ °C konnte ein Anstieg von 1,2 K pro Watt beobachtet werden ($y = 1,2 \times \text{Leistung [W]} - 0,0$; $R^2 = 93,4$ %).

Nach einer Exposition von 90 s Dauer konnte bei einer Initialtemperatur von $20,0 \pm 0,2$ °C eine Erwärmung von 1,7 K pro Watt erfasst werden ($y = 1,7 \times \text{Leistung [W]} + 0,7$; $R^2 = 96,7$ %). Ausgehend von $37,0 \pm 0,5$ °C wurde ein Temperaturanstieg von 1,6 K pro Watt detektiert ($y = 1,6 \times \text{Leistung [W]} + 0,5$; $R^2 = 96,3$ %).

3.3.2 pH-Wert Änderungen des Zellkulturmediums durch 445 nm Laserstrahlen

Es wurde untersucht, ob die Applikation von Laserstrahlen einen Einfluss auf den pH-Wert der Zellkulturmedien hat. Da sich die Zusammensetzung der Nährmedien der SK-OV-3 und OVCAR-3 Zelllinien unterscheiden, wurden beide individuell beurteilt.

Die Daten wurden mithilfe linearer Regression ausgewertet. Die Behandlung von SK-OV-3 Medium führte zu einer stärkeren Veränderung des pH-Wertes als die Behandlung von OVCAR-3 Medium.

Die 60s Bestrahlung von SK-OV-3 Medium mit dem Laser führten durchschnittlich zu einer Erniedrigung des pH-Wertes um -0,026 pro Watt Ausgangs-Laser-Leistung ($y = -0,026 \times \text{Leistung [W]} + 7,7$; $R^2 = 90,5$ %). Bei OVCAR-3 Medium konnte durchschnittlich eine Erniedrigung des pH-Wertes um -0,018 pro Watt Laser Leistung festgestellt werden ($y = 0,018 \times \text{Leistung [W]} + 7,8$; $R^2 = 84,7$ %).

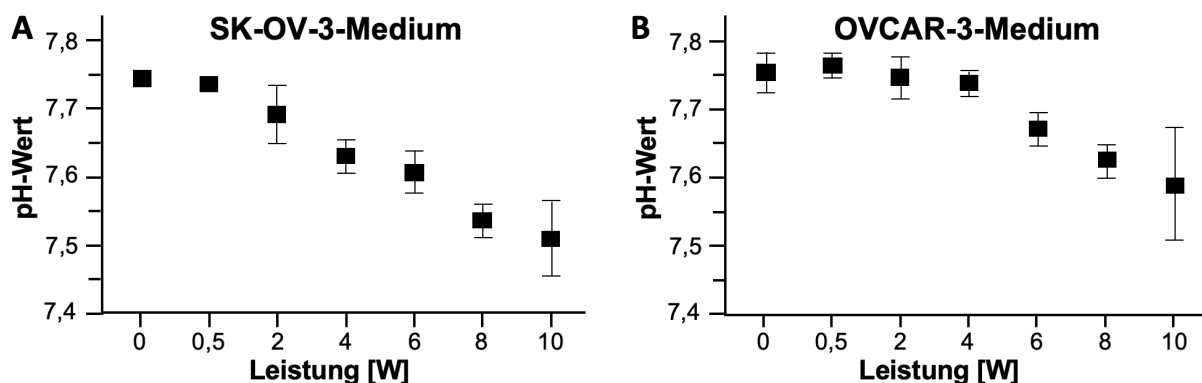


Abb. 7: Einfluss von 445 nm Laserstrahlen auf den pH-Wert der Zellkulturmedien von SK-OV-3 (A) und OVCAR-3 (B). Die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten werden als MW ± StAbw der absoluten Zahlen dargestellt.

3.3.3 Ausschluss eines Wachstums-inhibierenden Effektes auf Zellen in angrenzenden Vertiefungen der Mikrotiterplatte

In Vorversuchen zeigte sich ein wachstumsinhibierender Effekt der 445 nm Laserstrahlen. Da unklar war, ob sich der Effekt nur auf die Zellen des behandelten Wells beschränkt, wurden auch die Auswirkungen auf Zellen in benachbarten Wells untersucht. Mit diesem Experiment konnte schließlich gezeigt werden, dass sich der signifikant wachstumsinhibierende Effekt der Laserbehandlung auf das behandelte Well selber beschränkt. Angrenzende Wells unterschieden sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe, die nicht mit dem Laser in Kontakt kamen. Es wurden für die Laserbehandlung zwei verschiedene Einstellungen der Leistung und Zeit gewählt.

Zum einem wurde die maximale Ausgangsleistung des verwendeten Lasers von 10,0 W gewählt, über einen Behandlungszeitraum von 90 s ($331,6 \text{ J/cm}^2$). Die behandelten SK-OV-3 Zellen zeigten 120 h nach Laserkontakt einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu der Kontrollgruppe auf (120 h: Ktrl.: $2,4 \times 10^5 \pm 2,6 \times 10^4$; 90 s, 10,0 W: $4,9 \times 10^4 \pm 9,6 \times 10^3$, $p=0,0000$). Im Gegensatz dazu wiesen weder SK-OV-3-Zellen der ersten angrenzenden Reihe, noch der zweiten angrenzenden Reihe einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle auf (120 h: 1. Reihe: $2,1 \times 10^5 \pm 3,8 \times 10^4$, $p=0,0647$; 2. Reihe: $2,2 \times 10^5 \pm 2,8 \times 10^4$, $p=0,2230$) (*Abb. 8 A*). Vergleichbare Ergebnisse zeigte die OVCAR-3 Zelllinie. Die behandelten OVCAR-3 Zellen zeigten 120 h nach Laserbehandlung einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle (120 h: Ktrl.: $2,2 \times 10^5 \pm 4,0 \times 10^4$; 90 s, 10,0 W: $3,9 \times 10^4 \pm 2,7 \times 10^4$, $p=0,0000$). Ebenfalls wiesen weder OVCAR-3 Zellen der ersten angrenzenden Reihe, noch der zweiten angrenzenden Reihe einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle auf (120 h: 1. Reihe: $2,0 \times 10^5 \pm 2,7 \times 10^4$, $p=0,0747$; 2. Reihe: $2,1 \times 10^5 \pm 2,3 \times 10^4$, $p=0,2230$) (*Abb. 8 B*).

Reproduzierbare Ergebnisse zeigte der Versuch bei mittlerer Ausgangsleistung von 5,0 W und Behandlungsdauer von 60 s ($165,8 \text{ J/cm}^2$). Behandelte SK-OV-3 Zellen zeigten einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle, während Zellen der ersten und zweiten angrenzenden Reihe keinen signifikanten Unterschied aufwiesen (120 h: Ktrl.: $2,1 \times 10^5 \pm 1,2 \times 10^4$; 5,0 W, 60 s: $1,4 \times 10^5 \pm 1,8 \times 10^4$, $p=0,0001$; 1.Reihe: $2,0 \times 10^5 \pm 1,9 \times 10^4$, $p=0,0524$; 2.Reihe: $2,0 \times 10^5 \pm 2,3 \times 10^4$, $p=0,1510$) (*Abb. 8 C*). Ebenfalls wiesen behandelte OVCAR-3 Zellen einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle auf, während Zellen der ersten und zweiten angrenzenden Reihe keinen signifikanten Unterschied aufwiesen (120 h: Ktrl.:

$2,4 \times 10^5 \pm 3,1 \times 10^4$; 5,0 W, 60 s: $1,4 \times 10^5 \pm 2,0 \times 10^4$, $p=0,0001$; 1.Reihe: $2,3 \times 10^5 \pm 2,4 \times 10^4$, $p=0,1810$; 2.Reihe: $2,3 \times 10^5 \pm 2,6 \times 10^4$, $p=0,1770$) (Abb. 8 D).

Somit konnte gezeigt werden, dass die Laserstrahlen sich nicht auf das Zellwachstum der angrenzenden Wells auswirkten.

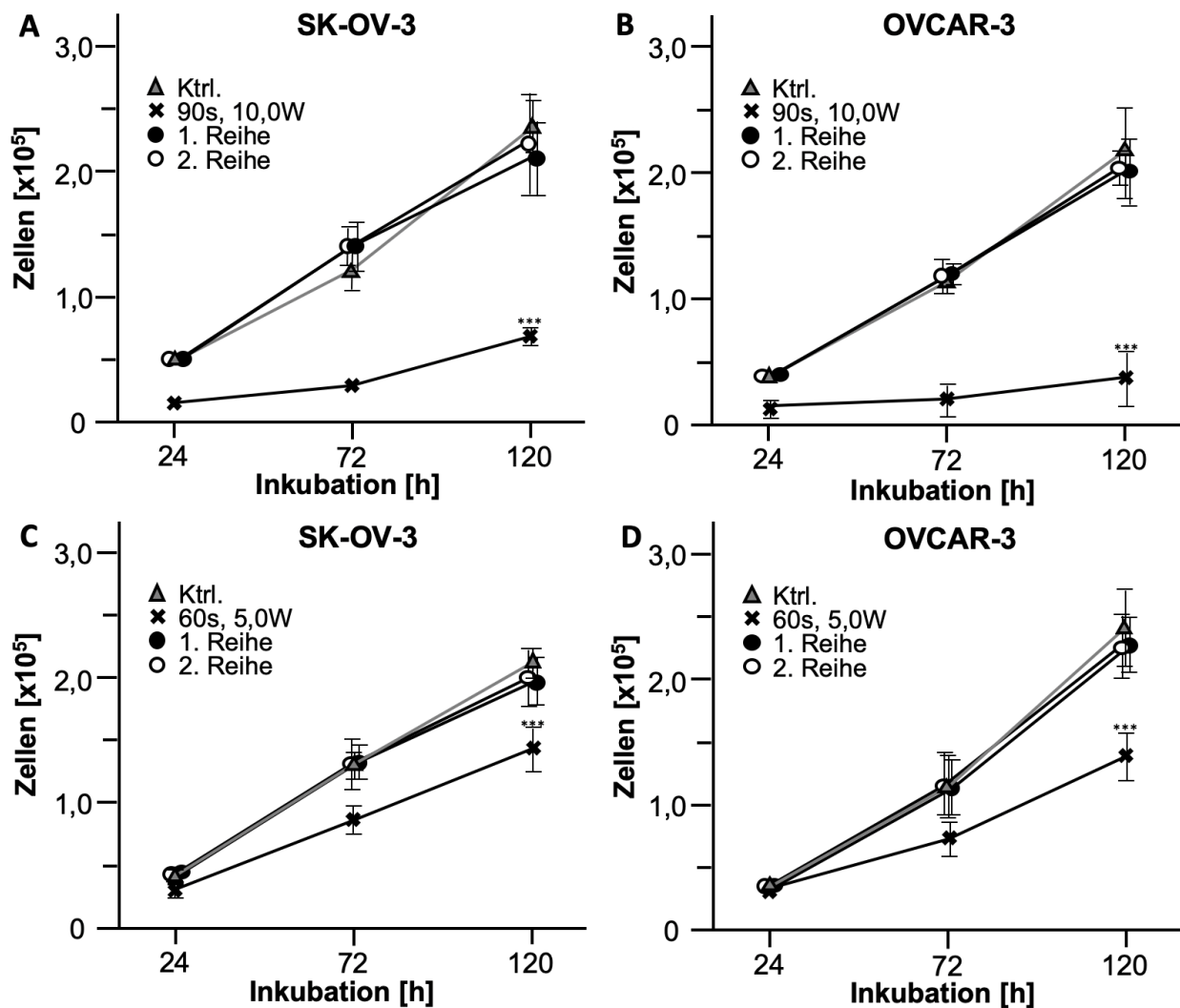


Abb. 8: Wachstumskinetik von SK-OV-3 (A, C) und OVCAR-3 Zellen (B, D). Ausschluss eines wachstumsinhibierenden Effektes der 445 nm Laserstrahlen (30 s, 10,0 W und 5,0 W) auf angrenzende Wells. Die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten werden als MW $\pm$ StAbw der absoluten Zellzahlen dargestellt. Die Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p < 0,0500$ (*), $p \leq 0,0100$ (**), $p \leq 0,0010$ (***)

3.4 Wachstumsinhibition der Zelllinien nach Laserbehandlung

Um die Wirkung von Laserbehandlungen auf das Wachstum der beiden Ovarialkarzinom-Zelllinien zu untersuchen, wurden die Zellzahlen der beiden Zelllinien nach drei verschiedenen Inkubationszeiten (24 h, 72 h, 120 h) nach der Laserbehandlung gemessen.

Dabei wurden verschiedene Laserparameter verwendet. Die Laserleistung wurde eingestellt auf 0,5 W (minimale Leistung des verwendeten Lasers), 2,0 W, 4,0 W, 6,0 W, 8,0 W und 10,0 W (maximale Leistung des verwendeten Lasers). Die Behandlungsdauer betrug jeweils 30 s, 60 s und 90 s. Das entspricht einer minimal applizierten Dosis von $5,5 \text{ J/cm}^2$ (30 s, 0,5 W) und einer maximal applizierten Dosis von $331,6 \text{ J/cm}^2$ (90 s, 10,0 W).

Bei jeder der verwendeten Einstellungen war eine Wachstumsinhibierung zu beobachten (Abb. 9 A-F). Die Analyse der Zellzahlen 120 h nach der Laserbehandlung zeigte einen linearen Zusammenhang zwischen Strahlendosis und Wachstumsinhibierung. Um den genauen Zusammenhang zu analysieren wurde eine lineare Regression für die Messdaten nach 120 h durchgeführt.

Für SK-OV-3 Zellen 120 h nach 30 s Laser Applikation lässt sich für die Regressionsgerade eine Gleichung von $y = -8,4 \times 10^3 \times \text{Leistung [W]} + 2,3 \times 10^5$ mit $R^2 = 89,3 \%$ aufstellen. Das heißt, dass jede Erhöhung der Laserleistung um 1,0 W in einer durchschnittlichen Wachstumsinhibierung von 3,4 % im Vergleich zur Kontrolle resultiert. (SK-OV-3 30 s 120 h: Ktrl. $2,5 \times 10^5 \pm 8,5 \times 10^3$; 0,5 W $2,2 \times 10^5 \pm 7,9 \times 10^3$; 2,0 W: $2,0 \times 10^5 \pm 9,7 \times 10^3$; 4,0 W $1,8 \times 10^5 \pm 5,7 \times 10^3$; 6,0 W $1,7 \times 10^5 \pm 1,6 \times 10^3$; 8,0 W $1,6 \times 10^5 \pm 4,9 \times 10^3$; 10,0 W $1,4 \times 10^5 \pm 7,5 \times 10^3$) (Abb. 9 A). OVCAR-3-Zellen reagierten 120 h nach 30 s Laser Applikation mit einer durchschnittlichen Wachstumsinhibierung von 3,0 % im Vergleich zur Kontrollgruppe pro Erhöhung der Laserleistung um 1,0 W ($y = -7,8 \times 10^3 \times \text{Leistung [W]} + 2,6 \times 10^5$; $R^2 = 84,2 \%$) (OVCAR-3 30 s 120 h: Ktrl. $2,6 \times 10^5 \pm 2,0 \times 10^3$; 0,5 W $2,4 \times 10^5 \pm 1,4 \times 10^4$; 2,0 W $2,2 \times 10^5 \pm 5,2 \times 10^3$; 4,0 W $2,1 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^4$; 6,0 W $2,0 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^4$; 8,0 W $1,9 \times 10^5 \pm 2,5 \times 10^3$; 10,0 W $1,7 \times 10^5 \pm 4,5 \times 10^3$) (Abb. 9 B).

120 h nach der 60 s Laser-Behandlung von SK-OV-3 Zellen zeigte sich eine durchschnittliche Reduktion des Zellwachstums um 6,1 % bei jeder Erhöhung der Laserleistung um 1,0 W ($y = -1,7 \times 10^4 \times \text{Leistung [W]} + 2,8 \times 10^5$; $R^2 = 92,8 \%$) (SK-OV-3 60 s 120 h: Ktrl. $2,9 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^4$; 0,5 W $2,5 \times 10^5 \pm 2,7 \times 10^3$; 2,0 W $2,4 \times 10^5 \pm 2,2 \times 10^4$; 4,0 W

$2,1 \times 10^5 \pm 1,4 \times 10^4$; 6,0 W $1,6 \times 10^5 \pm 2,3 \times 10^4$; 8,0 W $1,3 \times 10^5 \pm 1,6 \times 10^4$; 10,0 W $1,1 \times 10^5 \pm 9,6 \times 10^3$) (Abb. 8 C). OVCAR-3 Zellen zeigten bei gleichen Laser-Parametern eine mittlere Wachstumsinhibierung von 6,8 % pro Erhöhung der Laserleistung um 1,0 W ($y = -1,8 \times 10^4 \times \text{Leistung [W]} + 2,6 \times 10^5$; $R^2 = 97,2 \%$). (OVCAR-3 60 s 120 h: Ktrl. $2,7 \times 10^5 \pm 1,5 \times 10^4$; 0,5 W $2,4 \times 10^5 \pm 6,0 \times 10^3$; 2,0 W $2,3 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^4$; 4,0 W $1,9 \times 10^5 \pm 1,3 \times 10^4$; 6,0 W $1,4 \times 10^5 \pm 8,2 \times 10^3$; 8,0 W $1,1 \times 10^5 \pm 1,4 \times 10^4$; 10,0 W $8,5 \times 10^4 \pm 2,7 \times 10^3$) (Abb. 9 D).

120 h nach 90 s Laser-Behandlung der SK-OV-3 Zelllinie zeigte sich eine durchschnittliche Inhibition des Zellwachstums um 8,0 % bei jeder Erhöhung der Laserleistung um 1,0 W ($y = -2 \times 10^4 \times \text{Leistung [W]} + 2,2 \times 10^5$; $R^2 = 95,1 \%$). (SK-OV-3 90 s 120 h: Ktrl. $2,4 \times 10^5 \pm 5,5 \times 10^3$; 0,5 W $2,1 \times 10^5 \pm 1,9 \times 10^4$; 2,0 W $1,7 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^4$; 4,0 W $1,5 \times 10^5 \pm 1,2 \times 10^4$; 6,0 W $8,7 \times 10^4 \pm 1,4 \times 10^4$; 8,0 W $6,7 \times 10^4 \pm 1,4 \times 10^4$; 10,0 W $3,5 \times 10^4 \pm 1,0 \times 10^4$) (Abb. 9 E). OVCAR-3-Zellen reagierten bei gleichen Laser-Parametern mit einer Reduktion des Zellwachstums um 9,3 % bei jeder Erhöhung der Laserleistung um 1,0 W ($y = -2,4 \times 10^4 \times \text{Leistung [W]} + 2,2 \times 10^5$; $R^2 = 93,2 \%$). (OVCAR-3 90 s 120 h: Ktrl. $2,5 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^4$; 0,5 W $2,0 \times 10^5 \pm 8,0 \times 10^3$; 2,0 W $1,8 \times 10^5 \pm 3,6 \times 10^3$; 4,0 W $1,0 \times 10^5 \pm 9,0 \times 10^3$; 6,0 W $5,0 \times 10^4 \pm 1,2 \times 10^4$; 8,0 W $3,9 \times 10^4 \pm 3,3 \times 10^3$; 10,0 W $1,4 \times 10^4 \pm 7,6 \times 10^3$) (Abb. 9 F).

Für den folgenden Kernversuch dieser Arbeit wurden Laserparameter ausgewählt, die eine inhibitorische Wirkung des Zellwachstums von bis zu 25 % im Vergleich zur Kontrollgruppe bewirkten. Als Laser-Behandlungszeit wurden 60 s gewählt und als Leistungen 2,0 W, 3,0 W und 4,0 W.

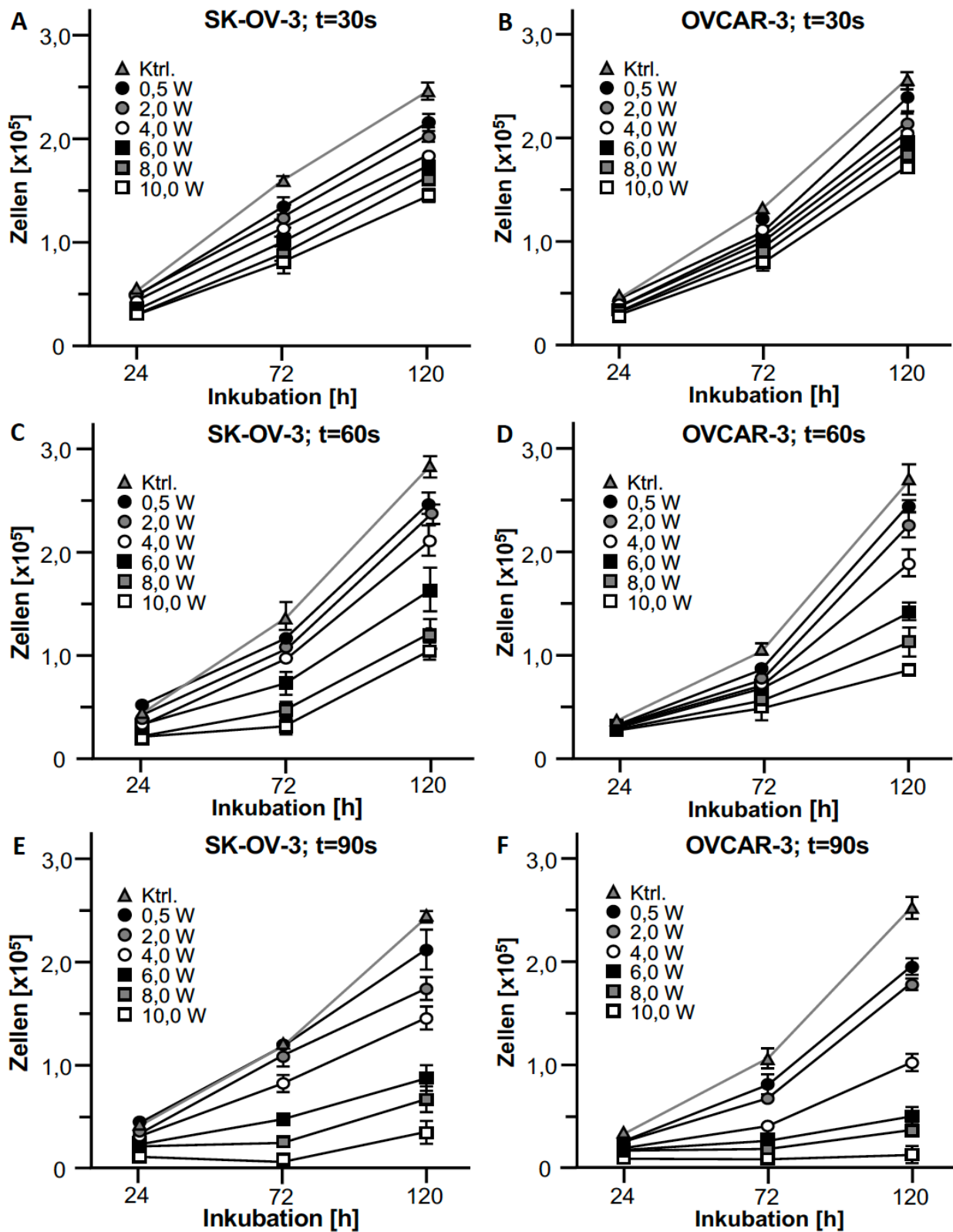


Abb. 9: Wachstumskinetiken von SK-OV-3 (A, C, E) und OVCAR-3 Zellen (B, D, F) nach Laserbehandlung über 30 s, 60 s und 90 s. Die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten werden als MW $\pm$ StAbw der absoluten Zellzahlen dargestellt.

3.5 Kombination von PARPi und Laserbehandlung

Das Kernstück des vorliegenden Forschungsprojektes war die Kombination der Laserbestrahlung mit den PARPi. In diesem Projektteil wurden OC-Zellen mit Laser bestrahlt und für 120 h mit einem PARPi inkubiert (Laser + Ola/ Ruca/ Nira). Zu erwarten war, dass die Kombination von Laser und PARPi additive Effekte zeigen würde. Tatsächlich ließen sich teils sogar potenzierte Effekte bei kombinierter Behandlung nachweisen. Für diesen Versuchsteil wurden die zuvor titrierten Konzentrationen der drei PARPi, sowie eine Laser-Behandlungsdauer von 60 s bei einer Leistung von 2,0 W ($44,2 \text{ J/cm}^2$), 3,0 W ($66,3 \text{ J/cm}^2$) und 4,0 W ($88,4 \text{ J/cm}^2$) verwendet. Für die kombinierte Behandlung wurde außerdem untersucht, ob ein signifikanter Unterschied besteht zwischen sequentieller Behandlung und simultaner Behandlung. Von additiv wird gesprochen, wenn sich die Einzeleffekte addieren, d. h. die Wirkung der kombinierten Behandlung der Summe der Einzelwirkungen entspricht. Hierbei wird eine Abweichung von bis zu $<5,0 \%$ im Vergleich zur Kontrolle akzeptiert. Als potenziert wird ein Ergebnis gewertet, wenn der Effekt der Kombination größer ist, als es aufgrund der Addition der Einzeleffekte zu erwarten gewesen wäre. Für die Einordnung als Potenzierung muss die kombinierte Behandlung mindestens eine mittlere Wachstumsinhibition von $\geq 5,0 \%$ (orientiert an der Kontrollgruppe) aufweisen im Vergleich zu den addierten Einzelwirkungen. Betrachtet werden hier die Messergebnisse 120 h nach Behandlung.

Bei kombinierter Behandlung von SK-OV-3 Zellen mit dem PARPi Ola und Laser war bei allen drei verwendeten Leistungen des Lasers eine additive Wirkung zu verzeichnen (*Abb. 10 A, C, E*). Bei der Verwendung der Laserleistung 4,0 W zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen sequentieller und simultaner Behandlung ($p=0,0292$). Bei den Leistungen 2,0 W und 3,0 W ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kombinationen feststellen. (SK-OV-3 120 h: Ktrl. $2,6 \times 10^5 \pm 7,8 \times 10^3$; Ola $10,0 \mu\text{M}$ $2,1 \times 10^5 \pm 9,1 \times 10^3$, $p=0,0001$; 60 s, 2,0 W $2,2 \times 10^5 \pm 8,1 \times 10^3$, $p=0,0163$; 60 s, 2,0 W seq. $1,7 \times 10^5 \pm 1,2 \times 10^4$, $p=0,0001$; 60 s, 2,0 W sim. $1,8 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^4$, $p=0,0000$; 60 s, 3,0 W $2,0 \times 10^5 \pm 5,0 \times 10^3$, $p=0,0481$; 60 s, 3,0 W seq. $1,6 \times 10^5 \pm 1,7 \times 10^4$, $p=0,0001$; 60 s, 3,0 W sim. $1,5 \times 10^5 \pm 7,2 \times 10^3$, $p=0,0000$; 60 s, 4,0 W $1,9 \times 10^5 \pm 1,2 \times 10^4$, $p=0,0187$; 60 s, 4,0 W seq. $1,5 \times 10^5 \pm 1,7 \times 10^4$, $p=0,0001$; 60 s, 4,0 W sim. $1,3 \times 10^5 \pm 6,2 \times 10^3$, $p=0,0000$)

Ebenso war bei kombinierter Behandlung von OVCAR-3 Zellen mit Ola und Laser bei den drei verwendeten Laser-Leistungen ein additiver Effekt detektierbar (*Abb. 10 B, D, F*). Zwischen sequentieller und simultaner Behandlung ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen. (OVCAR-3 120 h: Ktrl. $2,8 \times 10^5 \pm 1,8 \times 10^4$; Ola 0,1 μM $2,0 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^4$, $p=0,0004$; 60 s, 2,0 W $2,4 \times 10^5 \pm 2,3 \times 10^4$, $p=0,0325$; 60 s, 2,0 W seq. $1,6 \times 10^5 \pm 2,16 \times 10^4$, $p=0,0009$; 60 s, 2,0 W sim. $1,7 \times 10^5 \pm 2,6 \times 10^4$, $p=0,0023$; 60 s, 3,0 W $2,1 \times 10^5 \pm 1,2 \times 10^4$, $p=0,0006$; 60 s, 3,0 W seq. $1,4 \times 10^5 \pm 2,7 \times 10^4$, $p=0,0015$; 60 s, 3,0 W sim. $1,4 \times 10^5 \pm 1,8 \times 10^4$, $p=0,0001$; 60 s, 4,0 W $1,8 \times 10^5 \pm 1,9 \times 10^4$, $p=0,0008$; 60 s, 4,0 W seq. $1,2 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^4$, $p=0,0000$; 60 s, 4,0 W sim. $1,2 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^4$, $p=0,0000$)

Auch bei kombinierter Behandlung von SK-OV-3 Zellen mit dem PARPi Ruca und Laser ließ sich ein additiver Effekt bei allen drei Laser-Leistungen feststellen (*Abb. 11 A, C, E*). Ein signifikanter Unterschied zwischen sequentieller und simultaner Behandlung ließ sich nicht feststellen. (SK-OV-3 120 h: Ktrl. $2,8 \times 10^5 \pm 1,5 \times 10^4$; Ruca 1,0 μM $2,3 \times 10^5 \pm 1,2 \times 10^4$, $p=0,0021$; 60 s, 2,0 W $2,5 \times 10^5 \pm 4,8 \times 10^3$, $p=0,0053$; 60 s, 2,0 W seq. $2,0 \times 10^5 \pm 7,6 \times 10^3$, $p=0,0001$; 60 s, 2,0 W sim. $2,0 \times 10^5 \pm 1,4 \times 10^4$, $p=0,0002$; 60 s, 3,0 W $2,3 \times 10^5 \pm 9,3 \times 10^3$, $p=0,0008$; 60 s, 3,0 W seq. $1,8 \times 10^5 \pm 8,6 \times 10^3$, $p=0,0000$; 60 s, 3,0 W sim. $1,7 \times 10^5 \pm 9,1 \times 10^3$, $p=0,0000$; 60 s, 4,0 W $2,1 \times 10^5 \pm 9,1 \times 10^3$, $p=0,0002$; 60 s, 4,0 W seq. $1,6 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^4$, $p=0,0000$; 60 s, 4,0 W sim. $1,6 \times 10^5 \pm 1,2 \times 10^4$, $p=0,0000$)

OVCAR-3 Zellen reagierten bei kombinierter Behandlung mit Ruca und Laser additiv bis potenziert. Bei Applikation von 2,0 W Laserleistung zeigte die sequentielle kombinierte Behandlung einen additiven Effekt, wohingegen die simultane Behandlung einen potenzierten Effekt zeigte (*Abb. 11 B*). Zwischen sequentieller und simultaner Behandlung ließ sich ein signifikanter Unterschied feststellen ($p=0,0052$). Auch bei Applikation von 3,0 W konnte bei sequentieller Behandlung eine additive Wirkung und bei simultaner Behandlung eine potenzierte Wirkung detektiert werden (*Abb. 11 D*). Der Unterschied war ebenfalls signifikant ($p=0,0219$). Bei Anwendung von 4,0 W konnte für beide kombinierte Behandlungsverfahren eine potenzierte Wirkung nachgewiesen werden (*Abb. 11 F*). Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Verfahren bestand nicht. (OVCAR-3 120 h: Ktrl. $2,9 \times 10^5 \pm 1,5 \times 10^4$; Ruca 0,1 μM $2,1 \times 10^5 \pm 8,66 \times 10^3$, $p=0,0011$; 60 s, 2,0 W $2,6 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^4$, $p=0,0153$; 60 s, 2,0 W seq. $1,8 \times 10^5 \pm 7,6 \times 10^3$, $p=0,0007$; 60 s, 2,0 W

sim. $1,4 \times 10^5 \pm 1,2 \times 10^4$, $p=0,0001$; 60 s, 3,0 W $2,4 \times 10^5 \pm 2,1 \times 10^4$, $p=0,0112$; 60 s, 3,0 W seq. $1,4 \times 10^5 \pm 3,3 \times 10^3$, $p=0,0010$; 60 s, 3,0 W sim. $1,1 \times 10^5 \pm 1,0 \times 10^4$, $p=0,0001$; 60 s, 4,0 W $2,2 \times 10^5 \pm 6,3 \times 10^3$, $p=0,0025$; 60 s, 4,0 W seq. $1,1 \times 10^5 \pm 1,9 \times 10^4$, $p=0,0001$; 60 s, 4,0 W sim. $8,1 \times 10^4 \pm 4,7 \times 10^3$, $p=0,0003$)

SK-OV-3 Zellen zeigten bei kombinierter Behandlung von Nira und Laser deutlich geringer ausgeprägte Effekte. Die Verwendung von 2,0 W führte bei kombinierter Behandlung nicht zu additiven Effekten (*Abb. 12 A*). Bei Anwendung von 3,0 W erzielte die sequentielle Kombination ebenfalls keine additive Wirkung (*Abb. 12 C*). Die simultane Kombination erzielte einen Effekt, der tendenziell als additiv zu werten ist. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Varianten bestand nicht. Die Applikation von 4,0 W führte sowohl bei sequentieller als auch bei simultaner Kombination zu additiven Effekten (*Abb. 11 E*). Zwischen den beiden Varianten war ein signifikanter Unterschied zu beobachten ($p=0,0166$). (SK-OV-3 120 h: Ktrl. $2,8 \times 10^5 \pm 1,9 \times 10^4$; Nira 0,4 μM $2,2 \times 10^5 \pm 5,5 \times 10^3$, $p=0,0034$; 60 s, 2,0 W $2,5 \times 10^5 \pm 2,3 \times 10^3$, $p=0,0549$; 60 s, 2,0 W seq. $2,1 \times 10^5 \pm 9,5 \times 10^3$, $p=0,0012$; 60 s, 2,0 W sim. $2,1 \times 10^5 \pm 5,1 \times 10^3$, $p=0,0020$; 60 s, 3,0 W $2,3 \times 10^5 \pm 3,5 \times 10^3$, $p=0,0065$; 60 s, 3,0 W seq. $2,0 \times 10^5 \pm 1,2 \times 10^4$, $p=0,0005$; 60 s, 3,0 W sim. $1,9 \times 10^5 \pm 1,4 \times 10^4$, $p=0,0003$; 60 s, 4,0 W $2,2 \times 10^5 \pm 1,2 \times 10^4$, $p=0,0015$; 60 s, 4,0 W seq. $1,7 \times 10^5 \pm 4,4 \times 10^3$, $p=0,0004$; 60 s, 4,0 W sim. $1,6 \times 10^5 \pm 3,0 \times 10^3$, $p=0,0004$)

OVCAR-3 Zellen reagierten bei kombinierter Behandlung mit Nira und Laser bei allen drei Leistungen mit potenzierten Wirkungen (*Abb. 12 B, D, F*). Ein signifikanter Unterschied zwischen sequentieller und simultaner Kombination bestand nicht. (OVCAR-3 120 h: Ktrl. $2,9 \times 10^5 \pm 4,8 \times 10^3$; Nira 0,1 μM $2,2 \times 10^5 \pm 8,8 \times 10^3$, $p=0,0005$; 60 s, 2,0 W $2,5 \times 10^5 \pm 1,6 \times 10^4$, $p=0,0206$; 60 s, 2,0 W seq. $1,4 \times 10^5 \pm 9,6 \times 10^3$, $p=0,0001$; 60 s, 2,0 W sim. $1,1 \times 10^5 \pm 1,9 \times 10^4$, $p=0,0012$; 60 s, 3,0 W $2,3 \times 10^5 \pm 1,7 \times 10^4$, $p=0,0095$; 60 s, 3,0 W seq. $1,1 \times 10^5 \pm 5,6 \times 10^3$, $p=0,0011$; 60 s, 3,0 W sim. $9,4 \times 10^4 \pm 2,1 \times 10^4$, $p=0,0012$; 60 s, 4,0 W $2,1 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^4$, $p=0,0008$; 60 s, 4,0 W seq. $8,9 \times 10^4 \pm 2,0 \times 10^4$, $p=0,0008$; 60 s, 4,0 W sim. $8,1 \times 10^4 \pm 1,8 \times 10^4$, $p=0,0006$)

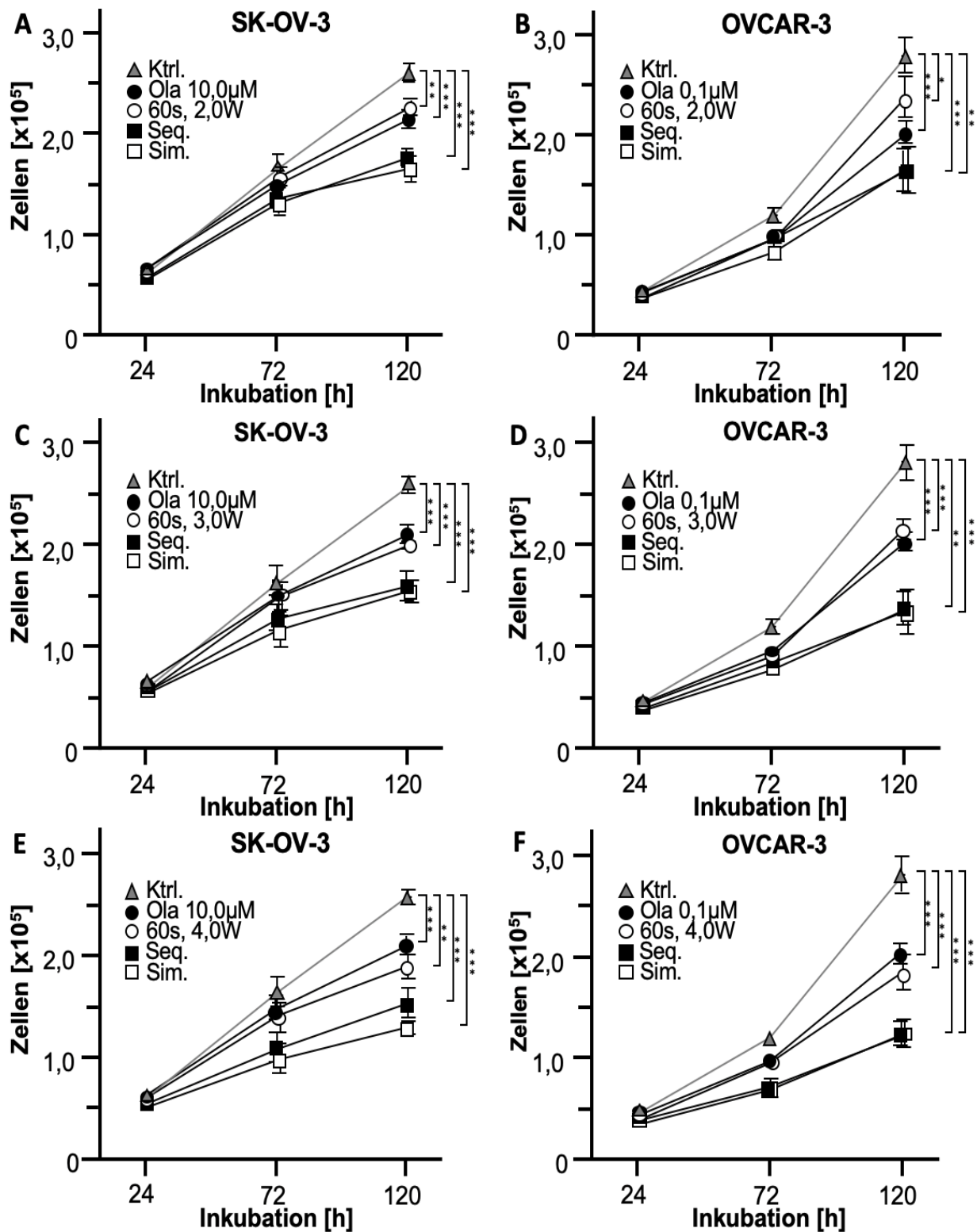


Abb. 10: Wachstumskinetik von SK-OV-3 (A, C, E) und OVCAR-3 Zellen (B, D, F) bei kombinierter Behandlung mit Laser (60 s, 2,0 W, 3,0 W und 4,0 W) und Ola. Die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten werden als MW ± StAbw der absoluten Zellzahlen dargestellt. Die Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet $p < 0,0500$ (*), $p \leq 0,0100$ (**), $p \leq 0,0010$ (***)

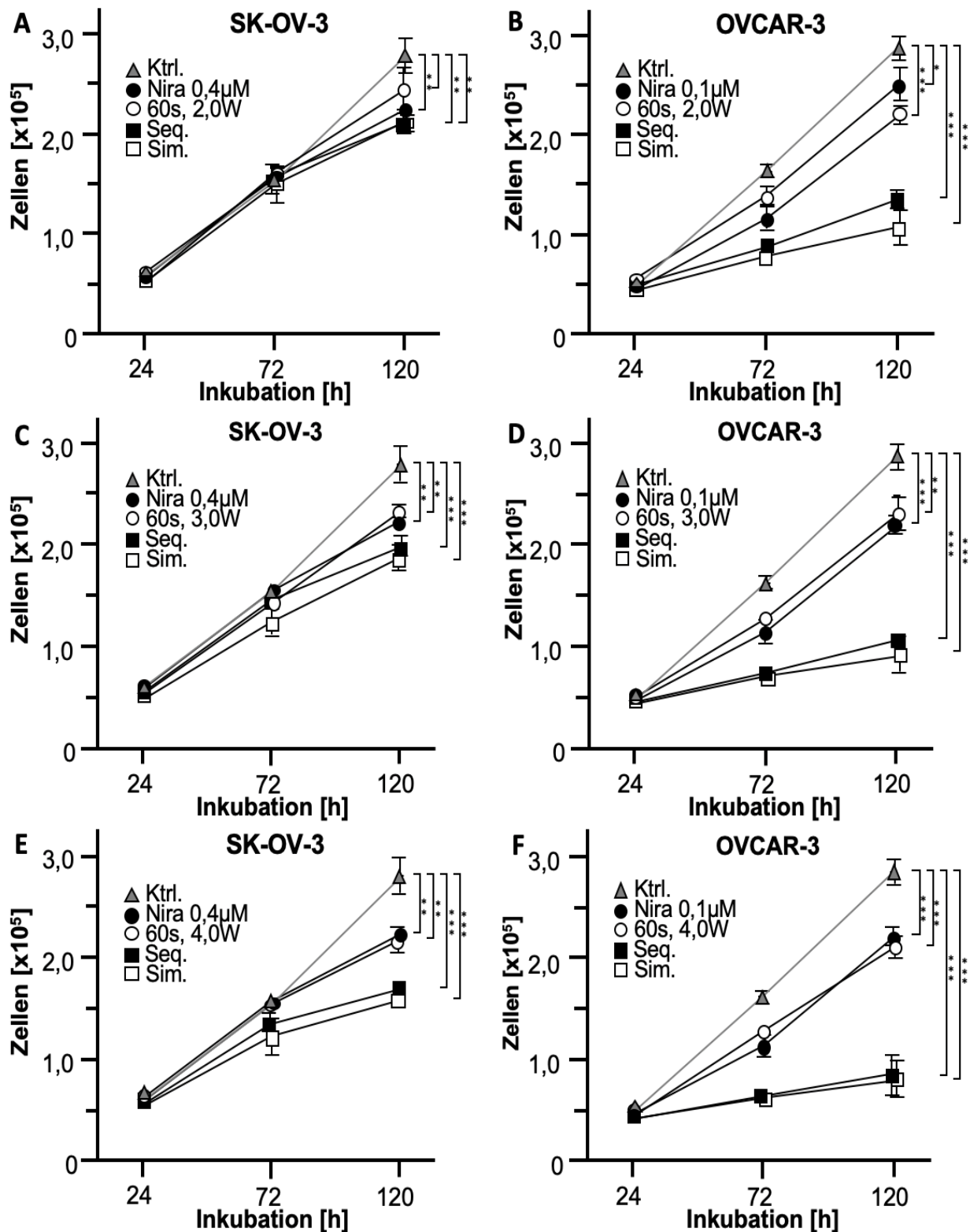


Abb. 11: Wachstumskinetik von SK-OV-3 (A, C, E) und OVCAR-3 Zellen (B, D, F) bei kombinierter Behandlung mit Laser (60 s, 2,0 W, 3,0 W, und 4,0 W) und Nira. Die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten werden als MW ± StAbw der absoluten Zellzahlen dargestellt. Die Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p < 0,0500$ (*), $p < 0,0100$ (**), $p < 0,0010$ (***)).

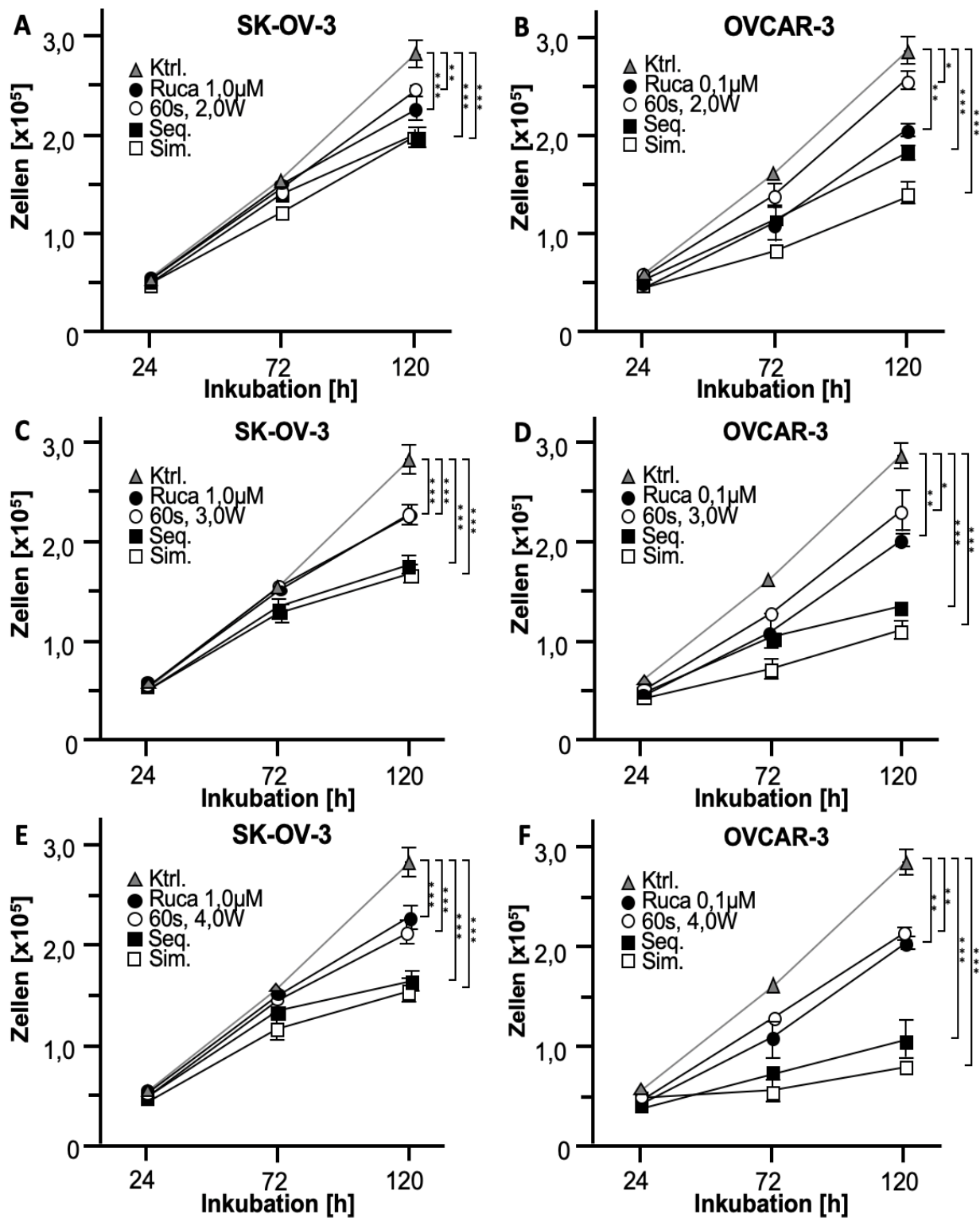


Abb. 12: Wachstumskinetik von SK-OV-3 (A, C, E) und OVCAR-3 Zellen (B, D, E) bei kombinierter Behandlung mit Laser (60 s, 2,0 W, 3,0 W und 4,0 W) und Ruca. Die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten werden als MW $\pm$ StAbw der absoluten Zellzahlen dargestellt. Die Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p < 0,0500$ (*), $p < 0,0100$ (**), $p < 0,0010$ (***)

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die antiproliferative Wirksamkeit des kombinierten Einsatzes von Laser mit der Wellenlänge 445 nm und den PARPi Ola, Ruca und Nira im OC-Zellmodell zu untersuchen.

Die Verwendung etablierter, permanenter Zelllinien bot den Vorteil der Vergleichbarkeit der Ergebnisse und der Unabhängigkeit von Gewebespendern. Um eine standardisierte Bestrahlung während der Laserbehandlung sicherzustellen, wurde eine XYZ-computerisierte Linear-Verschiebeeinheit in Verbindung mit einem festen Strahlenaustrittsfenster (Lichtleitfaser) des Lasers verwendet. Die Austrocknung der Zellproben wurde während der Behandlung durch die Zugabe von 300 µl Zellkulturmedium pro Well und das Schließen des Mikrotiterplatten-Deckels verhindert. Die verwendeten Zellkulturmedien enthielten Phenolrot. Die Absorptionseigenschaften von Phenolrot hängen sowohl von der Wellenlänge als auch vom pH-Wert ab. Bei der verwendeten Wellenlänge von 445 nm ist die Absorption jedoch weitgehend pH-unabhängig und liegt im mittleren Bereich des Absorptionsspektrums (Xu et al., 2006).

Um die tatsächliche Leistung zu bestimmen, die auf die Zellen wirkte, wurden Messungen mit einem Laser-Leistungs-Messgerät durchgeführt. Dies war notwendig, da sich der Zellrasen 41,7 mm vom Strahlenausgang des Lasers entfernt befand und sowohl der Mikrotiterplatten-Deckel als auch das Zellkulturmedium im Strahlengang lagen. Die Bestimmung dieser tatsächlichen Leistung war jedoch nur annähernd möglich, da zwei Faktoren berücksichtigt werden mussten. Zum einen mussten die Messungen mit dem Zellkulturmedium auch in Anwesenheit des Bodens der Mikrotiterplatte geschehen. Dieser hatte im normalen Versuchsaufbau keinen Einfluss auf die tatsächliche Leistung, da sich der Zellrasen oberhalb befand. Zum anderen befand sich, bedingt durch die konkave Form des Detektors, eine zusätzliche Luft-Schicht unterhalb des Mikrotiterplatten-Bodens. Diese Faktoren wurden bestmöglich in die Berechnung der tatsächlichen Leistung mit einbezogen. Dennoch kam es an den zusätzlichen Materialien und Grenzflächen zu Effekten wie Reflektion, Lichtbrechung und Absorption, die das Ergebnis möglicherweise beeinflusst haben. Da es sich hierbei um einen systematischen Fehler handelt ist aber die Vergleichbarkeit der Versuche untereinander gewährleistet.

Da auch im eigentlichen Versuchsaufbau Reflektion und Streuung der Laserstrahlen zu erwarten waren, musste ein signifikanter wachstumsinhibierender Effekt auf Zellen in benachbarte Wells ausgeschlossen werden. Dies konnte durch den entsprechenden Versuch nachgewiesen werden.

So wurde ein geeignetes in vitro Modell zu Untersuchung der biologischen Effekte von 445 nm Laserstrahlen etabliert.

4.1 Titration der PARPi

Es konnte festgestellt werden, dass OVCAR-3 Zellen sensibler auf die Behandlung mit den PARPi reagierten als SK-OV-3 Zellen. Bei allen drei PARPi wurde eine deutlich niedrigere Konzentration benötigt, um die gewünschte Wachstumsinhibierung (IC_{25}) zu erreichen.

Beide Zelllinien, SK-OV-3 und OVCAR-3, besitzen die BRCA1/2-Wildtyp Sequenz (Hills et al., 1989; Stordal et al., 2013). Allerdings weist OVCAR-3 einen Verlust der Heterozygotie in BRCA1 und 2 auf (Stordal et al., 2013), zusammen mit weiteren Veränderungen in Genen, die die homologe Rekombination (HR) beeinflussen, was zu einem funktionellen Verlust der HR führt (Bradbury et al., 2020). Zelllinien mit einem BRCA1/2-Wildtyp, die aber einen Verlust der Heterozygotie aufweisen, zeigen ein besseres Ansprechen auf Platin-basierte Therapien und diese Empfindlichkeit sei auch auf PARPi übertragbar (Maxwell et al., 2017). OVCAR-3 zeigte in früheren Studien sogar die gleiche Empfindlichkeit gegenüber PARPi wie Zelllinien mit bekannten BRCA-Mutationen (Bradbury et al., 2020).

Besonders deutlich war der Konzentrationsunterschied bei Ola, wobei SK-OV-3 Zellen eine 100-fach höhere Konzentration benötigten als OVCAR-3 Zellen. Ola ist klinisch nur bei nachgewiesener homologer Rekombinationsdefizienz (HRD) zugelassen, was durch BRCA1/2-Mutationen oder genomische Instabilität definiert ist (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022). Dennoch belegten frühere in-vitro-Studien die Wirksamkeit von PARPi bei BRCA-Wildtyp-Tumoren, wenn auch erst bei höheren Konzentrationen (Sun et al., 2018). Die hier vorliegenden Daten unterstützen diese Beobachtung, da sie zeigen, dass trotz des BRCA-Wildtyp-Status beide Zelllinien auf die PARPi-Therapie ansprechen. Bei OVCAR-3-Zellen erfolgte dieses Ansprechen aufgrund eines funktionellen HR-Verlusts

bereits bei niedrigeren Konzentrationen (Bradbury et al., 2020). Im Gegensatz dazu zeigte SK-OV-3, die einen BRCA-Wildtyp aufweist und keine HR-Veränderungen aufweist, erst bei wesentlich höheren Konzentrationen ein Ansprechen auf die Therapie.

Im Gegensatz dazu wurden sowohl Nira als auch Ruca zur Erhaltungstherapie bei Patientinnen unabhängig vom BRCA-Mutationsstatus und HR Defizienz zugelassen, nachdem die Wirksamkeit in mehreren klinischen Studien bestätigt wurde (González-Martín et al., 2019; Ledermann et al., 2014; Gemeinsamer Bundesausschuss, 2019). Daher konnte erwartet werden, dass auch SKOV-3 schon bei geringeren Konzentrationen auf die Behandlung ansprechen würde. Dies spiegelt sich in den erhobenen Daten wider. Ruca zeigte eine nur 10-fach höhere Konzentration bei SK-OV-3 im Vergleich zu OVCAR-3. Bei Nira war der Unterschied zwischen den Zelllinien noch geringer, wobei SK-OV-3 nur eine 4-fach höhere Konzentration benötigte als OVCAR-3.

4.2 Biologische Effekte von Laserlicht im blauen Spektrum

Durch die Absorption von Laserstrahlen im Gewebe entsteht Wärmeenergie und die Temperatur erhöht sich (Reichert et al., 2017). Die erhobenen Daten zeigen einen linearen Zusammenhang zwischen der zugeführten Laserenergie und der Temperatur des Zellkulturmediums.

Die thermischen Effekte auf Gewebe sind sowohl abhängig von der erreichten Temperatur als auch von der Expositionsdauer (Dewey, 2009). Die für den Kernversuch ausgewählten Laserparameter führten bei einer Starttemperatur von 37,0 °C zu Temperaturen von $41,8 \pm 0,7$ °C bis zu $44,1 \pm 1,5$ °C. Temperaturen im hyperthermischen Bereich (ca. 40–47 °C) führen zu reversiblen Prozessen auf Protein-Ebene (Roti Roti, 2008). Die meisten nicht malignen Gewebe werden bei einer Behandlungsdauer von unter 1 h bei einer Temperatur von bis zu 44 °C nicht dauerhaft geschädigt (Fajardo, 1984). Im Gegensatz dazu reagieren Tumorzellen empfindlicher auf Hyperthermie (Wierenga et al., 2003; Hou et al., 2014). Einerseits hat Hyperthermie eine direkte antitumorale Wirkung (Zhou et al., 2011), andererseits wurden wiederholt potenzierte Effekte im Zusammenhang mit Chemotherapie festgestellt (Ahmed und Zaidi, 2013; van der Zee, 2002).

Für die zelluläre Funktion ist ein physiologischer pH-Wert im Bereich von 7,4 entscheidend (Michl et al., 2019). Starke Veränderungen des pH-Wertes können Parameter wie Proteinsynthese, Stoffwechsel, Zellwachstumsrate sowie Zelldifferenzierung und Klonierungseffizienz beeinflussen (Bertoncello, 2019). Zum Einfluss von Laserstrahlen des blauen Spektrums auf die pH-Wert Entwicklung wurden bisher noch keine Daten veröffentlicht. Jedoch konnte in den erhobenen Daten beobachtet werden, dass die Laserbehandlung zu einer leichten Erniedrigung des Medium-pH-Wertes führte. Dieser Effekt war im SK-OV-3 Medium (DMEM/ F12 plus Zusätze) stärker ausgeprägt als im OVCAR-3 Medium (RPMI 1640 plus Zusätze). Beide Medien verwenden ein Natrium-Bikarbonat-Puffersystem und benötigen daher eine CO₂-Umgebung von 5-10 %, um einen physiologischen pH-Wert aufrechtzuerhalten (Ausubel et al., 2001).

Da die Versuche bei Raumluft mit einem atmosphärischem CO₂ von ca. 0,04 % durchgeführt wurden, war bei beiden Medien ein alkalischer pH-Wert bei Beginn der Messungen zu beobachten (Bertoncello, 2019). Die leichte Erniedrigung des pH-Wertes bei Laserbehandlung lässt sich auf den Temperaturanstieg während der Behandlung zurückführen (Michl et al., 2019). Der leicht unterschiedliche Rückgang des pH-Werts bei der Laserbehandlung zwischen den beiden Nährmedien kann durch die unterschiedliche Konzentration von Natriumbikarbonat in den Medien (Ausubel et al., 2001) erklärt werden, wobei das OVCAR-3-Medium aufgrund seiner höheren Konzentration eine bessere Pufferkapazität aufweist im Vergleich zum SK-OV-3-Medium.

Neben den Auswirkungen auf Temperatur und pH-Wert sind auch mögliche Beeinflussungen der DNA von Interesse, denn das Emissionsspektrum des blauen Laserlichts befindet sich nahe dem UV-Bereich. Da DNA-Modifikationen bei UV-Bestrahlungen bekannt sind (Greinert et al., 2012), ist es wichtig die Auswirkungen von blauem Laserlicht in diesem Kontext zu untersuchen. In einer Studie von J. Reichelt et al. wurde bei einer Behandlung mit 2,0 W und einer Vorschubgeschwindigkeit von 3 mm/s an epithelialen und mesenchymalen Zellen keine Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen festgestellt. Es besteht jedoch das Potenzial für DNA-Veränderungen bei längeren Behandlungsdauern (Reichelt et al., 2017). Dies sollte in zukünftigen Studien weiter untersucht werden.

Des Weiteren hat blaues Laserlicht einen Einfluss auf photochemische Reaktionen. Es konnte nachgewiesen werden, dass es eine dosisabhängige ROS-Freisetzung induziert (Mignon et al., 2018; Mamalis et al., 2015). ROS sind bekannte Signalmoleküle, initiieren aber auch zytotoxische Effekte (Mignon et al., 2018). So haben ROS einen entscheidenden Einfluss auf die Wachstumsinhibition bei Tumorzellen.

4.3 Wachstumsinhibierender Effekt

Bei allen applizierten Energiedosen im Bereich von 3,5 bis 331,57 J/cm² konnte eine Wachstumsinhibition festgestellt werden. Dabei wurde ein linearer Zusammenhang zwischen applizierter Laserdosis und dem Ausmaß der Wachstumsinhibition festgestellt. Im Gegensatz zu der Behandlung mit den PARPi, wo OVCAR-3 wesentlich sensibler reagierte, reagierten hier beide Zelllinien annähernd gleich sensitiv.

Die Hemmung des Zellwachstums durch blaues Laserlicht kann durch verschiedene Faktoren erklärt werden. Neben der ROS-Produktion durch Laserstrahlen des blauen Spektrums ist ein wichtiger Faktor die Temperaturentwicklung. Denn Diodenlaser, wie der verwendete, üben auf zellulärer Ebene hauptsächlich thermische Effekte aus (Reichelt et al., 2017). Die Wirkung dieser Effekte hängt sowohl von Temperaturentwicklung als auch von Expositionszeit ab (Roti Roti, 2008). In Bezug auf die Auswirkungen von Hyperthermie auf Tumorzellen wurde beobachtet, dass sie ebenfalls die Produktion von Sauerstoffradikalen stimuliert und oxidativen Stress erzeugt (Oei et al., 2017; Ba et al., 2017; Hou et al., 2014). Dies wiederum führt zur Auslösung von Apoptose in den Tumorzellen (Yasumoto et al., 2004; Zhou et al., 2011).

Es zeigt sich eine Variabilität in der Reaktion verschiedener Zelltypen sowie unterschiedlicher Tumore (Bensadoun et al., 2020; Tam et al., 2020). In vitro- und in vivo-Studien zur Lasertherapie im blauen Spektralbereich bei niedriger Energie (PBM) liefern widersprüchliche Ergebnisse in Bezug auf biomodulatorische Wirkungen. Für die meisten nicht entarteten Zellen werden positive Auswirkungen auf Proliferation und Lebensfähigkeit beschrieben (Etemadi et al., 2020; Samoilova et al., 2015). Im Gegensatz dazu variieren die Ergebnisse bei Tumorzellen erheblich und reichen von förderlichen

Effekten hinsichtlich des Zellwachstum (Hamblin et al., 2018) bis hin zu verminderter Lebensfähigkeit und Proliferation (Matsumoto et al., 2014; Chen et al., 2020; Shakibaie et al., 2020; Samoilova et al., 2015). Diese Studien verwendeten Bestrahlungsdosen im Bereich von 0,04 bis 24 J/cm². Die beiden OC-Zelllinien aus den vorliegenden Versuchen reagierten bei allen gewählten Laserparametern mit einer Wachstumsinhibition, auch bei der niedrigsten verwendeten Energiedosis von 5,5 J/cm².

Bei höheren Energiedosen (ab 50,5-59,7 J/cm²) wird auch das Wachstum von nicht entarteten Zellen gehemmt (Etemadi et al., 2020; Mamalis et al., 2015; Opländer et al., 2011). Die Reaktion der Zellen ist, vergleichbar mit unseren eigenen Daten, dosisabhängig (Mignon et al., 2018; Mamalis et al., 2015).

Diese wachstumsinhibierenden Eigenschaften von blauem Laserlicht wurden auch bei Mikroorganismen untersucht. Schon bei niedriger Energie (3,5-30 J) konnten antibakterielle Eigenschaften nachgewiesen werden (Lusche et al., 2020; Gutknecht et al., 2018; Makdoui et al., 2019). Das blaue Laserlicht zeigt auch antifungale Eigenschaften und kann Pilze effektiv bekämpfen, ohne dabei umgebende Keratinozyten negativ zu beeinflussen (Wang et al., 2018).

4.4 Kombination von PARPi und Laserbehandlung

In dem Kernversuch wurde der kombinierte Einsatz von 445 nm Laserlicht mit den PARPi untersucht. Die Rationale für die Durchführung des Kernversuches basiert auf der Hypothese, dass Laserlicht die Sensibilisierung von OC-Zellen bewirkt, indem es eine erhöhte Membrangängigkeit induziert. So kann die Wirksamkeit der PARPi unterstützt werden und es könnte klinisch mit geringeren Dosen gearbeitet werden, was weniger unerwünschte Nebenwirkungen zur Folge hätte. Diese Sensibilisierung könnte auf verschiedene Weisen vermittelt werden:

So kann eine erhöhte Membranpermeabilität durch Laser vermittelt werden. Insbesondere Untersuchungen im PBM-Bereich wiesen dies nach (Caruso-Davis et al., 2011; Neira et al., 2002; Montag et al., 2000). Im Bereich der höheren Laserleistungen, gibt es zu diesem Thema, nach unserem Wissen, noch keine publizierten Untersuchungen. Auch Hyperthermie, wie sie bei der Laserbehandlung entsteht, kann

eine erhöhte Membrangängigkeit vermitteln (Ahmed und Zaidi, 2013). Darüber hinaus sind auch ROS an der Membranpermeabilisierung beteiligt (Shields et al., 2021). Die ROS-Produktion wird sowohl durch Laserlicht im breiten Spektrum (Kim, 2002; Migliario et al., 2014), als auch durch PBM im blauen Spektralbereich (Li et al., 2022; Kushibiki et al., 2013), sowie durch Hyperthermie (Ahmed und Zaidi, 2013) induziert.

Zunächst konnte beobachtet werden, dass die OVCAR-3 Zelllinie sensibler auf die kombinierte Therapie ansprach und sogar potenzierende Effekte verursachte. Auch bei der Titration der PARPi reagierte OVCAR-3 empfindlicher. Wohingegen beide Zelllinien mit einer gleich starken Wachstumsinhibition nach Laserbehandlung reagierten. Folglich scheinen Zellen mit HR-Defizienz, die bereits empfindlicher auf PARPi ansprechen, mehr von der Lasersensibilisierung zu profitieren. Die potenzierte Wirkung kann sowohl auf Membranpermeabilisierung als auf die erzeugte Hyperthermie zurückgeführt werden. Frühere präklinische Studien (van der Heijden et al., 2005; Schaaf et al., 2016) und klinische Studien, insbesondere im Kontext der HIPEC (Schaaf et al., 2015; Spiliotis et al., 2015) haben gezeigt, dass Hyperthermie die Wirksamkeit von Chemotherapeutika erhöhen kann. Sogar bei BRCA-Wildtyp oder HR-kompetenten Zellen habe Hyperthermie das Potenzial die Wirkung der PARPi zu verstärken. Sei es durch den Abbau von BRCA2 (Schaaf et al., 2016; van den Tempel et al., 2018) oder die Induktion synthetischer Letalität bei HR-kompetenten Zellen (Fujimaki et al., 1990; Krawczyk et al., 2011). Jedoch spiegelt sich dies nicht in den erhobenen Daten wider. Der entscheidende Unterschied scheint in der Hyperthermie-Expositionsdauer zu liegen. Sie lag in den hier erhobenen Daten bei 60 s, wohingegen sie in den zitierten Studien mit 60 min deutlich länger war.

Es wurde außerdem deutlich, dass sich die Effektstärke der kombinierten Behandlung zwischen den drei verwendeten PARPi unterschied. Bei dem PARPi Ola konnten bei beiden Zelllinien additive Effekte detektiert werden. Ola weist mit 435,08 g/mol das höchste Molekulargewicht der drei verwendeten PARPi auf und verzeichnet eine niedrige Zellmembranpermeabilität (EMA, 2014). Dies mag der Grund dafür sein, dass Ola in der kombinierten Behandlung keine potenzierten Effekte aufwies. In der kombinierten Behandlung mit Nira ließen sich markante Unterschiede zwischen dem Ansprechen der beiden Zelllinien feststellen. OVCAR-3 Zellen reagierten bei kombinierter Behandlung bei

allen Laser Leistungen potenziert. Wohingegen sich bei SK-OV-3 Zellen geringer ausgeprägte Effekte zeigten. Insbesondere bei niedrigen Laserleistungen zeigten sich schwache Effekte. Bei höheren Leistungen ließen sich additive Effekte verzeichnen.

Somit ließen sich hier zwei Extreme feststellen. Bei SK-OV-3 erwies sich Nira als der einzige PARPi der in der Kombinationsbehandlung Wirkungen erzielte, die nicht additiv waren. Hingegen zeigte sich bei OVCAR-3 Nira als der einzige PARPi, der in allen drei Laserleistungen potenzierte Wirkungen erzielte. Nira zeichnet sich mit 320,4 g/mol durch das niedrigste Molekulargewicht der drei PARPi aus. Außerdem ist hier die höchste Permeabilität zu verzeichnen (EMA, 2017). Die Gründe für die beobachteten Unterschiede in der Reaktion auf die kombinierte Behandlung mit Nira und Laserleistung, die sich in zwei extremen Ausprägungen manifestierten, konnten nicht abschließend geklärt werden. Das sehr gute Ansprechen von OVCAR-3 mag auf das Zusammentreffen mehrerer günstiger Faktoren zurückzuführen sein. Dazu zählen das kleine Molekulargewicht und die gute Membrangängigkeit von Nira, ebenso wie die höhere Empfindlichkeit der OVCAR-3-Zelllinie gegenüber der PARPi-Therapie. Hingegen konnte die Ursache dafür, dass bei SK-OV-3 bei niedrigen Laserleistungen Wirkungen beobachtet wurden, die unterhalb des erwarteten additiven Effekts lagen, nicht abschließend ermittelt werden.

Bei kombinierter Behandlung mit Ruca ließen sich bei SK-OV-3 Zellen bei allen Leistungen additive Effekte feststellen. OVCAR-3 Zellen zeigten additive bis potenzierte Effekte auf.

Ruca weist mit 323,0 g/mol ein unwesentlich höheres Molekulargewicht auf als Nira (Kossatz et al., 2018). Jedoch ist die Permeabilität von Ruca, ähnlich wie die von Ola, vergleichsweise niedrig (Liao et al., 2022). Somit sind sowohl die Effektstärke der kombinierten Behandlung als auch Molekulargewicht und Permeabilität im mittleren Bereich.

Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass teils ein signifikanter Unterschied bestand zwischen der sequentiellen und simultanen kombinierten Behandlung. In den Fällen, in denen ein signifikanter Unterschied festgestellt wurde, führte die simultane Behandlung immer zu besseren Ergebnissen. Dies wurde besonders deutlich bei der Ruca-Kombinationstherapie der OVCAR-3 Zellen. Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied

zwischen der sequentiellen und der simultanen Behandlung. Der Unterschied war so ausgeprägt, dass die sequentielle Behandlung zu additiven Ergebnissen führte, während die simultane Behandlung zu potenzierten Ergebnissen führte. In der Literatur ließen sich zu diesem Thema keine publizierten Ergebnisse finden. Dennoch könnte eine Hypothese in Betracht gezogen werden: Möglicherweise führt der Laser zur erhöhten Membrangängigkeit im Moment der Behandlung, wobei sich die Poren anschließend wieder schließen.

Es konnte ebenfalls festgestellt werden, dass höhere Laserleistungen den Effekt der kombinierten Behandlung verbessern. Dies lässt sich anhand folgenden Beispiels verdeutlichen: Bei der Ruca-Kombinationstherapie der OVCAR-3 Zellen führte die sequentielle Behandlung bei einer Laserleistung von 2,0 und 3,0 W zu einem additiven Effekt. Bei einer Laserleistung von 4,0 W wurde jedoch bereits ein potenziertter Effekt erzielt. Eine plausible Hypothese, die aus diesen Beobachtungen abgeleitet werden kann, ist, dass höhere Laserleistungen zu einer verstärkten Membrangängigkeit der PARPi führen. Es ist jedoch zu beachten, dass die Erhöhung der Laserleistungen nicht unbegrenzt möglich ist, da sie aufgrund der daraus resultierenden stärkeren thermischen Effekte ihre Grenzen hat.

4.5 Klinischer Nutzen

Es konnte gezeigt werden, dass 445 nm Laserbehandlung in vitro bei OC-Zellen teils potenzierte Wirkungen in Kombination mit PARPi bewirken kann. Diese Wirkung war besonders ausgeprägt bei der OVAR-3 Zelllinie, die eine HR-Defizienz aufweist, in Kombination mit dem PARPi Nira. Nira zeichnet sich durch seine ausgezeichnete Membrangängigkeit und sein geringes Molekulargewicht aus.

Der genaue Mechanismus hinter dieser Wirkung sollte in folgenden Studien weiter untersucht werden. Insbesondere eine etwaige Membranpermeabilisierung durch die 445 nm Laserstrahlung im Leistungsbereich von bis zu 4,0 W sollte näher erforscht werden. Hierbei könnte die Permeabilität der Zytoplasmamembran für niedermolekulare Substanzen nach der Laserbehandlung untersucht werden. Dies könnte durch die Behandlung von Zellen mit FITC-markierten Dextranen verschiedener Größen erfolgen, gefolgt von der Analyse des intrazellulären FITC-Signals mittels Durchflusszytometrie. Auf

diese Weise könnten Erkenntnisse darüber gewonnen werden, welche maximale Molekülgröße nach der Laserbehandlung die Zellmembran passieren kann. Diese Untersuchungen könnten wichtige Einblicke in die zugrunde liegenden Mechanismen dieser vielversprechenden Therapie bieten.

Aktuell sind PARPi nur für die orale Anwendung zugelassen. Sie unterliegen einem First-Pass-Metabolismus, was die Bioverfügbarkeit stark reduziert (Herman und Santos, 2023; Baldwin et al., 2018). Zum Beispiel zeigt Ola eine geringe Bioverfügbarkeit von lediglich 25-50 % und weist eine schlechte Anreicherungsfähigkeit im Tumorgewebe auf (Heo und Dhillon, 2018; Singh et al., 2020). Daher besteht ein Bedarf, zu untersuchen, wie diese Medikamente sicher und effektiv in das Tumorgewebe abgegeben werden können. In Tiermodellen wurden bereits vielversprechende Daten gesammelt, die die intraperitoneale Verabreichung von PARPi betreffen (Wenande et al., 2018).

Die intraperitoneale Applikation von Chemotherapie findet als HIPEC (Hypertherme Intraperitoneale Chemotherapie) bereits in der klinischen Praxis Anwendung. In der deutschen Leitlinie gibt es noch keine Empfehlung für die HIPEC als Standardtherapie beim OC (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022), aber jüngste Studien konnten eine signifikante Verbesserung der 5-Jahres-Überlebensrate und des krankheitsfreien Überlebens zeigen (Filis et al., 2022).

Im Rahmen der HIPEC wird intraoperativ, nach Tumorexzision, der gesamte Bauchraum erwärmt und anschließend werden intraperitoneal Chemotherapeutika perfundiert (Riggs et al., 2020). Ziel dieser Behandlung ist es, eventuell verbliebene Tumorreste und Mikro-Metastasen nach einer operativen Resektion zu erreichen und diese gezielt mit den lokal stark konzentrierten Medikamenten zu behandeln. Diese Methode bietet den Vorteil einer gesteigerten Wirksamkeit des Zytostatikums. Zum einen durch die lokale Anwendung, aber auch durch die Hyperthermie, durch die sowohl mögliche Arzneimittelresistenzen durchbrochen werden können (Bakrin et al., 2014; Hettinga et al., 1997), als auch eine erhöhte Eindringtiefe im Peritonealraum gewährleistet werden kann (Lambert et al., 2002). Es ist jedoch wichtig zu beachten, dass nicht nur der Tumor lokal behandelt wird, sondern der gesamte Peritonealraum, was zu Nebenwirkungen an anderen Organen im Peritonealraum führen kann (Filis et al., 2022).

In diesem Zusammenhang könnte die lokale Sensitivierung des Gewebes durch Laserbehandlung in unmittelbarer Nähe des entfernten Tumors vor oder während der HIPEC-Behandlung einen vielversprechenden Ansatz bieten. Dies könnte es ermöglichen, niedrigere Dosen der Chemotherapie zu verwenden, die gezielt in das gewünschte Gebiet eindringen zu lassen und die Nebenwirkungen im Peritonealraum zu minimieren. Eine weitere Möglichkeit zur Optimierung könnte darin bestehen, nahezu nicht-permeable Chemotherapeutika zu verwenden. Auf diese Weise könnte die Chemotherapie gezielt nur auf das durch Laser sensibilisierte Gewebe wirken, während das umgebende, nicht behandelte Gewebe weitgehend verschont bleibt. Es ist jedoch zu beachten, dass diese Methode nur einmal während der operativen Resektion des Tumors durchgeführt werden könnte. Dieser vielversprechende Ansatz könnte neue Möglichkeiten zur Verbesserung der Behandlung des OC eröffnen und die Effektivität von Therapien in diesem Bereich erhöhen.

In der klinischen Anwendung könnte so eine als "LAHIPEC" (Laser-assistierte HIPEC) bezeichnete Therapieoption entstehen. Dieser Ansatz kombiniert Laser-Sensitivierung, Hyperthermie und die intraperitoneale Verabreichung von PARPi. Durch die Laser-Sensitivierung kann eine erhöhte Zellmembranpermeabilität erreicht werden (Caruso-Davis et al., 2011; Neira et al., 2002; Montag et al., 2000). Gleichzeitig hat die Anwendung von Hyperthermie nachweislich antitumorale Effekte und steigert die Wirksamkeit der PARPi (van der Heijden et al., 2005; Schaaf et al., 2015; Spiliotis et al., 2015; Schaaf et al., 2016; van den Tempel et al., 2018; Fujimaki et al., 1990; Krawczyk et al., 2011). Die intraperitoneale Verabreichung von PARPi ermöglicht eine hohe Konzentration am gewünschten Wirkort und entfaltet die stärkste Wirkung lokal im HR-defizienten Tumorgewebe (Scott et al., 2015; Herbert, 2011). Die vielversprechendsten Ergebnisse sind bei HR-defizientem Gewebe zu erwarten, insbesondere wenn die Laser-Sensitivierung und die simultane Verabreichung von PARPi angewendet werden, wie aus den vorliegenden Daten hervorgeht.

Jedoch muss berücksichtigt werden, dass zurzeit alle drei PARPi nur zur Erhaltungstherapie nach einer bereits abgeschlossenen Platin-basierten Erstlinien-Chemotherapie mit komplettem oder partiellem Ansprechen zugelassen sind (EMA, 2023,

2022, 2020). Die Erhaltungstherapie wird bei OCs der FIGO Stadien III/IV nach abgeschlossener Chemotherapie (meist sechs Zyklen Carboplatin/Paclitaxel) eingeleitet. Der Einsatz von PARPi direkt im Anschluss an die Operation ist aktuell nicht zugelassen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022).

Mehr als zwei Drittel der Patientinnen, die langfristig mit PARPi behandelt werden entwickeln schließlich eine Resistenz (Wang et al., 2022). Daher besteht ein großes Interesse daran, Therapiemöglichkeiten zu entwickeln, um die Tumore wieder empfindlicher für die PARPi-Therapie zu machen. Die molekularen Mechanismen der Resistenzbildung sind vielfältig. Zum Beispiel sind Rückmutationen in den BRCA-Genen beschrieben worden, die zu einer teilweisen Wiederherstellung der HR führen (Kim et al., 2017; Edwards et al., 2008). In diesem Zusammenhang erweist sich die durch Laser induzierte Hyperthermie auch als vielversprechender Ansatz, durch den bereits oben erwähnten Abbau von BRCA2 (Schaaf et al., 2016) und die Induktion synthetischer Letalität (Kim et al., 2017).

Jedoch können Tumorzellen auch thermotolerant werden. Diese wird insbesondere durch HSP90 vermittelt. Daher gibt es bereits vielversprechende experimentelle Ansätze zur gleichzeitigen Hemmung von HSP90 (Kim et al., 2017).

Ein weiterer Resistenzmechanismus besteht in der Erniedrigung der effektiven Intrazellulären Arzneimittelkonzentration durch Hochregulation der Expression des P-gp-Ausfuhrtransporters. Auch hier wurden bereits experimentelle Ansätze entwickelt, wie die Inhibition des für den Transporter kodierenden Gens, was zu einer teilweisen Umkehr der Resistenz führte (F Martins et al., 2021). Die Lasersensitivierung könnte ebenfalls zu einer erhöhten intrazellulären Arzneimittelkonzentration führen und somit zur Abschwächung der Resistenz beitragen.

Die klinische Anwendung von Laserbehandlung zur Überwindung von PARPi-Resistenzen gestaltet sich allerdings schwierig, da sie einen operativen Zugang zum Gewebe erfordert. Jedoch entwickelt ein Großteil der Patientinnen Resistenzen erst nach der Operation, im Rahmen einer Langzeittherapie mit den PARPi (Wang et al., 2022).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der klinische Einsatz einer LAHIPEC eine innovative Therapieoption für die Behandlung von Eierstockkrebs darstellen könnte. Im

Zellkulturmodell ließen sich potenzierte Effekte bei der Behandlung mit Laser und PARPi feststellen und auch hinsichtlich potenzieller Resistenzen sind vielversprechende Ergebnisse zu erwarten.

5. Zusammenfassung

Laser-Behandlungen bieten neue Therapieansätze in der Onkologie. Die Effekte von Laserbehandlungen wurden bereits, insbesondere im Bereich der niedrigen Leistungen, untersucht. Hier wurden sowohl proliferationshemmende als auch -fördernde Wirkungen beschrieben (Wu et al., 2012; Schindl et al., 2000). In dieser Arbeit konnte der antiproliferative Effekt eines 445 nm Lasers nach einer Behandlungsdauer von 30-90 s und einer Energiedichte von 5,5 J/cm² bis 331,6 J/cm² auf Ovarialkarzinom - Zellen gezeigt werden.

Die Zulassung der PARP-Inhibitoren hat zu einer bedeutenden Veränderung in der Therapie des Ovarialkarzinoms geführt. Geringe Bioverfügbarkeit (Baldwin et al., 2018), niedrige Anreicherung im Tumor (Heo und Dhillon, 2018) und die zunehmende Resistenzentwicklung (Kim und Nam, 2022) im Therapieverlauf werfen die Frage auf, wie diese Therapie weiter optimiert werden kann. Im in-vitro-Modell konnten Effekte beim kombinierten Einsatz von PARP-Inhibitoren und Laser nachgewiesen werden. Hierbei zeigte sich die stärkste Wirkung bei der OVCAR-3 Zelllinie mit den PARP-Inhibitoren Niraparib und Rucaparib bei simultaner Laser-Behandlung. Höhere Energiedichten verbessern das Ergebnis, sind jedoch aufgrund der mit der Laser-Behandlung einhergehenden Temperaturentwicklung beschränkt.

Die gewonnenen Erkenntnisse zeigen, dass 445 nm Laser-Behandlung neben der Wachstumshemmung von Ovarialkarzinom-Zellen auch das Potential hat, die bestehenden Therapieoptionen des Ovarialkarzinoms zu erweitern bzw. zu ergänzen. Denkbar wäre ein Einsatz der Laser-Behandlung im Rahmen einer hyperthermen intraperitonealen Chemotherapie (HIPEC) um die Schnittländer des entfernten Tumors für die Chemotherapie zu sensibilisieren. Vorbehaltlich sind hier weitere Untersuchungen, wie die Laser-Behandlung im klinischen Kontext sowie der intraperitoneale Einsatz von PARP-Inhibitoren.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Wirkweise von PARP-Inhibitoren	10
Abbildung 2	Bestimmung der Laserleistung, die im Versuchsaufbau auf die Zellen wirkt. Das Laserleistungsmessgerät ist in 41,7 mm Abstand zum Strahlengang des Lasers angebracht. (A) Kein Hindernis liegt im Strahlengang. (B) Der Mikrotiterplatten-Boden liegt im Strahlengang. (C) Mikrotiterplatten-Deckel und -Boden sowie das Zellkulturmedium liegen im Strahlengang	21
Abbildung 3	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus: Einfluss von Laserbehandlung auf das Zellwachstum in angrenzenden Wells	23
Abbildung 4	Wachstumskinetiken von SK-OV-3 (A) und OVCAR-3 (B) Zellen in 24-Well-Zellkulturplatten mit unterschiedlichen initialen Zellzahlen	25
Abbildung 5	Wachstumskinetik von SK-OV-3 (A) und OVCAR-3 (B) Zellen nach Inkubation mit den PARPi Ola, Ruca und Nira	26
Abbildung 6	Einfluss von 445 nm Laserstrahlen auf die Temperaturentwicklung im Zellkulturmedium bei einer Starttemperatur von $20,0 \pm 0,2$ °C (A) und $37,0 \pm 0,5$ °C (B)	28
Abbildung 7	Einfluss von 445 nm Laserstrahlen auf den pH-Wert der Zellkulturmedien von SK-OV-3 (A) und OVCAR-3 (B)	29
Abbildung 8	Wachstumskinetik von SK-OV-3 (A, C) und OVCAR-3 Zellen (B, D). Ausschluss eines wachstumsinhibierenden Effektes der 445 nm Laserstrahlen (30 s, 10,0 W und 5,0 W) auf angrenzende Wells	31
Abbildung 9	Wachstumskinetiken von SK-OV-3 (A, C, E) und OVCAR-3 Zellen (B, D, F) nach Laserbehandlung über 30 s, 60 s und 90 s	34

- Abbildung 10 Wachstumskinetik von SK-OV-3 (A, C, E) und OVCAR-3 Zellen (B, 38
D, F) bei kombinierter Behandlung mit Laser (60 s, 2,0 W, 3,0 W
und 4,0 W) und Ola.
- Abbildung 11 Wachstumskinetik von SK-OV-3 (A, C, E) und OVCAR-3 Zellen (B, 39
D, F) bei kombinierter Behandlung mit Laser (60 s, 2,0 W, 3,0 W,
und 4,0 W) und Nira.
- Abbildung 12 Wachstumskinetik von SK-OV-3 (A, C, E) und OVCAR-3 Zellen (B, 40
D, E) bei kombinierter Behandlung mit Laser (60 s, 2,0 W, 3,0 W
und 4,0 W) und Ruca.

7. Literaturverzeichnis

Ahmed K, Zaidi SF. Treating cancer with heat: hyperthermia as promising strategy to enhance apoptosis. JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association 2013; 63: 504–508

Ansari MA, Erfanzadeh M, Mohajerani E. Mechanisms of Laser-Tissue Interaction: II. Tissue Thermal Properties. Journal of lasers in medical sciences 2013; 4: 99–106

Ash C, Dubec M, Donne K, Bashford T. Effect of wavelength and beam width on penetration in light-tissue interaction using computational methods. Lasers in medical science 2017; 32: 1909–1918

Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidmann JG, Smith J. Medium formulations. Current protocols in cell biology 2001; Appendix 2: Appendix 2B

Ba M-C, Long H, Cui S-Z, Gong Y-F, Yan Z-F, Wang S, Wu Y-B. Mild hyperthermia enhances sensitivity of gastric cancer cells to chemotherapy through reactive oxygen species-induced autophagic death. Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine 2017; 39: 1010428317711952

Bakrin N, Classe JM, Pomel C, Gouy S, Chene G, Glehen O. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) in ovarian cancer. Journal of visceral surgery 2014; 151: 347–353

Baldwin P, Ohman AW, Tangutoori S, Dinulescu DM, Sridhar S. Intraperitoneal delivery of NanoOlaparib for disseminated late-stage cancer treatment. International journal of nanomedicine 2018; 13: 8063–8074

Basso FG, Pansani TN, Cardoso LM, Citta M, Soares DG, Scheffel DS, Hebling J, Souza Costa CA de. Epithelial cell-enhanced metabolism by low-level laser therapy and epidermal growth factor. Lasers in medical science 2018; 33: 445–449

Bensadoun R-J, Epstein JB, Nair RG, Barasch A, Raber-Durlacher JE, Migliorati C, Genot-Klastersky M-T, Treister N, Arany P, Lodewijckx J, Robijns J. Safety and efficacy of photobiomodulation therapy in oncology: A systematic review. Cancer medicine 2020; 9: 8279–8300

Bertoncello I. Optimizing the Cell Culture Microenvironment. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 2019; 1940: 23–30

Bradbury A, O'Donnell R, Drew Y, Curtin NJ, Sharma Saha S. Characterisation of Ovarian Cancer Cell Line NIH-OVCAR3 and Implications of Genomic, Transcriptomic, Proteomic and Functional DNA Damage Response Biomarkers for Therapeutic Targeting. *Cancers* 2020; 12

Campbell CJ, Rittler MC, Köster C. J... The optical maser as a retinal coagulator: an evaluation. *Transactions - American Academy of Ophthalmology and Otolaryngology. American Academy of Ophthalmology and Otolaryngology* 1963; 67: 58–67

Caruso-Davis MK, Guillot TS, Podichetty VK, Mashtalir N, Dhurandhar NV, Dubuisson O, Yu Y, Greenway FL. Efficacy of low-level laser therapy for body contouring and spot fat reduction. *Obesity surgery* 2011; 21: 722–729

Chan WY, Brown LJ, Reid L, Joshua AM. PARP Inhibitors in Melanoma-An Expanding Therapeutic Option? *Cancers* 2021; 13

Chen A. PARP inhibitors: its role in treatment of cancer. *Chinese journal of cancer* 2011; 30: 463–471

Chen Z, Li W, Hu X, Liu M. Irradiance plays a significant role in photobiomodulation of B16F10 melanoma cells by increasing reactive oxygen species and inhibiting mitochondrial function. *Biomedical optics express* 2020; 11: 27–39

Cios A, Cieplak M, Szymański Ł, Lewicka A, Cierniak S, Stankiewicz W, Mendrycka M, Lewicki S. Effect of Different Wavelengths of Laser Irradiation on the Skin Cells. *International journal of molecular sciences* 2021; 22

Dewey WC. Arrhenius relationships from the molecule and cell to the clinic. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group* 2009; 25: 3–20

Edwards SL, Brough R, Lord CJ, Natrajan R, Vatcheva R, Levine DA, Boyd J, Reis-Filho JS, Ashworth A. Resistance to therapy caused by intragenic deletion in BRCA2. *Nature* 2008; 451: 1111–1115

EMA. 2014. CHMP assessment report Lynparza. Verfügbar unter https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/lynparza-epar-public-assessment-report_en.pdf (Zugriffsdatum: 15.09.2023)

EMA. 2017. Assessment report Zejula. Verfügbar unter https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/zejula-epar-public-assessment-report_en.pdf (Zugriffsdatum: 15.09.2023)

EMA. 2020. An overview of Zejula and why it is authorised in the EU. Verfügbar unter https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/zejula-epar-medicine-overview_en.pdf (Zugriffsdatum: 19.09.2023)

EMA. 2022. Lynparza (Olaparib), An overview of Lynparza and why it is authorised in the EU. Verfügbar unter https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/lynparza-epar-medicine-overview_en.pdf (Zugriffsdatum: 27.09.2023)

EMA. 2023. An overview of Rubraca and why it is authorised in the EU. Verfügbar unter https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/rubraca-epar-medicine-overview_en.pdf (Zugriffsdatum: 27.09.2023)

Etemadi A, Taghavi Namin S, Hodjat M, Kosarieh E, Hakimiha N. Assessment of the Photobiomodulation Effect of a Blue Diode Laser on the Proliferation and Migration of Cultured Human Gingival Fibroblast Cells: A Preliminary In Vitro Study. *Journal of lasers in medical sciences* 2020; 11: 491–496

F Martins ML, Loos NHC, Mucuk S, Jong D de, Lebre MC, Rosing H, Tibben M, Beijnen JH, Schinkel AH. P-Glycoprotein (ABCB1/MDR1) Controls Brain Penetration and Intestinal Disposition of the PARP1/2 Inhibitor Niraparib. *Molecular pharmaceutics* 2021; 18: 4371–4384

Fajardo LF. Pathological effects of hyperthermia in normal tissues. *Cancer research* 1984; 44: 4826s-4835s

Filis P, Mauri D, Markozannes G, Tolia M, Filis N, Tsilidis K. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) for the management of primary advanced and recurrent ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *ESMO open* 2022; 7: 100586

Flinck M, Kramer SH, Pedersen SF. Roles of pH in control of cell proliferation. *Acta physiologica (Oxford, England)* 2018; 223: e13068

Fornaini C, Fekrazad R, Rocca J-P, Zhang S, Merigo E. Use of Blue and Blue-Violet Lasers in Dentistry: A Narrative Review. *Journal of lasers in medical sciences* 2021; 12: e31

Fujimaki Y, Shimada M, Mitsui Y, Kimura E, Aoki Y. Possible direct effect of diethylcarbamazine on the infective larvae of *Brugia pahangi*. *Journal of helminthology* 1990; 64: 295–301

Gemeinsamer Bundesausschuss. 2019. Dossier zur Nutzenbewertung gemäß § 35a SGB V Rucaparib (Rubraca®). Verfügbar unter https://www.g-ba.de/downloads/92-975-2973/2019-02-26_Modul2_Rucaparib.pdf (Zugriffsdatum: 28.09.23)

González-Martín A, Pothuri B, Vergote I, DePont Christensen R, Graybill W, Mirza MR, McCormick C, Lorusso D, Hoskins P, Freyer G, Baumann K, Jardon K, Redondo A, Moore RG, Vulsteke C, O'Cearbhaill RE, Lund B, Backes F, Barretina-Ginesta P, Haggerty AF, Rubio-Pérez MJ, Shahin MS, Mangili G, Bradley WH, Bruchim I, Sun K, Malinowska IA, Li Y, Gupta D, Monk BJ. Niraparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer. *The New England journal of medicine* 2019; 381: 2391–2402

Greinert R, Volkmer B, Henning S, Breitbart EW, Greulich KO, Cardoso MC, Rapp A. UVA-induced DNA double-strand breaks result from the repair of clustered oxidative DNA damages. *Nucleic acids research* 2012; 40: 10263–10273

Gutknecht N, Al Hassan N, Martins MR, Conrads G, Franzen R. Bactericidal effect of 445-nm blue diode laser in the root canal dentin on *Enterococcus faecalis* of human teeth. *Laser Dent Sci* 2018; 2: 247–254

Hamblin MR, Nelson ST, Strahan JR. Photobiomodulation and Cancer: What Is the Truth? *Photomedicine and laser surgery* 2018; 36: 241–245

Heo Y-A, Dhillon S. Olaparib Tablet: A Review in Ovarian Cancer Maintenance Therapy. *Targeted oncology* 2018; 13: 801–808

Herbert. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 2011; 474: 609–615

Herman TF, Santos C. First Pass Effect. StatPearls Publishing 2023

Hettinga JV, Konings AW, Kampinga HH. Reduction of cellular cisplatin resistance by hyperthermia--a review. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group* 1997; 13: 439–457

Hills CA, Kelland LR, Abel G, Siracky J, Wilson AP, Harrap KR. Biological properties of ten human ovarian carcinoma cell lines: calibration in vitro against four platinum complexes. *British journal of cancer* 1989; 59: 527–534

Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001; 411: 366–374

Hou C-H, Lin F-L, Hou S-M, Liu J-F. Hyperthermia induces apoptosis through endoplasmic reticulum and reactive oxygen species in human osteosarcoma cells. *International journal of molecular sciences* 2014; 15: 17380–17395

Katta N, Santos D, McElroy AB, Estrada AD, Das G, Mohsin M, Donovan M, Milner TE. Laser coagulation and hemostasis of large diameter blood vessels: effect of shear stress and flow velocity. *Scientific reports* 2022; 12: 8375

Kim D, Nam HJ. PARP Inhibitors: Clinical Limitations and Recent Attempts to Overcome Them. *International journal of molecular sciences* 2022; 23

Kim Y, Kim A, Sharip A, Sharip A, Jiang J, Yang Q, Xie Y. Reverse the Resistance to PARP Inhibitors. *International journal of biological sciences* 2017; 13: 198–208

Kim YG. Laser mediated production of reactive oxygen and nitrogen species; implications for therapy. *Free radical research* 2002; 36: 1243–1250

King PR. Low level laser therapy: A review. *Laser Med Sci* 1989; 4: 141–150

Kossatz S, Carney B, Farley C, Weber WA, Drain CM, Reiner T. Direct Imaging of Drug Distribution and Target Engagement of the PARP Inhibitor Rucaparib. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 2018; 59: 1316–1320

Krawczyk PM, Eppink B, Essers J, Stap J, Rodermond H, Odijk H, Zelensky A, van Bree C, Stalpers LJ, Buist MR, Soullié T, Rens J, Verhagen HJM, O'Connor MJ, Franken NAP, Hagen TLM ten, Kanaar R, Aten JA. Mild hyperthermia inhibits homologous recombination, induces BRCA2 degradation, and sensitizes cancer cells to poly (ADP-ribose) polymerase-1 inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011; 108: 9851–9856

Kushibiki T, Hirasawa T, Okawa S, Ishihara M. Blue laser irradiation generates intracellular reactive oxygen species in various types of cells. *Photomedicine and laser surgery* 2013; 31: 95–104

Lambert GP, Gisolfi CV, Berg DJ, Moseley PL, Oberley LW, Kregel KC. Selected contribution: Hyperthermia-induced intestinal permeability and the role of oxidative and nitrosative stress. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 2002; 92: 1750-61; discussion 1749

Ledermann J, Harter P, Gourley C, Friedlander M, Vergote I, Rustin G, Scott CL, Meier W, Shapira-Frommer R, Safra T, Matei D, Fielding A, Spencer S, Dougherty B, Orr M, Hodgson D, Barrett JC, Matulonis U. Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: a preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial. *The Lancet. Oncology* 2014; 15: 852–861

Ledermann JA, Oza AM, Lorusso D, Aghajanian C, Oaknin A, Dean A, Colombo N, Weberpals JI, Clamp AR, Scambia G, Leary A, Holloway RW, Gancedo MA, Fong PC, Goh JC, O'Malley DM, Armstrong DK, Banerjee S, García-Donas J, Swisher EM, Cameron T, Maloney L, Goble S, Coleman RL. Rucaparib for patients with platinum-sensitive, recurrent ovarian carcinoma (ARIEL3): post-progression outcomes and updated safety results from a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet. Oncology* 2020; 21: 710–722

Leitlinienprogramm Onkologie. 2022. S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren. Verfügbar unter https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/LL_Ovarialkarzinom_Langversion_5.1.pdf (Zugriffsdatum: 18.09.2023)

Li X, Gu L, Chen Y, Wang X, Mei Y, Zhou J, Ma M, Ma J, Chong Y, Wang X, Guo P, He D, Zeng J. A novel 450-nm laser-mediated sinoporphyrin sodium-based photodynamic therapy induces autophagic cell death in gastric cancer through regulation of the ROS/PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *BMC medicine* 2022; 20: 475

Liang W-Z, Liu P-F, Fu E, Chung H-S, Jan C-R, Wu C-H, Shu C-W, Hsieh Y-D. Selective cytotoxic effects of low-power laser irradiation on human oral cancer cells. *Lasers in surgery and medicine* 2015; 47: 756–764

Liao M, Beltman J, Giordano H, Harding TC, Maloney L, Simmons AD, Xiao JJ. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Rucaparib. *Clinical pharmacokinetics* 2022; 61: 1477–1493

Lusche I, Dirk C, Frentzen M, Meister J. Cavity Disinfection With a 445 nm Diode Laser Within the Scope of Restorative Therapy - A Pilot Study. *Journal of lasers in medical sciences* 2020; 11: 417–426

Makdoui K, Hedin M, Bäckman A. Different photodynamic effects of blue light with and without riboflavin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and human keratinocytes in vitro. *Laser Med Sci* 2019; 34: 1799–1805

Mamalis A, Garcha M, Jagdeo J. Light emitting diode-generated blue light modulates fibrosis characteristics: fibroblast proliferation, migration speed, and reactive oxygen species generation. *Lasers in surgery and medicine* 2015; 47: 210–215

Manning MR, Cetas TC, Miller RC, Oleson JR, Connor WG, Gerner EW. Clinical hyperthermia: results of a phase I trial employing hyperthermia alone or in combination with external beam or interstitial radiotherapy. *Cancer* 1982; 49: 205–216

Matsumoto N, Yoshikawa K, Shimada M, Kurita N, Sato H, Iwata T, Higashijima J, Chikakiyo M, Nishi M, Kashihara H, Takasu C, Eto S, Takahashi A, Akutagawa M, Emoto T. Effect of light irradiation by light emitting diode on colon cancer cells. *Anticancer research* 2014; 34: 4709–4716

Maxwell KN, Wubbenhorst B, Wenz BM, Sloover D de, Pluta J, Emery L, Barrett A, Kraya AA, Anastopoulos IN, Yu S, Jiang Y, Chen H, Zhang NR, Hackman N, D'Andrea K, Daber R, Morrisette JJD, Mitra N, Feldman M, Domchek SM, Nathanson KL. BRCA locus-specific loss of heterozygosity in germline BRCA1 and BRCA2 carriers. *Nature communications* 2017; 8: 319

Meister J, Franzen R, Apel C. Grundlagen der Laserzahnheilkunde Teil I-Das Licht. *LaserZahnheilkunde*; 2004: 1–5

Michl J, Park KC, Swietach P. Evidence-based guidelines for controlling pH in mammalian live-cell culture systems. *Communications biology* 2019; 2: 144

Migliario M, Pittarella P, Fanuli M, Rizzi M, Renò F. Laser-induced osteoblast proliferation is mediated by ROS production. *Laser Med Sci* 2014; 29: 1463–1467

Mignon C, Uzunbajakava NE, Castellano-Pellicena I, Botchkareva NV, Tobin DJ. Differential response of human dermal fibroblast subpopulations to visible and near-infrared light: Potential of photobiomodulation for addressing cutaneous conditions. *Lasers in surgery and medicine* 2018; 50: 859–882

Mirza MR, Monk BJ, Herrstedt J, Oza AM, Mahner S, Redondo A, Fabbro M, Ledermann JA, Lorusso D, Vergote I, Ben-Baruch NE, Marth C, Mądry R, Christensen RD, Berek JS,

Dørum A, Tinker AV, Du Bois A, González-Martín A, Follana P, Benigno B, Rosenberg P, Gilbert L, Rimel BJ, Buscema J, Balser JP, Agarwal S, Matulonis UA. Niraparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive, Recurrent Ovarian Cancer. *The New England journal of medicine* 2016; 375: 2154–2164

Montag M, Rink K, Delacrétaz G, van der Ven H. Laser-induced immobilization and plasma membrane permeabilization in human spermatozoa. *Human reproduction* (Oxford, England) 2000; 15: 846–852

Neira R, Arroyave J, Ramirez H, Ortiz CL, Solarte E, Sequeda F, Gutierrez MI. Fat liquefaction: effect of low-level laser energy on adipose tissue. *Plastic and reconstructive surgery* 2002; 110: 912-22; discussion 923-5

Oei AL, Vriend LEM, Krawczyk PM, Horsman MR, Franken NAP, Crezee J. Targeting therapy-resistant cancer stem cells by hyperthermia. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group* 2017; 33: 419–427

Opländer C, Hidding S, Werners FB, Born M, Pallua N, Suschek CV. Effects of blue light irradiation on human dermal fibroblasts. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* 2011; 103: 118–125

Phillips C, Hillard T, Salvatore S, Tooze-Hobson P, Cardozo L. Lasers in gynaecology. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 2020; 251: 146–155

Reichelt J, Winter J, Meister J, Frentzen M, Kraus D. A novel blue light laser system for surgical applications in dentistry: evaluation of specific laser-tissue interactions in monolayer cultures. *Clinical oral investigations* 2017; 21: 985–994

Riggs MJ, Pandalai PK, Kim J, Dietrich CS. Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy in Ovarian Cancer. *Diagnostics* (Basel, Switzerland) 2020; 10

Robert Koch Institut/ Zentrum für Krebsregisterdaten. 2022. Eierstockkrebs (Ovarialkarzinom). Verfügbar unter

<https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Eierstockkrebs/eierstockkrebs.html>

Roett MA, Evans P. Ovarian cancer: an overview. *American family physician* 2009; 80: 609–616

Roti Roti JL. Cellular responses to hyperthermia (40-46 degrees C): cell killing and molecular events. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group* 2008; 24: 3–15

Samoilova KA, Zimin AA, Buinyakova AI, Makela AM, Zhevago NA. Regulatory systemic effect of postsurgical polychromatic light (480-3400 nm) irradiation of breast cancer patients on the proliferation of tumor and normal cells in vitro. *Photomedicine and laser surgery* 2015; 33: 555–563

Schaaf L, Schwab M, Ulmer C, Heine S, Mürdter TE, Schmid JO, Sauer G, Aulitzky WE, van der Kuip H. Hyperthermia Synergizes with Chemotherapy by Inhibiting PARP1-Dependent DNA Replication Arrest. *Cancer research* 2016; 76: 2868–2875

Schaaf L, van der Kuip H, Zopf W, Winter S, Münch M, Mürdter TE, Thon K-P, Steurer W, Aulitzky WE, Ulmer C. A Temperature of 40 °C Appears to be a Critical Threshold for Potentiating Cytotoxic Chemotherapy In Vitro and in Peritoneal Carcinomatosis Patients Undergoing HIPEC. *Annals of surgical oncology* 2015; 22 Suppl 3: S758-65

Schindl A, Schindl M, Pernerstorfer-Schön H, Schindl L. Low-intensity laser therapy: a review. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research* 2000; 48: 312–326

Scott CL, Swisher EM, Kaufmann SH. Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors: recent advances and future development. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2015; 33: 1397–1406

Shakibaie M, Vaezjalali M, Rafii-Tabar H, Sasanpour P. Phototherapy alters the oncogenic metabolic activity of breast cancer cells. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* 2020; 30: 101695

Shields HJ, Traa A, van Raamsdonk JM. Beneficial and Detrimental Effects of Reactive Oxygen Species on Lifespan: A Comprehensive Review of Comparative and Experimental Studies. *Frontiers in cell and developmental biology* 2021; 9: 628157

Singh B, Yang S, Krishna A, Sridhar S. Nanoparticle Formulations of Poly (ADP-ribose) Polymerase Inhibitors for Cancer Therapy. *Frontiers in chemistry* 2020; 8: 594619

Spiliotis J, Halkia E, Lianos E, Kalantzi N, Grivas A, Efstathiou E, Giassas S. Cytoreductive surgery and HIPEC in recurrent epithelial ovarian cancer: a prospective randomized phase III study. *Annals of surgical oncology* 2015; 22: 1570–1575

Stordal B, Timms K, Farrelly A, Gallagher D, Busschots S, Renaud M, Thery J, Williams D, Potter J, Tran T, Korpanty G, Cremona M, Carey M, Li J, Li Y, Aslan O, O'Leary JJ, Mills GB, Hennessy BT. BRCA1/2 mutation analysis in 41 ovarian cell lines reveals only one functionally deleterious BRCA1 mutation. *Molecular oncology* 2013; 7: 567–579

Sun K, Mikule K, Wang Z, Poon G, Vaidyanathan A, Smith G, Zhang Z-Y, Hanke J, Ramaswamy S, Wang J. A comparative pharmacokinetic study of PARP inhibitors demonstrates favorable properties for niraparib efficacy in preclinical tumor models. *Oncotarget* 2018; 9: 37080–37096

Tam SY, Tam VCW, Ramkumar S, Khaw ML, Law HKW, Lee SWY. Review on the Cellular Mechanisms of Low-Level Laser Therapy Use in Oncology. *Frontiers in oncology* 2020; 10: 1255

van den Tempel N, Odijk H, van Holthe N, Naipal K, Raams A, Eppink B, van Gent DC, Hardillo J, Verduijn GM, Drooger JC, van Rhoon GC, Smedts DHPM, van Doorn HC, Boormans JL, Jager A, Franckena M, Kanaar R. Heat-induced BRCA2 degradation in human tumours provides rationale for hyperthermia-PARP-inhibitor combination therapies. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group* 2018; 34: 407–414

van der Heijden AG, Verhaegh G, Jansen CFJ, Schalken JA, Witjes JA. Effect of hyperthermia on the cytotoxicity of 4 chemotherapeutic agents currently used for the

treatment of transitional cell carcinoma of the bladder: an in vitro study. *The Journal of urology* 2005; 173: 1375–1380

van der Zee J. Heating the patient: a promising approach? *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 2002; 13: 1173–1184

Wang C, Yang Z, Peng Y, Guo Y, Yao M, Dong J. Application of 460 nm visible light for the elimination of *Candida albicans* in vitro and in vivo. *Molecular medicine reports* 2018; 18: 2017–2026

Wang N, Yang Y, Jin D, Zhang Z, Shen K, Yang J, Chen H, Zhao X, Yang L, Lu H. PARP inhibitor resistance in breast and gynecological cancer: Resistance mechanisms and combination therapy strategies. *Frontiers in pharmacology* 2022; 13: 967633

Wenande E, Olesen UH, Boesen MR, Persson DP, Lerche CM, Stürup S, Gammelgaard B, Husted S, Anderson RR, Haedersdal M. Laser-assisted delivery enhances topical uptake of the anticancer agent cisplatin. *Drug delivery* 2018; 25: 1877–1885

Wierenga PK, Setroikromo R, Kamps G, Kampinga HH, Vellenga E. Differences in heat sensitivity between normal and acute myeloid leukemic stem cells: feasibility of hyperthermic purging of leukemic cells from autologous stem cell grafts. *Experimental hematology* 2003; 31: 421–427

Wu Y, Wang J, Gong D, Gu H, Hu S, Zhang H. Effects of low-level laser irradiation on mesenchymal stem cell proliferation: a microarray analysis. *Lasers in medical science* 2012; 27: 509–519

Xu X, Smith S, Urban J, Cui Z. An in line non-invasive optical system to monitor pH in cell and tissue culture. *Medical engineering & physics* 2006; 28: 468–474

Yasumoto J, Kirita T, Takahashi A, Ohnishi K, Imai Y, Yuki K, Ohnishi T. Apoptosis-related gene expression after hyperthermia in human tongue squamous cell carcinoma cells harboring wild-type or mutated-type p53. *Cancer letters* 2004; 204: 41–51

Zein R, Selting W, Hamblin MR. Review of light parameters and photobiomodulation efficacy: dive into complexity. *Journal of biomedical optics* 2018; 23: 1–17

Zhang J, Da Xing, Gao X. Low-power laser irradiation activates Src tyrosine kinase through reactive oxygen species-mediated signaling pathway. *Journal of cellular physiology* 2008; 217: 518–528

Zhou J, Wang X, Du L, Zhao L, Lei F, Ouyang W, Zhang Y, Liao Y, Tang J. Effect of hyperthermia on the apoptosis and proliferation of CaSki cells. *Molecular medicine reports* 2011; 4: 187–191

8. Erklärung zum Eigenanteil

Die vorliegende Arbeit wurde in der Klinik und Poliklinik für Gynäkologie und Gynäkologische Onkologie des Universitätsklinikums Bonn unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Alexander Mustea durchgeführt.

Die Konzeption der Arbeit erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. rer. nat. Dr. rer. med. habil. Matthias Stope. Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Herrn PD Dr. rer. nat. Dr. rer. med. habil. Matthias Stope und Herrn PD Dr. rer. nat. Jörg Meister von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich. Herr PD Dr. rer. nat. Dr. rer. med. habil. Matthias Stope stand mir bei der Interpretation der erhobenen Daten beratend zur Seite.

Für den Inhalt der Dissertationsschrift übernehme ich die volle Verantwortung.

Ich versichere, die Dissertationsschrift selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

9. Danksagung

Zum Schluss möchte ich denjenigen meinen aufrichtigen Dank aussprechen, die mich während der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Ich möchte Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Alexander Mustea, den Leiter der Klinik und Poliklinik für Gynäkologie und Gynäkologische Onkologie in Bonn, danken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, diese experimentelle Doktorarbeit im molekular-biologischen Forschungslabor seines Instituts anzufertigen.

Ein besonderer Dank gebührt meinem Betreuer und Laborleiter, Herrn PD Dr. rer. nat. Dr. rer. med. habil. Matthias Stope. Ihm bin ich im hohen Maße dankbar für seine Unterstützung bei der Auswahl und Konzeption des Forschungsthemas, sowie der Durchführung dieses Projektes. Ich schätze seine Geduld, Offenheit für Diskussionen und gewissenhafte Durchsicht meiner schriftlichen Arbeit sehr wert.

Zudem gilt mein Dank Herrn PD Dr. rer. nat. Jörg Meister. Für seine Hilfe bei der Etablierung und Durchführung der Experimente mit dem Laser, sowie für die Durchsicht meiner Arbeit. Außerdem möchte ich mich bei dem Zentrum für angewandte Laser-Medizinforschung und biomedizinische Optik (AMLaReBO), unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Søren Jepsen und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Christoph Peter Bourauel bedanken. Sowie bei den Forschungslaboren der Sektion für Experimentelle Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, unter der Leitung von Frau PD Dr. rer. nat. Marjan Nokhbehsaim. Danke, dass ich Teile Ihrer Infrastruktur unkompliziert mitnutzen konnte.

Mein aufrichtiger Dank gilt der Mildred Scheel School of Oncology (MSSO) für die großzügige finanzielle Unterstützung über einen Zeitraum von 12 Monaten durch das Stipendium. Diese Förderung hat es mir ermöglicht, mich voll und ganz auf meine Forschungsarbeit zu konzentrieren und meine Forschungsarbeit sehr bereichert.

Frau Subedi, Herrn PD Dr. med. dent. Benedikt Eggers, sowie allen Kommiliton:innen im Forschungslabor danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und Kollegialität während unserer gemeinsamen Zeit im Labor.