

Chemosensitivierung von Ovarialkarzinomzellen mittels Laserstrahlen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Anina Borgdorf

aus Essen

2025

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Alexander Mustea
2. Gutachter: PD Dr. Jörg Meister

Tag der Mündlichen Prüfung: 22. Juli 2025

Aus der Klinik für Gynäkologie und Gynäkologische Onkologie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung.....	7
1.1 Epidemiologie, Ätiologie, Klinik und Diagnostik des Ovarialkarzinoms.....	7
1.2 Grading und Therapie des Ovarialkarzinoms.....	9
1.2.1 Carboplatin.....	11
1.2.2 Paclitaxel.....	12
1.2.3 Docetaxel	12
1.3 Hypertherme intraperitoneale Chemotherapie	13
1.4 Laser	14
1.5 Fragestellung	15
2. Material und Methoden	17
2.1 Material	17
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	17
2.1.2 Chemikalien und kommerzielle Lösungen	18
2.1.3 Zelllinien.....	19
2.1.4 Zellkulturen: Medien und Zusätze.....	19
2.2 Zellbiologische Methoden.....	19
2.2.1 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen.....	19
2.2.2 Kultivierung und Normalpassage der Zellen	20
2.2.3 Zellaussaat, -ernte und Zellzahlbestimmung	20
2.3 Laserparameter und -aufbau	21
2.3.1 Temperaturuntersuchung	22
2.3.2 Leistungsmessung	22
2.3.3 Aussaat von Zellen für die Laserbehandlung.....	22

2.4	Statistische Auswertung	22
3.	Ergebnisse.....	24
3.1	Etablierung eines In-Vitro-OC-Modells mit SKOV3- und OVCAR3-Zellen.....	24
3.2	Wachstum von SKOV3- und OVCAR3-Zellen mit Carbo, Pacli und Doce	24
3.3	Charakterisierung physikalischer Parameter beim Einsatz von Laser im In-Vitro-OC-Modell.....	27
3.4	Temperaturentwicklung bei Laserbehandlung	33
3.5	Wachstum von SKOV3- und OVCAR3-Zellen nach Laserbehandlung	34
3.6	Kombination von Laser- und Zytostatikabehandlung	38
4.	Diskussion	44
5.	Zusammenfassung.....	54
6.	Abbildungsverzeichnis	56
7.	Tabellenverzeichnis	57
8.	Literaturverzeichnis	58
9.	Erklärung zum Eigenanteil	68
10.	Danksagung.....	69

Abkürzungsverzeichnis

ASCO	American Society Of Clinical Oncology	HIPEC	Hypertherme Intraperitoneale Chemotherapie
ATP	Adenosintriphosphat	HNPCC	Familiäres nichtpolypöses Kolonkarzinomsyndrom
AUC	Area under the curve	HSP	Hitzeschockprotein
AuNPs	Gold-Nanopartikel	HWZ	Halbwertszeit
bcl-2	B-Zell-Lymphom-Protein 2	ip	intraperitoneal
bcl-xL	B-Zell-Lymphom-extra-large-Protein	iv	Intravenös
BRCA	Brustkrebsgen	KOF	Körperoberfläche
CA125	Cancer-Antigen 125	MFN2	Mitofusin-2
Carbo	Carboplatin	MRT	Magnetresonanztomographie
CDK	Cyclin-abhängige Kinase	MW	Molmasse
CRS	Zytoreduktive Operation	MWNTs	Multiwalled Carbon Nanotubes
CT	Computertomographie	NIPP	Nicht-invasives Physikalisches Plasma
CW	continous wave	OC	Ovarialkarzinom
Doce	Docetaxel	Pacli	Paclitaxel
DRP	Dihydropyrimidinase-related Protein	PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase
EGFR	Epidermaler-Wachstumsfaktor-Rezeptor	PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique	PDT	Photodynamische Therapie
FITC	Fluoresceinisothiocyanat	PET	Positronenemissions-tomographie
HBOC	Familiäres Brust- und Eierstockkrebsyndrom	PNBs	Plasmonic Nanobubbles
HE4	Humanes Epididymis Protein 4	PW	Pulsed Wave
HGSOC	High-grade serous ovarian cancer	ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
		SGO	Society of Gynecologic Oncology

VEGF Vascular Endothelial Growth
Factor

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie, Ätiologie, Klinik und Diagnostik des Ovarialkarzinoms

Mit 6.700 Neuerkrankungen und 5.100 Sterbefällen pro 100.000 Frauen im Jahre 2022 in Deutschland verursacht das Ovarialkarzinom (OC) ein Drittel aller bösartigen Neubildungen des weiblichen Genitales und die Hälfte aller Sterbefälle an Krebserkrankungen dieser Organe. Auch wenn die Zahlen der Neuerkrankungen und der Sterbefälle rückläufig sind, erkrankt weiterhin jede 74. deutsche Frau im Laufe ihres Lebens an Eierstockkrebs (Zentrum für Krebsregisterdaten, 2022).

Aufgrund einer langen symptomfreien Zeit werden 76 % der Erkrankungen erst im Stadium III/IV mit Ausbreitung auf die Peritonealflächen von Abdomen und Becken diagnostiziert. Dies ist der Hauptgrund für die schlechte Überlebensrate, welche im Zeitraum von 5 Jahren ab Diagnosestellung im Stadium I bei 92 %, in einem späten Stadium bei nur 29 % liegt (Farrell et al., 2022; Zentrum für Krebsregisterdaten, 2022). Hat der Tumor hämatogen gestreut, sind vor allem die Leber und die Lunge betroffen. Ein Ileus, eine Pneumonie und Embolien zählen zu den häufigsten Todesursachen (Bloher et al., 2020).

Die Risikofaktoren des OC sind zunehmendes Alter, Asbest- und Talgexposition, aber auch Übergewicht und hormonelle Faktoren. So erhöhen Kinderlosigkeit und Unfruchtbarkeit das Erkrankungsrisiko, während es durch Geburten und lange Stillzeiten gesenkt wird. Ebenfalls protektiv wirken die Einnahme oraler hormoneller Kontrazeptiva und die Ligatur der Tubae uterinae (Menon et al., 2018). Ein erhöhtes Erkrankungsrisiko besteht für Frauen mit Brust-, Uterus- oder Darmkrebs sowie bei Brust- und Eierstockkrebs unter erstgradigen Verwandten. Genetisch finden sich bei einer von zehn Frauen hochpenetrante Veränderungen in den Tumorsuppressorgenen *Brustkrebsgen- (BRCA-) 1 und 2* (Holschneider und Berek, 2000; Zentrum für Krebsregisterdaten, 2022). In 20 % der Fälle wird eine Veränderung oder Überexpression der Onkogene *ERBB2, MYC, C-RAS* oder *K-RAS* beschrieben (Bloher et al., 2020).

Tumore des Ovars können von Epithelzellen, Stromazellen oder Keimzellen ausgehen. Unter den bösartigen Tumoren ist der mit 90 % vorherrschende Subtyp epithelialen Ursprungs, wobei dieser in der Regel aggressiver ist als das nicht-epitheliale OC (Reid et al., 2017; Torre et al., 2018). Innerhalb der bösartigen epithelialen OC sind das hochgradig seröse (HGSOC, 70 %), endometrioide (ENOC, 10 %), klarzellige (CCOC, 10 %), muzinöse (MOC, 3 %) und niedriggradig seröse (LGSOC, <5 %) zu unterscheiden. Darüber hinaus sind Tumore mit unklarem oder geringem malignem Potential bekannt (Reid et al., 2017). Anhand ihrer genetischen Instabilität lassen sich epitheliale Malignome außerdem in einen Typ I und einen instabileren Typ II einteilen. Karzinome vom Typ I sind meistens große, unilaterale, zystische, indolent auftretende Tumore, die sich vermutlich durch Mutationen und bösartige Transformation aus gutartigen extraovariellen Läsionen entwickeln. Typ II-Karzinome umfassen insbesondere das HGSOC und gehen häufig mit Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 einher (Torre et al., 2018; Menon et al., 2018).

In frühen Stadien sind die Symptome meist unspezifisch, was die Diagnosestellung erschwert und verzögert (Jayde et al., 2009). Am häufigsten wird eine Zunahme des Bauchumfangs festgestellt, gefolgt von Blähungen, Fatigue und abdominellen Schmerzen. Darüber hinaus wird von Verdauungs- und Miktionsbeschwerden, Unterleib- und Rückenschmerzen, vaginalen Blutungen und Gewichtsverlust berichtet (Goff, 2012).

Für eine erste Diagnosestellung sollten eine bimanuelle rektovaginale Untersuchung und eine Vaginal- und Abdomensonographie erfolgen. Hinzukommen die Durchführung einer Computertomographie (CT), Magnetresonanztomographie (MRT) oder Positronenemissionstomographie (PET) und die Bestimmung verschiedener Tumormarker, wobei das Cancer-Antigen 125 (CA125) und das Humane-Epididymis-Protein 4 (HE4) für das epitheliale OC geeignet sind (Blohmer et al., 2020). Eine wichtige Information ist außerdem der *BRCA*-Mutationsstatus, weshalb bei allen Patientinnen eine entsprechende genetische Untersuchung durchgeführt werden sollte (Basta et al., 2015). Diese kann Aufschluss über das Vorhandensein eines familiären Brust- und Eierstockkrebssyndroms (HBOC) oder eines familiären nichtpolypösen Kolonkarzinomsyndroms (HNPCC, Lynch-Syndrom) geben. Beide Tumorsyndrome gehen mit einer genetischen Prädisposition für gynäkologische Tumore einher und führen

zu einer familiären Häufung sowie einem früheren Erkrankungsalter (Malandar et al., 2004).

An einer effektiven Screeningmethode für die Erkennung des OC wird noch geforscht, wobei die Kombination aus einem transvaginalen Ultraschall und der Bestimmung des Tumormarkers CA125 im Vordergrund stehen. Eine Reduktion der Mortalität wurde damit bisher allerdings nicht erreicht, weshalb ein Screening der Allgemeinbevölkerung nicht empfohlen wird (Menon et al., 2018; Blohmer et al., 2020; Leitlinienprogramm Onkologie, 2024; Matulonis et al., 2016).

1.2 Grading und Therapie des Ovarialkarzinoms

Die Firstline-Therapie des primären OC ist eine zytoreduktive Operation (CRS) mit folgender intravenöser (iv) platinbasierter Chemotherapie (Farrell et al., 2022; Leitlinienprogramm Onkologie, 2024; Matulonis et al., 2016).

Während des offenen oder laparoskopischen chirurgischen Eingriffs sollte der histologische Typ und der histologische Differenzierungsgrad bestimmt werden. Ziel des Eingriffs ist eine R0-Resektion, wobei die Größe des Residualtumors neben dem Tumorstadium, dem Grading sowie dem Alter und Allgemeinzustand der Patientin ein wichtiger prognostischer Faktor ist (Blohmer et al., 2020; Leitlinienprogramm Onkologie, 2024; Ataseven et al., 2016; Du Bois et al., 2009).

Die chirurgische Einteilung des OC erfolgt anhand der FIGO-Klassifikation. Ein Tumor im Stadium I ist auf die Eierstöcke oder Eileiter beschränkt. Im Stadium II sind einer oder beide Eierstöcke oder Eileiter mit Ausbreitung in das kleine Becken oder das Peritoneum betroffen. Bei Ausbreitung auf das extrapelvine Peritoneum und/oder Metastasen in retroperitoneale oder abdominelle Lymphknoten spricht man von Stadium III. Sind bereits Fernmetastasen, ausgenommen Peritoneal- und abdominelle Lymphknotenmetastasen, vorhanden, handelt es sich um Stadium IV (Prat, 2014; Blohmer et al., 2020). Auch die TNM-Klassifikation kann verwendet werden (Prat, 2014).

In einigen Fällen, insbesondere bei Erkrankungen im Frühstadium, kann eine alleinige chirurgische Intervention mit detaillierter Nachbeobachtung ausreichend sein.

Gegebenenfalls schon im FIGO-Stadium IC, auf jeden Fall ab FIGO-Stadium IIB folgt auf die Staging- oder Debulking-Operation eine systemische Chemotherapie, bei der für eine erleichterte Medikamentengabe zusätzlich über eine Portplatzierung nachgedacht werden sollte (Armstrong et al., 2021; Wacker et al., 2020).

Der Standard der Chemotherapie beim OC ist die Kombination aus Carboplatin (Carbo) und Paclitaxel (Pacli) (Matulonis et al., 2016; Muggia, 2021; Katsumata et al., 2013). Dieses Therapieregime wird in 6 Zyklen verabreicht und ist meist gut verträglich und wirksam. Es muss an den möglichen OP-Zeitpunkt, das Erkrankungsausmaß, die Funktion lebenswichtiger Organe und eventuell vorhandene Begleiterkrankungen angepasst werden. Sinnvoll ist eine Carbo-Konzentration mit einer Area under the curve (AUC) von 5-6 an Tag 1 mit einer wöchentlichen Gabe von 60-80 mg/m² Pacli an Tag 1, 8 und 15 in einem 21- oder 28-tägigem Zyklus (Bookman, 2016; Armstrong et al., 2021). Die aktuelle S3-Leitlinie empfiehlt die Gabe von 175 mg/m² Pacli iv innerhalb von 3 Stunden alle 3 Wochen über 6 Zyklen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2024). Aufgrund möglicher Vorteile hinsichtlich des Nebenwirkungsprofils, gab es Überlegungen zum Austausch von Pacli gegen Docetaxel (Doce). Es hat sich sowohl bei platin- als auch bei pacli-resistenten Erkrankungen als wirksam erwiesen und zeigte in Kombination mit Carbo ähnliche Ergebnisse hinsichtlich des progressions-freien Überlebens (Vasey et al., 2004). Da keine signifikante Therapieverbesserung durch Docetaxel hervorgerufen werden konnte, wird eine Anwendung in der Behandlung des fortgeschrittenen OC aktuell nicht empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2024; Vasey et al., 2004).

Abhängig von der Histologie kann auch eine adjuvante Therapie mit Hormonpräparaten in Betracht gezogen werden. Bei einem fortgeschrittenen OC mit zweifelhaftem Erfolg einer primären CRS oder Kontraindikationen gegen eine Operation kann eine neoadjuvante Chemotherapie mit Intervall-CRS infrage kommen (Armstrong et al., 2021; Cortez et al., 2018).

Zu den neusten Medikamenten zählt das kürzlich erst zugelassene Mirvetuximab Soravtansine, ein Antikörper-Wirkstoff-Konjugat, welcher an den Folatezeptor α bindet (Bogani et al., 2024; European Medicines Agency, 2024). In der Erhaltungstherapie findet Bevacizumab, ein Inhibitor des Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) und Angiogenese-Hemmer, Anwendung, der bei fortgeschrittenem OC in Kombination mit

Carbo und Pacli verabreicht werden soll (Leitlinienprogramm Onkologie, 2024). Zunehmend in den Fokus gelangt die Behandlung mit Poly(ADP-ribose-) Polymerase- (PARP-) Inhibitoren (z. B. Olaparib), momentan vor allem als Erhaltungstherapie nach OP und Chemotherapie (Armstrong et al., 2021). Hinzu kommen zahlreiche immuntherapeutische Ansätze, die bisher primär therapieverbessernd und krankheitsstabilisierend wirken (Cortez et al., 2018).

1.2.1 Carboplatin

Carbo (Abb. 1A) ist ein Platinderivat der 2. Generation, welches als Alkylator über DNA-Vernetzung zum DNA-Strangbruch während der Replikation führt (Corte-Rodríguez et al., 2015). Carbo ist ähnlich wirksam wie das strukturell ähnliche Cisplatin, wobei seine Carboxylestergruppen weniger reaktiv sind (Zhang et al., 2022).

Carbo wird iv über 15-30 min verabreicht und über die Nieren ausgeschieden. Die Halbwertszeit (HWZ) beträgt 2,5 Stunden und somit ein Zehnfaches der HWZ von Cisplatin. Bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion (Kreatinin-Clearance < 60 ml/min) wird eine Dosisreduktion empfohlen. Das Indikationsspektrum von Carbo ähnelt dem von Cisplatin. Beide Substanzen können bei Hoden-, Urogenital- sowie kleinzelligen Lungen- und Kopf-Hals-Karzinomen eingesetzt werden. Carbo ist ein wesentlicher Bestandteil der Therapie des fortgeschrittenen epithelialen OC (Edelman und Rupard, 2006; Ramalingam et al., 2018; Gerson et al., 2018). Empfohlen wird dabei die Gabe über 6 Zyklen mit einer AUC von 5 (Leitlinienprogramm Onkologie, 2024).

Im Vergleich zu Cisplatin weist Carbo ein geringeres, dennoch nicht zu vernachlässigendes Toxizitätsprofil auf. Dosislimitierend ist die Myelosuppression, wobei die Thrombozytopenie stärker wiegt als die Leukopenie. Übelkeit und Erbrechen treten häufig auf, können aber durch Antiemetika gut behandelt werden. Unter hohen Dosen können Hepatotoxizität, Nierenfunktionsstörungen und Zytotoxizität auftreten (Gerson et al., 2018).

1.2.2 Paclitaxel

Pacli (Abb. 1B) ist für die Behandlung von Eierstock-, Brust- und Lungenkrebs sowie des Kaposi-Sarkoms zugelassen. Es wirkt über die Stabilisierung der Mikrotubuli und löst damit einen Arrest am mitotischen Kontrollpunkt aus, der letztendlich zum Zelltod führt (Farrar und Jacobs, 2022).

Eine Resistenz gegen Pacli kann durch eine veränderte Tubulinstruktur oder verstärkte Membranphosphoglykoproteine hervorgerufen werden. Im Nebenwirkungsprofil von Pacli finden sich unter anderem Überempfindlichkeitsreaktionen sowie Neuro- und hämatologische Toxizität, weshalb besondere Vorsicht bei der Verabreichung geboten ist (Farrar und Jacobs, 2022; Mekhail und Markman, 2002).

Nach der aktuellen S3-Leitlinie wird eine Gabe von 175 mg/m² Pacli alle drei Wochen empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2024). Ggf. sollte eine individuelle Anpassung abhängig von vorhandenen Begleiterkrankungen und allgemeiner Verträglichkeit erfolgen (Bookman, 2016).

1.2.3 Docetaxel

Doce (Abb. 1C) ist ein seit 1994 zugelassenes, halbsynthetisches Taxan und wird bei der Behandlung einer Reihe von Krebserkrankungen, darunter Brust-, Prostata- und Lungenkrebs, eingesetzt (Earhart, 1999). Es wird angenommen, dass Doce einen zweifachen antineoplastischen Mechanismus aufweist. Zum einen die Hemmung der mikrotubulären Depolymerisation, zum anderen die Verringerung der Auswirkungen durch die Genexpression des B-Zell-Lymphom-Proteins 2 (bcl-2) und des B-Zell-Lymphom-extra-large-Proteins (bcl-xL). Durch die Stabilisierung der Mikrotubuli werden die Zellen in der G2M-Zellzyklusphase angehalten und die bcl-2-Phosphorylierung induziert, wodurch die Apoptose der Zellen ausgelöst wird. Doce zeigte sich im Vergleich zu Pacli als stärkerer Auslöser der beschriebenen Phosphorylierung durch die etwa doppelt so hohe Affinität zu Tubulin (Pienta, 2001; Stein, 1999).

Mit 100 mg/m² Körperoberfläche (KOF) Doce alle 3 Wochen kann bei Patientinnen mit fortgeschrittenem, zuvor mit Platinwirkstoffen behandeltem Eierstockkrebs eine Gesamtansprechrate von 30 % und eine Ansprechdauer von 6 Monaten erzielt werden

(Kavanagh, 2002). Doce zeigt in Kombination mit Carbo insgesamt keine signifikanten Vorteile gegenüber Pacli, kann aufgrund eines ähnlichen progressions-freien Überlebens und niedrigerem Risiko für Neurotoxizität aber als mögliche Alternative in der OC-Behandlung in Erwägung gezogen werden (Vasey et al., 2004).

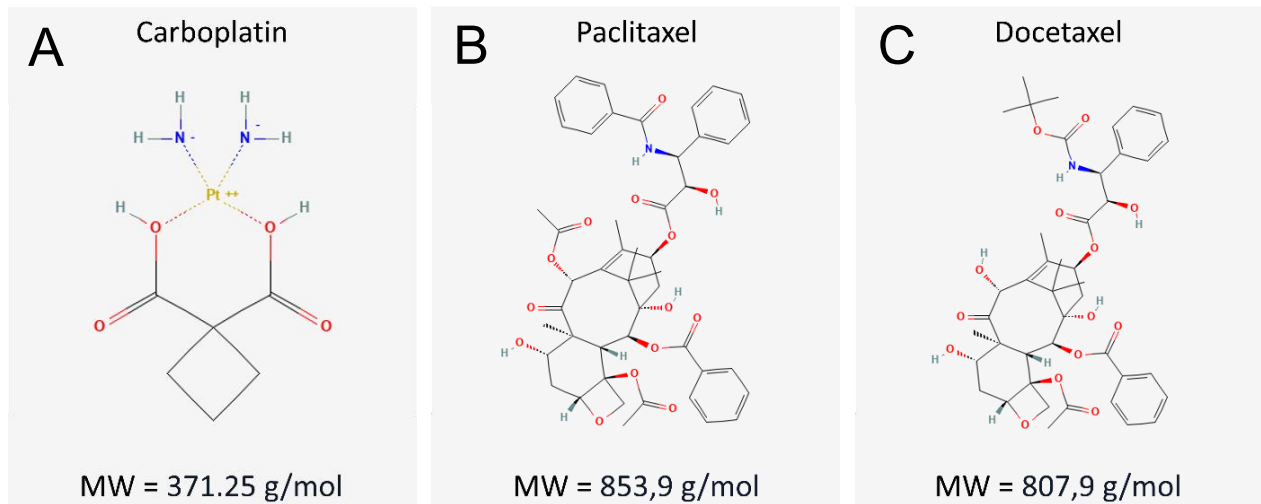


Abb. 1: Strukturformeln und Molmassen (MW) von Carbo (A), Pacli (B) und Doce (C) (PubChem, 2023a, 2023b, 2023c)

1.3 Hypertherme intraperitoneale Chemotherapie

Die hypertherme intraperitoneale Chemotherapie (HIPEC) beschreibt die direkte Verabreichung von Krebsmedikamenten unter Erwärmung der Bauchhöhle (Tsuyoshi et al., 2020). Die intraperitoneale (ip) Verabreichung soll die Effektivität der Chemotherapie am Wirkort erhöhen und gleichzeitig die systemischen Nebenwirkungen reduzieren (Gelissen et al., 2023). Synergistisch wirkt bei der HIPEC die Wärme, die das Eindringen der Chemotherapeutika in die Zellen verstärkt sowie die DNA-Reparatur und Angiogenese einschränkt und die Apoptose beschleunigt. Zellulär unterdrückt die Hyperthermie die homologe Rekombination und die DNA-Reparatur, wodurch es zu einer Sensibilisierung der Tumorzellen für die Chemotherapie kommt (Farrell et al., 2022; Oei et al., 2015; Bookman, 2016). Eine größtmögliche chirurgische Tumorentfernung ist unerlässlich, da die HIPEC ihre Wirkung nur bis zu einer maximalen Gewebetiefe von 5 mm entfalten kann (Tsuyoshi et al., 2020).

Die HIPEC führt zu einer Reihe von Nebenwirkungen, wobei in einer Umfrage unter 209 ASCO- und SGO-Mitgliedern aus dem Jahre 2005 vor allem die neurologische Toxizität mit 55 %, gefolgt von Übelkeit und Erbrechen mit 51 % und Katheterinfektionen und Nephropathie mit je 39 % benannt wurden (Naumann et al., 2009). In einer anderen Studie wurde von einer verlangsamten Wiederherstellung der Darmfunktion, pulmonalen Komplikationen, Infekten und Anämie berichtet. Dies führte in der Gesamtkonstellation zu einem signifikant verlängerten Krankenhausaufenthalt (18 Tage mit HIPEC im Vergleich zu 13 Tagen ohne HIPEC) (Farrell et al., 2022).

In Deutschland wird die HIPEC beim fortgeschrittenen OC aufgrund geringer Datenlage momentan nicht empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2024). Dennoch ist die HIPEC ein aktuelles Forschungsthema. Es bestehen Hinweise auf ein verbessertes Gesamtüberleben beim Einsatz nach Intervall-CRS und neoadjuvanter Chemotherapie, insbesondere bei Vorliegen eines OC der Stufe III (Gelissen et al., 2023).

1.4 Laser

„Laser“ ist ein Akronym, welches 1957 von Gordon Gould formuliert wurde und „Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation“ bedeutet. Es handelt sich um monochromatisches Licht, das sich durch eine hohe Intensität auszeichnet. Das Gewebe kann auf Laserstrahlung mit Reflexion, Streuung, Remission und Absorption reagieren, wobei die Effekte von der Wellenlänge und den Gewebeeigenschaften abhängig sind. So kommt es bei einer kürzeren Wellenlänge zum Beispiel zu größeren Streuungseffekten als bei längeren Wellenlängen. Problematisch bei der Streuung ist nicht nur der Energieverlust und die damit einhergehende Beeinträchtigung der applizierten Dosis, sondern auch der Anstieg unerwünschter Therapieeffekte (Netsch et al., 2021).

Laserstrahlung wird in der Medizin z. B. im Bereich des Entzündungs- und Schmerzmanagements eingesetzt (Liang et al., 2015; Matsumoto et al., 2014). Auch in der Therapie des Lichen sclerosus der Vulva, von low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) oder Condylomata acuminata der Zervix findet Laserstrahlung Anwendung (Yordanov et al., 2020; Wu et al., 2024). Wird für die Übertragung der Laserenergie ein Photosensitizer verwendet, spricht man unter anderem von Photodynamischer Therapie

(PDT). Meist wird Licht im spektralen Bereich verwendet, welches einem Wellenlängenbereich zwischen 400 und 750 nm entspricht (Matsumoto et al., 2014). Bekannt ist, dass durch niedrig dosierte Laserstrahlung die Zellproliferation und -migration reguliert werden, was zu erhöhtem Fibroblastenwachstum, erhöhter Angiogenese in Hautwunden und verringertem Einwandern von Entzündungszellen führt (Liang et al., 2015). Allerdings kann auch der gegenteilige Effekt hervorgerufen werden, welcher sich in der Krebstherapie zunutze gemacht wird (Matsumoto et al., 2014). Ursächlich ist die Produktion Reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), wodurch eine Zellapoptose und -nekrose ausgelöst werden (Akbarzadeh et al., 2016). Gleichzeitig kann Laserstrahlung Einfluss auf die Membranpermeabilität nehmen, wobei eine mögliche Ursache die Wärmeproduktion durch die Laserbehandlung ist. Die kurzfristige Steigerung der Membranpermeabilität kann zu einer höheren Wirkstoffaufnahme und somit einer verbesserten Wirksamkeit einer Chemotherapie führen (Yao et al., 2017).

1.5 Fragestellung

Das Fehlen spezifischer Frühsymptome und einer effektiven Screeningmethode führt dazu, dass bei einem Großteil der Betroffenen das OC erst spät erkannt wird. Eine Therapie in diesen späten Stadien ist mit einer Vielzahl von Nebenwirkungen und einer hohen Einschränkung der Lebensqualität verbunden. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt im Durchschnitt unter 45 % (Webb und Jordan, 2017).

Auch wenn der Einsatz von HIPEC kontrovers diskutiert wird, könnte die Kombination der ip Chemotherapie mit physikalischen Verfahren wie Laser eine vielversprechende Therapieoption bieten. Die Exposition mit Laserstrahlung wirkt auf verschiedene zelluläre Regulationsmechanismen. Unter anderem wird eine erhöhte Durchlässigkeit der Zytoplasmamembran hervorgerufen, die zu einer gesteigerten Sensitivität gegenüber Zytostatika führen kann (Yao et al., 2017).

In dieser Arbeit wird mit zwei verschiedenen OC-Zelllinien gearbeitet. Zunächst werden Inkubationsversuche mit Carbo, Pacli und Doce zur Ermittlung der Konzentrationen des halbmaximalen inhibitorischen Effekts durchgeführt. Gleichzeitig wird die Laserbehandlung durch Veränderung von Laserleistung, Laserenergie und

Behandlungszeit optimiert. Kernstück der Versuche ist die Kombination von Zytostatika- und Laserbehandlung, deren Effekte eingehend untersucht werden.

Ziel des Projekts ist die Charakterisierung möglicher synergistischer Effekte einer kombinierten Zytostatika- und Laserbehandlung und die Diskussion der Frage, ob dadurch die Therapie des fortgeschrittenen OC optimiert werden könnte.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte/Verbrauchsmaterialien	Hersteller
15 ml Röhrchen	Corning Science Mexico (Reynosa, Mexiko)
50 ml Falcon	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Absaugvorrichtung Integra VacuSafe	Integra Biosciences (Zizers, Schweiz)
Absaugvorrichtung uniVACUUSYS1	LLG Labware (Meckenheim)
CASY Model TT – Cell counter and Analyzer	Roche Diagnostics (Basel, Schweiz)
Diodenlaser Typ "Wolf"	A.R.C. Laser GmbH (Nürnberg)
Elektrophoresesystem Mini-PROTEAN®	Bio-Rad Laboratories (München)
Tetrasystem	
Feinwaage ABS 120-4	KERN & Sohn (Balingen-Frommern)
Filterpapier	Whatman (Dassel)
Filterspitzen SafeSeal Tips Professional	VWR (Leuven, Belgien)
Gewebekulturflasche 25 cm ²	Sarstedt (Nümbrecht)
Gewebekulturflasche 75 cm ²	Sarstedt (Nümbrecht)
Glaspasteurpipette	VWR International (Darmstadt)
Inkubator Heracell 240	Heraeus (Hanau)
Inkubator INCO2 108	Memmert (Schwabach)
Inkubator MCO-170 AICD-PE	PHCbi (AZ Etten-Leur, Niederlande)
Laserleistungsmessgerät LabMax-TOP	Coherent (California, USA)
Leistungsdetektor VT-80	PI miCos (Eschbach)
Magnetrührer IKA RH basic 2	VWR International (Darmstadt)
Mikroskop AE31E	Motic (Wetzlar)
Mikrozentrifuge	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Pipettensatz, 0,5-1000 µl	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipettierhilfe accu-jet® pro	Brand (Wertheim)
Pipettierhilfe pipetboy acu	Integra Biosciences GmbH (Biebertal)
Reagiergefäß 0,5ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Reagiergefäß 1,5ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Reagiergefäß 2ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Serologische Pipette 5ml, 10ml, 25ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Sicherheitswerkbank BSB3A	Gelaire Laminar Air Flow (Sydney, Australien)
Sterilbank HERA safe	Heraeus Instruments (Hanau)
Sterilbank safe 2020	Thermo Fischer Scientific (Massachusetts, USA)
Temperaturanzeigergerät TDA-3000	Jumo (Fulda)

Vortex Mixer RS-VA10	Phoenix Instrument (Garbsen)
Vortex Mixer Vornado	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf)
Waage EMB 2000-2	KERN & Sohn (Balingen-Frommern)
Wasserbad	Memmert (Büchenbach)
Wasserbad EXATHERM U3 electronics	Julabo GmbH (Seelbach)
Zellkulturplatte CELL + 24 well	Sarstedt (Nümbrecht)
Zentrifuge 5804R	Eppendorf (Hamburg)

2.1.2 Chemikalien und kommerzielle Lösungen

Chemikalien	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth (Karlsruhe)
Bromophenolblau	Feinchemie K.-H., Kallies KG (Sebnitz)
Coomassie ® Brilliant Blue G 250	Fluka (Buchs, Schweiz)
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth (Karlsruhe)
Essigsäure	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Glycerol	Carl Roth (Karlsruhe)
Glycin	Carl Roth (Karlsruhe)
Isopropanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Milchpulver, fettarm	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth (Karlsruhe)
Parafilm M ®	Bemis (Wisconsin, USA)
Ponceau-S	Carl Roth (Karlsruhe)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth (Karlsruhe)
N,N,N',N'-Tetramedthylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth (Karlsruhe)
Trichloressigsäure	Carl Roth (Karlsruhe)
Tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS)	Carl Roth (Karlsruhe)
Tween ® 20	Sigma-Aldrich (Steinheim)

Kommerzielle Lösungen	Hersteller
CASYblue	Roche Diagnostics (Basel, Schweiz)
CASYclean	Roche Diagnostics (Basel, Schweiz)
CASYton	Roche Diagnostics (Basel, Schweiz)

2.1.3 Zelllinien

Zelllinien	Hersteller
OVCAR-3	CLS Cell Lines Service (Eppenheim)
SK-OV-3	CLS Cell Lines Service (Eppenheim)

2.1.4 Zellkulturen: Medien und Zusätze

Produkte	Hersteller/Herstellung
DMEM/F12	PAN Biotech (Aidenbach)
DPBS	PAN Biotech (Aidenbach)
Fetales Rinderserum FBS	PAN Biotech (Aidenbach)
Gentamycin	PAN Biotech (Aidenbach)
Insulin-Transferrin-Selenium-Ethanolamine (ITS-X)	Gibco® Life Technologies (Carlsbad, USA)
RPMI 1640	PAN Biotech (Aidenbach)
Trypsin 10x	PAN Biotech (Aidenbach)
Trypsin 1x	5ml 10x-Trypsin, 45ml DPBS

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

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen

Zur dauerhaften Lagerung der Zellen wurden diese schonend eingefroren und in einem Tank mit flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Vorbereitung des Einfrierprozesses wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml 1x Trypsin vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Die Zellen wurden dann in 4 ml Nährmedium resuspendiert. Bei der folgenden Zentrifugation mit 300 x g über 3 min entstand ein Zellpellet, welches in 3 ml Einfriermedium resuspendiert wurde. Je 1 ml der Zellsuspension wurde in Kryovials gefüllt und zunächst über 24 Stunden bei -80 °C gelagert. Die permanente Lagerung erfolgte in Flüssigstickstoff bei -196 °C.

Zum Auftauen der Zellen wurden die mit gefrorener Zellsuspension gefüllten Kryovials zunächst vorsichtig bei Raumtemperatur aufgewärmt und anschließend für 30 s in ein 37 °C warmes Wasserbad getaucht. Es folgte die Resuspension mit 10 ml Nährmedium pro Kryovial. Nachdem die Zellsuspension vollständig aufgetaut war, wurde diese für 3 min bei 300 x g und 21 °C zentrifugiert. In einer T75 Zellkulturflasche wurden währenddessen 10 ml Nährmedium vorgelegt. Nach der Zentrifugation der Zellsuspension wurde der Überstand abgesaugt und das entstandene Zellpellet mit 1 ml Medium resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend in die vorbereitete T75 Zellkulturflasche überführt und bei 37 °C, einem CO₂-Gehalt von 5 % und gesättigter Luftfeuchtigkeit im Inkubator gelagert.

2.2.2 Kultivierung und Normalpassage der Zellen

Durch Mikroskopie der in den Kulturflaschen gelagerten Zellen wurde in regelmäßigen Abständen das Wachstum, die Morphologie sowie die Vitalität der Zellen beurteilt. Bei einer Konfluenz von 80-90 % erfolgte das Passagieren der Zellen. Hierfür wurden diese zunächst mit 10 ml PBS gewaschen und mit 2 ml 1x Trypsin bei 37 °C inkubiert. Mikroskopisch wurde nach 3-8 min beurteilt, ob sich die Zellen vom Boden der Kulturflasche gelöst hatten. Zur Beendigung der Trypsin-Reaktion wurden die Zellen mit 4 ml Nährmedium resuspendiert und in ein 15 ml fassendes Zentrifugationsgefäß überführt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 300 x g und 21 °C. Der entstandene Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet mit 1 ml Nährmedium resuspendiert. In einem zuvor gewählten Verhältnis wurde die Zellsuspension auf beschriftete und mit 10 ml Medium vorbereitete T75 Zellkulturflaschen überführt.

2.2.3 Zellaussaat, -ernte und Zellzahlbestimmung

Die Auswahl des Zellkulturgefäßes war von der Art des Versuchs abhängig, wobei hier in erster Linie 24-Well-Zellkulturplatten verwendet wurden. Zu Beginn der Zellversuche wurde für jede Zelllinie eine geeignete Zellzahl ermittelt, die pro Well ausgesät wurde und über den Inkubationszeitraum ein exponentielles Wachstum ermöglichte. Die Ernte erfolgte abhängig vom Versuch alle 24, 72 oder 120 h. Dabei wurden zunächst das Nährmedium aus dem Well abgesaugt und die Zellen mit 500 µl PBS gewaschen.

Anschließend wurden diese mit 100 µl 1x Trypsin bei 37 °C inkubiert. Nach 3-8 min wurde die Reaktion unter dem Mikroskop beurteilt. Bei ausreichendem Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturplatte wurde die Reaktion durch Suspendieren mit 200 µl Nährmedium beendet. Aus der entstandenen Zellsuspension wurden 50 µl in 10 ml CASYton überführt. Im CASY TT Cell Counter begann die Zellzählung mit dem fünfmaligen Invertieren der Flüssigkeit. Die darauffolgende Messung erkannte die vitalen Zellen, die sich im elektrischen Widerstand von toten Zellen und Zelltrümmern unterschieden. Die Grenzwerte wurden durch Kalibrierung auf die entsprechenden Zelllinien festgelegt.

2.3 Laserparameter und -aufbau

Bei dem verwendeten Laser handelte es sich um einen Diodenlaser des Typs „Wolf“. Die Wellenlänge des Lasers betrug 445 nm. Alle Messungen wurden im Modus „Continuous Wave“ (CW) durchgeführt. Die Leistung konnte zwischen 0,5 und 10 W in Schritten von 0,1 W variiert und mithilfe eines Leistungsdetektors verifiziert werden. Das Laserlicht wurde durch eine Glasfaser mit einem Außendurchmesser von $\varnothing_{\text{Außen}} = 320 \mu\text{m}$ und einem Innendurchmesser von $\varnothing_{\text{Innen}} = 283 \mu\text{m}$ geleitet. Das distale Faserende wurde mit 20 mm Überstand durch ein metallisches Führungsrohr geführt und mit einem Handstück fixiert. An der Faser kam es mit zunehmender Versuchsanzahl zu Abnutzungserscheinungen. Diese führten zu einer höheren Streuung des Laserlichts und machten in regelmäßigen Abständen eine Neukonfiguration der Faserspitze erforderlich.

Die 24-Well-Zellkulturplatte mit den zu behandelnden Zellen wurde auf einem Positioniertisch fixiert, welcher dreidimensional mit einer Genauigkeit von 1 µm computergesteuert bewegt werden konnte. Die Startposition wurde so gewählt, dass durch den Laserstrahl genau die Größe eines Wells abgedeckt wurde. Dadurch entsprach die Kegelfläche des Lasers etwa der Fläche eines Wells, die 2,06 cm² betrug. Die Position wurde zu Beginn der Versuche kalibriert und war somit stets wiederherstellbar. Da die Zellen in den einzelnen Wells behandelt wurden, wurde der Tisch nach jedem Bestrahlungsvorgang um 18,6 mm in x- bzw. y-Richtung bewegt. Der Versuchsaufbau wurde während der Zellversuche nicht verändert, um maximale Reproduzierbarkeit zu gewährleisten.

2.3.1 Temperaturuntersuchung

Zur Untersuchung der Temperaturentwicklung während der Laserbehandlung wurde eine 24-Well-Zellkulturplatte mit 1 ml Nährmedium pro Well befüllt. Das Nährmedium wies eine Ausgangstemperatur von 19,9 °C entsprechend der Raumtemperatur auf. Jedes Well wurde mit einer Leistung von 1 bis 7 W für eine Dauer von 30, 60 und 90 s bestrahlt. Die Temperatur wurde vor und nach Behandlung mit einem Temperaturfühler gemessen.

2.3.2 Leistungsmessung

Um die Leistungsverluste bei der Laserbehandlung zu quantifizieren, wurde ein Leistungsdetektor verwendet. Zwischen der Laserfaser und dem Leistungsdetektor wurde eine 24-Well-Zellkulturplatte platziert, die mit 0, 500 oder 1000 µl Medium pro Well befüllt wurde. Dadurch konnten die Einflussfaktoren auf den Leistungsverlust beurteilt werden. Die Behandlungsabstände wurden entsprechend angepasst.

2.3.3 Aussaat von Zellen für die Laserbehandlung

Für die Laserbehandlung wurden die Zellen in 24-Well-Zellkulturplatten gesät. Die in vorherigen Versuchen festgelegte Zellzahl betrug 20.000 SKOV3-Zellen bzw. 30.000 OVCAR3-Zellen pro Well. Nach dem Aussäen wurden die Zellen für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂-Anteil inkubiert. Anschließend wurde ihnen das Nährmedium entzogen und durch 500 µl neues Nährmedium ersetzt. In den Versuchen mit gleichzeitiger Zytostatikabehandlung wurde das Nährmedium zuvor mit der entsprechenden Menge des jeweiligen Zytostatikums versetzt. Es folgte die Laserbehandlung. Anschließend wurden pro Well nochmals 500 µl Nährmedium, ggf. versetzt mit Zytostatikum, hinzugefügt und die Zellen wieder bei 37 °C inkubiert.

2.4 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung und Datenanalyse wurde das Programm Microsoft Excel Version 2308 verwendet. Alle Daten verstehen sich als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung, normiert auf die Kontrolle (= 1) nach Durchführung von mindestens

zwei unabhängigen Versuchen pro Experiment. Für die Auswertung mit Microsoft Excel wurde der Student'sche t-Test verwendet, wobei die Signifikanzgrenzen $p < 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***) festgelegt wurden.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung eines In-Vitro-OC-Modells mit SKOV3- und OVCAR3-Zellen

Zur Ermittlung geeigneter Zellzahlen für die Kultur in 24-Well-Zellkulturplatten wurden jeweils 2, 4 und 6×10^5 SKOV3- (Abb. 2A) bzw. OVCAR3-Zellen (Abb. 2B) pro Well ausgesät. Die Zellen sollten ein annähernd exponentielles Wachstum zeigen, ohne gegen Ende der Inkubationszeit abzusterben. Unter Berücksichtigung der mikroskopischen Beobachtungen wurde für die nachfolgenden Versuche eine Zellzahl von 2×10^5 SKOV3- und 3×10^5 OVCAR3-Zellen ausgewählt.

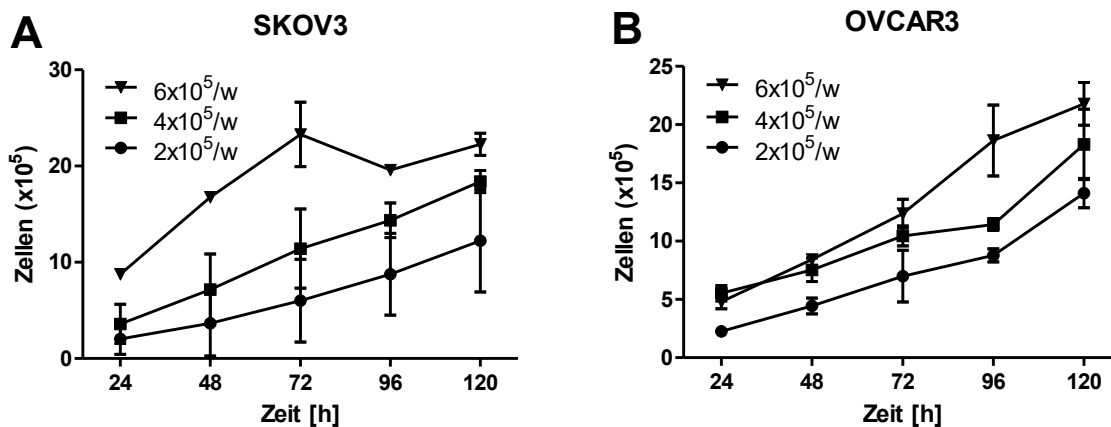


Abb. 2: Wachstumskinetik von SKOV3-Zellen und OVCAR3-Zellen

Wachstum von jeweils 2×10^5 , 4×10^5 und 6×10^5 SKOV3-Zellen (A) und OVCAR3-Zellen (B) über einen Zeitraum von 120 h. Die Ergebnisse stammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind Mittelwert $\pm$ SD der absoluten Zellzahlen.

3.2 Wachstum von SKOV3- und OVCAR3-Zellen mit Carbo, Pacli und Doce

Um den Einfluss des Zytostatikums und der Laserstrahlen auf SKOV3- und OVCAR3-Zellen quantifizieren zu können, wurden beide Noxen zunächst einzeln beobachtet. Über einen Zeitraum von 120 h wurde der Effekt von Carbo, Doce und Pacli auf das Wachstum von SKOV3- (Abb. 3) und OVCAR3-Zellen (Abb. 4) beobachtet. Getestet wurden jeweils drei verschiedene Konzentrationen aus einem in der Literatur beschriebenen Bereich. Ziel war es, eine Konzentration zu finden, bei der eine Wachstumshemmung von etwa 20 % erreicht wurde. Damit konnten sowohl eine signifikante Einzelwirkung als auch

synergistische Effekte in der Kombination von Zytostatikum und Laserstrahlung gezeigt werden.

Bei der Inkubation von SKOV3-Zellen mit Carbo (Abb. 3A) zeigte sich bei der höchsten und der niedrigsten Konzentration ein signifikanter antiproliferativer Effekt ab Inkubationszeiten von 96 h (0,3 μM) und 120 h (3,0 μM). Bei einer Konzentration von 1,0 μM Carbo konnte keine signifikante Hemmung beobachtet werden. Weder die gewünschte Zellwachstumshemmung von 20 % noch eine vollständige Hemmung konnten durch die gewählten Carbo-Konzentrationen erreicht werden. Für weitere Versuche wurde eine Konzentration von 3,0 μM Carbo verwendet.

Unter dem Einfluss von Doce (Abb. 3B) zeigte sich für 0,3 nM kein signifikanter antiproliferativer Effekt, dafür aber bei 0,5 nM, insbesondere bei längerer Inkubationszeit (ab 72 h). Bei einer Konzentration von 1,0 nM konnte ab einer Inkubationsdauer von 48 h eine signifikante Hemmung gezeigt werden.

Bei der Behandlung mit Pacli (Abb. 3C) zeigten die SKOV3-Zellen ein ähnliches Verhalten. Bei einer Konzentration von 0,5 nM konnte kein signifikanter antiproliferativer Effekt erzielt werden. Dieser zeigte sich bei 2,0 nM ab einer Inkubationszeit von 48 h, bei 10,0 nM über den kompletten Inkubationszeitraum.

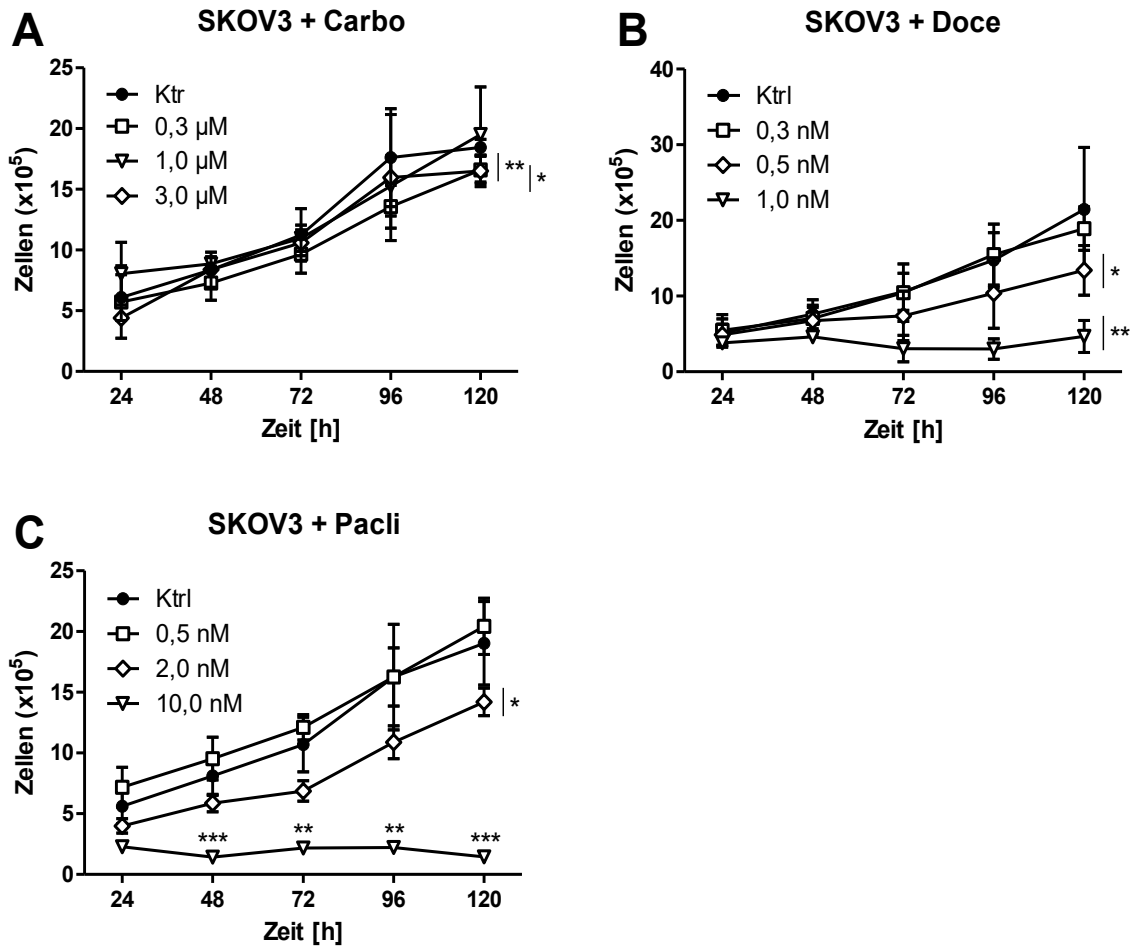


Abb. 3: Wachstumskinetik von SKOV3-Zellen mit Carbo, Pacli und Doce

Wachstum von SKOV3-Zellen unter Einfluss von unterschiedlichen Konzentrationen von Carbo (A), Doce (B) und Pacli (C) über einen Zeitraum von 120 h. Die Ergebnisse stammen aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind Mittelwert $\pm$ SD der absoluten Zellzahlen. Die Auswertung erfolgte mit dem Studentschen t-Test ($p < 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)).

Die gleichen Ansätze wurden mit OVCAR3-Zellen (Abb. 4) durchgeführt. Das Zellwachstum unter Carbo (Abb. 4A) veränderte sich bei einer Konzentration von 0,3 µM nicht signifikant. Bei einer Konzentration von 1,0 µM konnte nach 120 h Inkubation, bei 3,0 µM ab einer Inkubationsdauer von 96 h eine signifikante Inhibition festgestellt werden.

Wie bei Carbo erbrachte auch die geringste Konzentration von Doce (0,05 nM) (Abb. 4B) keine signifikante Wachstumshemmung. Bei einer Konzentration von 0,2 nM Doce kam es nach einer Inkubationsdauer von 120 h, bei 1,0 nM Doce nach 72 h zu einer signifikanten Hemmung.

Auch bei Pacli (Abb. 4C) hatte die niedrigste gewählte Konzentration von 0,5 nM keinen signifikanten antiproliferativen Effekt, ebenso wie 1,0 nM. Unter der doppelten Konzentration (2,0 nM) zeigte sich eine signifikante Inhibition nach 120 h.

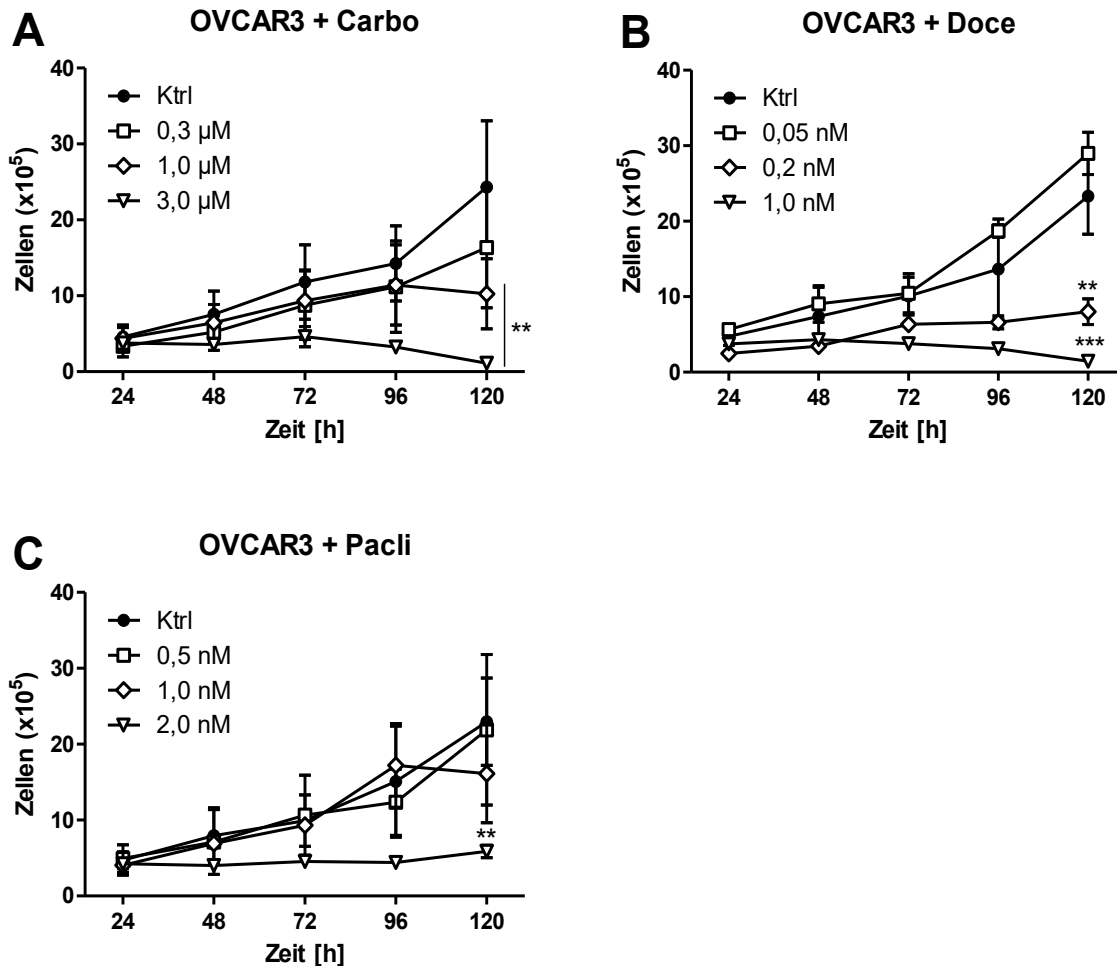


Abb. 4: Wachstumskinetik von OVCAR3-Zellen mit Carbo, Pacli und Doce
Wachstum von OVCAR3-Zellen unter Einfluss von unterschiedlichen Konzentrationen von Carbo (A), Doce (B) und Pacli (C) über einen Zeitraum von 120 h. Die Ergebnisse stammen aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind Mittelwert $\pm$ SD der absoluten Zellzahlen. Die Auswertung erfolgte mit dem Studentischen t-Test ($p < 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)).

3.3 Charakterisierung physikalischer Parameter beim Einsatz von Laser im In-Vitro-OC-Modell

Mit den technischen Daten des Lasers und dem Durchmesser des Laserlichtkegels ließ sich der Abstand zwischen der Laserfaser und dem Zellrasen auf dem Wellboden

berechnen. Für eine größtmögliche Vergleichbarkeit sollte dieser bei allen Versuchen konstant bleiben und die Kalibrierung zu Beginn war entsprechend wichtig. Der verwendete Laser verfügte über eine Numerische Apertur $NA = 0,22$ mit $NA = \sin(\alpha/2)$. Anhand dessen ließen sich der Öffnungswinkel $\alpha = 25,4^\circ$ und der halbe Öffnungswinkel $\frac{\alpha}{2} = 12,7^\circ$ des Laserstrahls bestimmen. Der Lichtkegel, den der Laser bildete, sollte genau das Well einer 24-Well-Zellkulturplatte abdecken und hatte somit einen Durchmesser von $16,2 \pm 0,2$ mm (Abb. 5). Daraus resultierte der Radius $r = 8,1$ mm. Bei der Berechnung konnte man ein rechtwinkliges Dreieck voraussetzen. Die Gegenkathete war dabei der Radius r subtrahiert mit dem halben Faserdurchmesser f . Nach Division durch $\tan(\frac{\alpha}{2})$ ließ sich der Abstand zwischen Laserfaser und Wellboden $x = 35,2$ mm bestimmen. Mit diesem Wert konnte die Nullposition des Lasers kalibriert und zu Beginn jedes Versuchs wiederhergestellt werden.

r = Radius eines Wells

f = Außendurchmesser der Laserfaser

x = Abstand Laserfaser $\leftrightarrow$ Well

α = Öffnungswinkel Laserstrahl

$$x = \frac{\left(r - \frac{f}{2}\right)}{\tan\left(\frac{\alpha}{2}\right)}$$

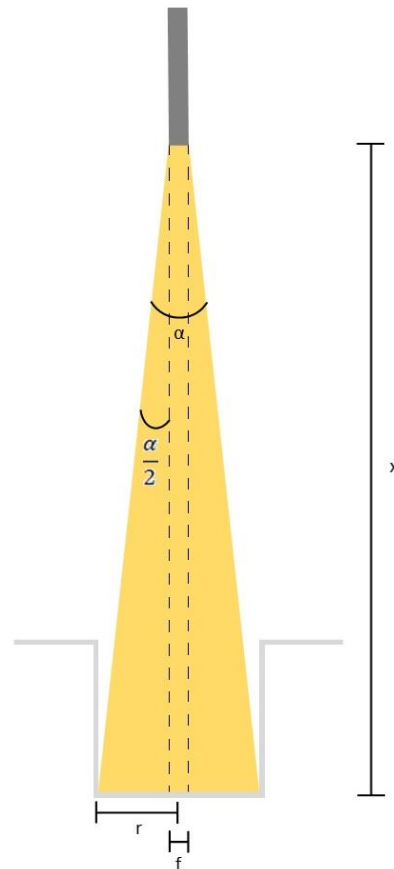


Abb. 5: Laserparameter

Schematische Darstellung des Laserstrahls und eines Wells einer 24-Well-Zellkulturplatte zur Berechnung des Behandlungsabstands x mithilfe des Öffnungswinkels α , des Laserfaserdurchmessers f und des Radius r eines Wells.

Durch den Versuchsaufbau bei der Laserbehandlung der Zellen kam es aus technischen Gründen zu Leistungsverlusten des Lasers. Die Leistung konnte durch einen Leistungsdetektor gemessen werden. Multipliziert mit der Behandlungszeit in s ließ sich daraus die Energie in J und unter Berücksichtigung der Kegelfläche von 2,06 cm² (entsprach der Fläche eines Wells) die applizierte Dosis in J/cm² berechnen.

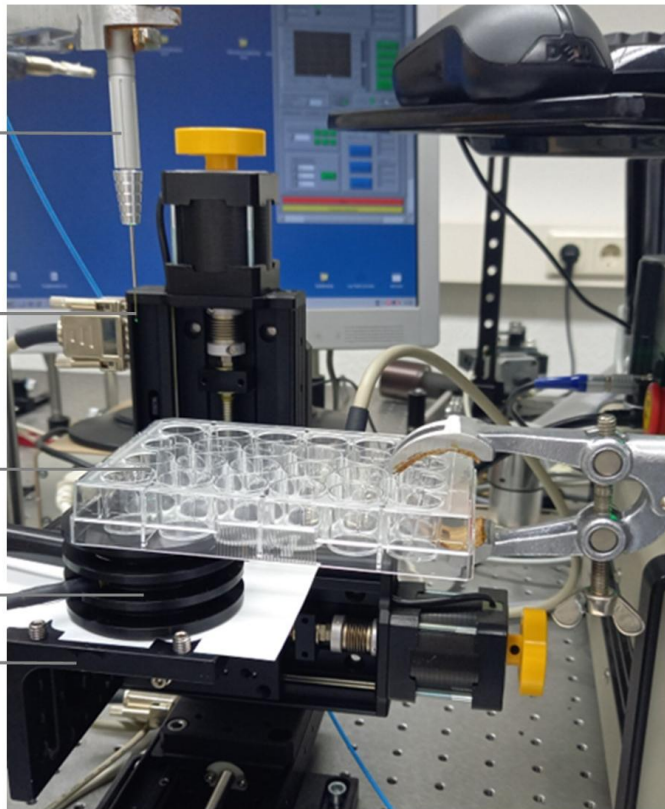
$$\text{Leistung [W]} \times \text{Behandlungszeit [s]} = \text{Energie [J]}$$

$$\frac{\text{Energie [J]}}{\text{Fläche eines Wells [cm}^2\text{]}} = \text{applizierte Dosis } \left[\frac{\text{J}}{\text{cm}^2}\right]$$

Wie Abb. 6 zu entnehmen ist, wurde der 36 mm hohe Detektor auf dem beweglichen xyz-Tisch platziert. Dieser befand sich 24 mm unter der normalen Behandlungsposition (Nullposition). Die Distanz zwischen der Detektorfläche und den Auflagepunkten der 24-Well-Zellkulturplatte betrug 12 mm. Die Geometrie des Detektors erlaubte keine vollständig korrekte Nachstellung des Versuchsaufbaus, da sich eine 12 mm hohe Luftschicht zwischen Zellkulturplatte und Leistungsdetektor befand. Die Verluste zwischen der Laserstrahlung und der Atmosphäre waren jedoch vernachlässigbar und wurden nicht weiter berücksichtigt.

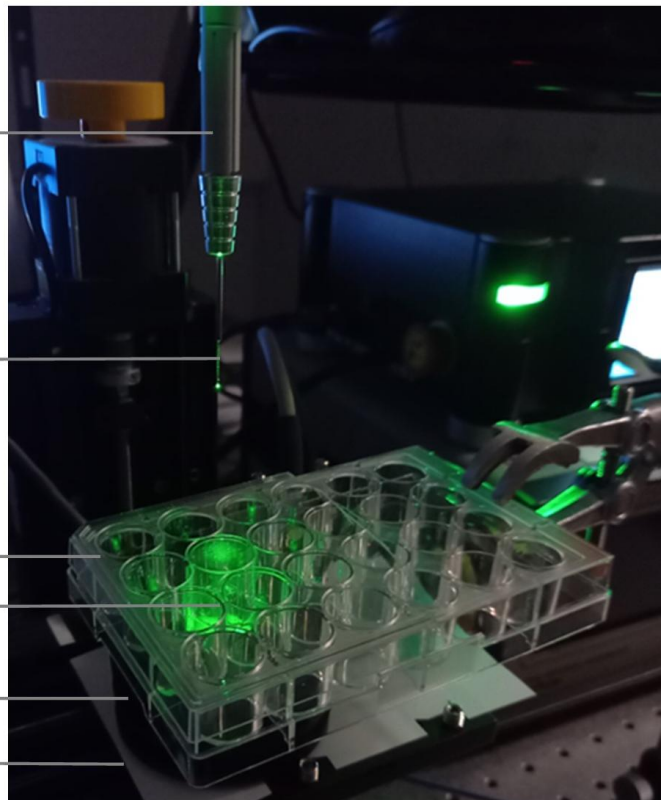
A

Handstück
Glasfaser
24-Well-Zellkulturplatte
Leistungsdetektor
Positioniertisch



B

Handstück
Glasfaser
24-Well-Zellkulturplatte
Lichtkegel
Leistungsdetektor
Positioniertisch



C

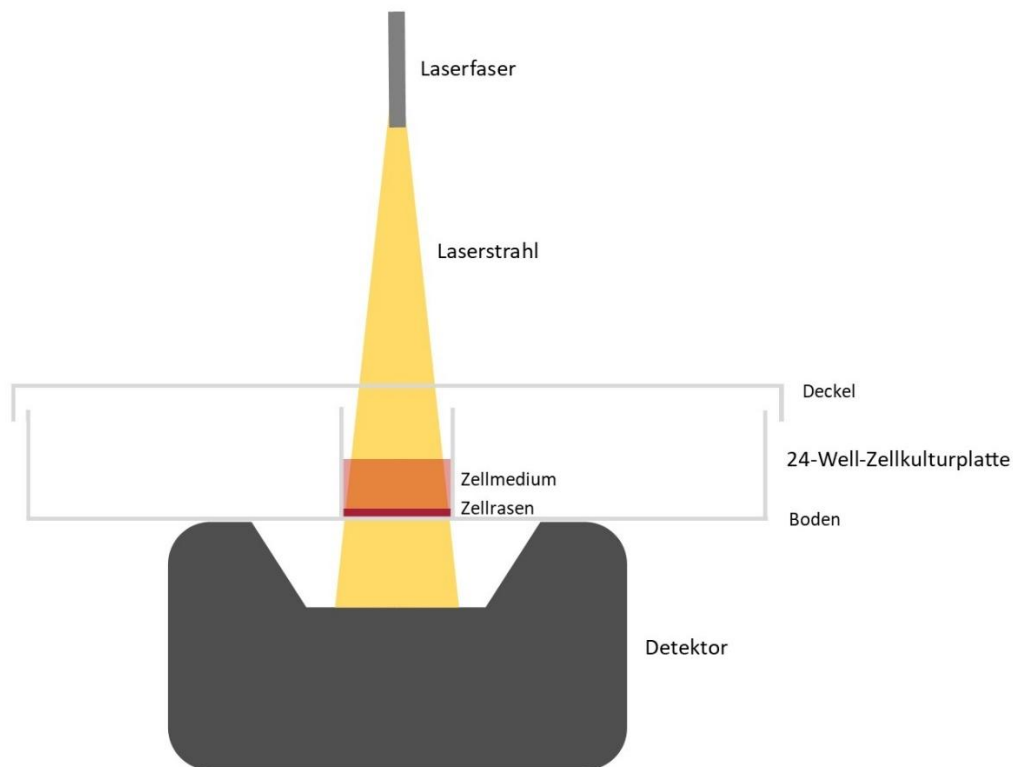


Abb. 6: Aufbau zur Detektion des Leistungsabfalls

Fotografische (A, B) und schematische (C) Darstellung des Versuchsaufbaus zur Detektion des Leistungsabfalls. Abgebildet sind die Laserfaser (A ohne Laserstrahl, B mit Laserstrahl), die 24-Well-Zellkulturplatte und der Leistungsdetektor. Der Laserstrahl traf in angegebener Reihenfolge auf folgende Schichten: Deckel der 24-Well-Zellkulturplatte, Zellkulturmedium, Zellrasen, Boden der 24-Well-Zellkulturplatte, Leistungsdetektor.

Bei der Platzierung der 24-Well-Zellkulturplatte auf dem Detektor befanden sich entsprechend den Abbildungen zwei Schichten zwischen Laserfaser und Detektor: der Deckel sowie der Boden der 24-Well-Zellkulturplatte. Getestet wurden dem zufolge jeweils der Leistungsabfall, der auf den Boden bzw. den Deckel im Laserstrahl zurückzuführen war. Unter Zellversuchsbedingungen befand sich außerdem Zellkulturmedium im Well. Im vorliegenden Versuch wurde der Leistungsabfall durch 500 µl und 1000 µl Medium in einem Well jeweils mit und ohne Deckel getestet. Aus Sterilitätsgründen war es unvermeidbar, dass bei den Zellversuchen die 24-Well-Zellkulturplatte geschlossen blieb, sodass die Messungen ohne Deckel nur der Vollständigkeit dienten. In folgenden Versuchen wurden die Zellen immer in 500 µl Medium behandelt.

In Tab. 1 ist die Restleistung in % der eingestellten Laserleistung aufgeführt. Durch den Detektor kann bereits ohne Hindernisse im Lichtkegel ein Leistungsverlust von 20 bis 25 % über die Glasfaser des Lasers ermittelt werden. Bei niedrigen Leistungen hat die leere 24-Well-Zellkulturplatte im Laserstrahl geringere Auswirkungen auf die Leistung. Erst ab 2 W wird durch die Platte ein höherer Leistungsverlust hervorgerufen als durch den Laser allein. Ist die Platte mit Zellmedium gefüllt, kann ein höherer Leistungsabfall beobachtet werden, wobei dieser bei 1000 µl nochmals höher ist als bei 500 µl. Insgesamt nimmt der prozentuale Anteil der detektierten Restleistung bei steigender Leistung ab. Ein 10 W starker Laserstrahl, der vor dem Detektor auf eine mit 1000 µl Medium gefüllte und geschlossene 24-Well-Zellkulturplatte trifft, verliert knapp 50 % seiner Leistung. Bei 1 W können unter gleichen Bedingungen noch 60 % der Leistung gemessen werden.

Wichtig ist dies im Hinblick auf die Zellversuche. Es ist festzustellen, dass die vollständige eingestellte Leistung die Zellen nicht erreicht. Somit waren diese einer geringeren Energie ausgesetzt, was bei weiterführenden Versuchen berücksichtigt werden musste.

Tab. 1: Detektierte Restleistung des Laserstrahls

Getestet wurden Leistungen von 0,5 bis 10 W. Die detektierte Restleistung ist als Anteil in % der eingestellten Laserleistung angegeben.

Einstellung [W]	Leer	Ohne Deckel		Boden + Deckel	Ohne Deckel		Mit Deckel	
		nur Boden	nur Deckel		500 µl Zellmedium	1000 µl Zellmedium	500 µl Zellmedium	1000 µl Zellmedium
0,5	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0	60,0	80,0	60,0
1	70,0	70,0	70,0	70,0	70,0	60,0	60,0	60,0
2	75,0	70,0	70,0	65,0	65,0	60,0	65,0	55,0
3	76,7	70,0	70,0	66,7	66,7	63,3	63,3	56,7
4	77,5	70,0	70,0	65,0	67,5	62,5	62,5	55,0
5	80,0	72,0	72,0	68,0	68,0	64,0	64,0	56,0
6	76,7	70,0	70,0	65,0	66,7	60,0	61,7	55,0
7	75,7	68,6	68,6	62,9	65,7	60,0	60,0	52,9
8	75,0	67,5	67,5	62,5	65,0	58,8	58,8	52,5
9	74,4	67,8	67,8	62,2	64,4	58,9	58,9	52,2
10	75,0	68,0	68,0	62,0	65,0	59,0	58,0	51,0

3.4 Temperaturentwicklung bei Laserbehandlung

Laserstrahlung ist eine energiereiche elektromagnetische Welle und führt zu einer Erwärmung des behandelten Materials. Da im vorliegenden Projekt thermische Effekte auf das Zellwachstum ausgeschlossen werden sollten, wurde die Temperaturentwicklung überprüft. Die Wachstumsinhibition der Zellen sollte keiner hitzebedingten Inaktivierung geschuldet sein und die Temperaturänderung ΔT während des Versuchs sollte möglichst gering gehalten werden. Gleichzeitig galt es zu prüfen, ob die Temperatur einen Einfluss auf die Membranpermeabilität der Zellen hat.

1 ml Zellkulturmedium wurde in einem Well einer 24-Well-Zellkulturplatte mit Laserstrahlen behandelt und die Temperatur vor und nach Behandlung gemessen. Daraus ließ sich die Temperaturänderung ΔT berechnen. Abb. 7 zeigt die Ergebnisse im Leistungsspektrum von 1 bis 7 W und Expositionszeiten von 30, 60 und 90 s. Die Temperatur des Mediums entsprach zu Versuchsbeginn der Raumtemperatur von 19,9 °C. Der Versuch wurde zwei Mal durchgeführt und die Temperaturänderung gemittelt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Temperatur mit zunehmender Leistung und Zeit anstieg. Zwischen Behandlungszeit (bis 90 s) und Temperaturänderung konnte ein annähernd linearer Zusammenhang festgestellt werden. Der Temperaturanstieg war bei niedrigeren Leistungen geringer als bei höheren Leistungen. So führte eine Laserbehandlung mit einer Leistung von 1 W zu einer Zunahme der Temperatur um etwa 0,9 K pro 30 s. Bei einer Laserbehandlung von 2 W nahm die Temperatur um etwa 2 K pro 30 s zu, bei 3 W um 3,3 K pro 30 s. Auch zwischen Leistung (bis 5 W) und Temperaturänderung wurde bei gleichbleibender Behandlungszeit ein annähernd linearer Zusammenhang gezeigt. Bei 30 s ergab sich eine Erwärmung um 1,1 K/W, bei 60 s um 2,3 K/W und bei 90 s um 3,3 K/W.

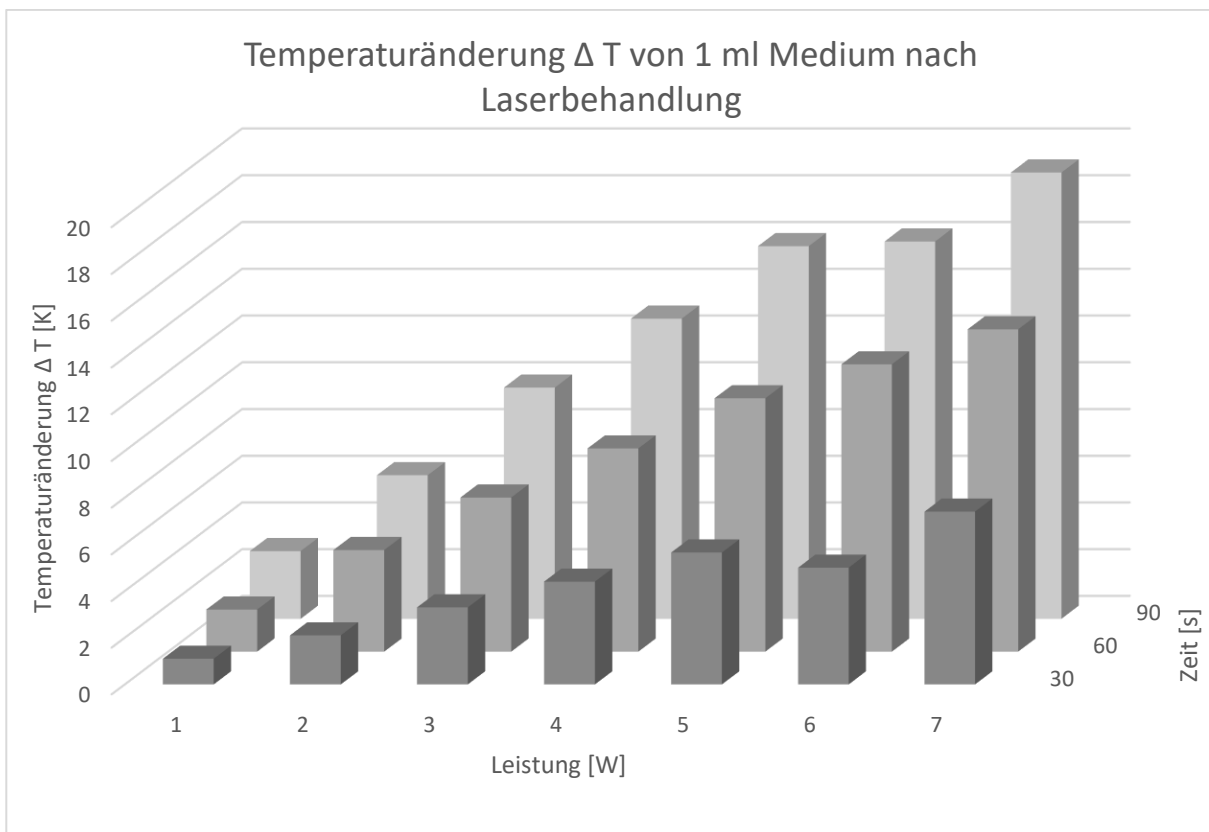


Abb. 7: Temperaturentwicklung durch Laserbehandlung

Temperaturänderung von 1 ml SKOV3-Medium bei einer Laserbehandlung mit 1 bis 7 W über 30, 60 und 90 s bei 445 nm. Dargestellt sind die Mittelwerte zweier unabhängiger Experimente.

3.5 Wachstum von SKOV3- und OVCAR3-Zellen nach Laserbehandlung

Nachdem die Versuchsbedingungen für den Laser eingehend überprüft waren, sollte der Einfluss der Laserstrahlung auf das Zellwachstum von SKOV3- und OVCAR3-Zellen beobachtet werden. Dafür wurden die Zellen 24 h nach dem Aussäen mit dem Laser behandelt. Getestet wurden Leistungen von 0,5 und 1 W sowie Behandlungszeiten zwischen 30 und 120 s. Das Zellwachstum wurde 24, 72 und 120 h nach Behandlung ermittelt.

Bei SKOV3-Zellen (Abb. 8) konnten zunächst unter keiner der getesteten Parameterkombinationen signifikante Unterschiede im Zellwachstum nachgewiesen werden. In darauffolgenden Versuchen wurden dementsprechend höhere Leistungen getestet.

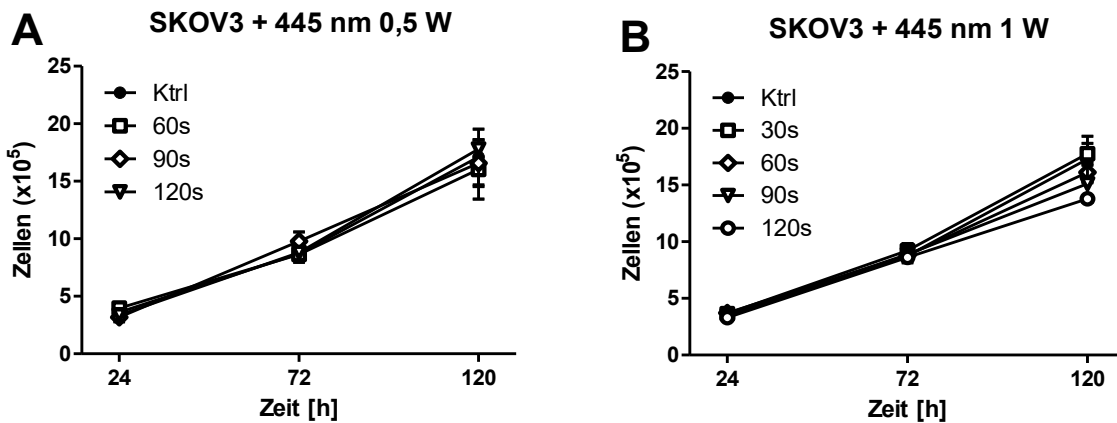


Abb. 8: Wachstumskinetik von SKOV3-Zellen nach Laserbehandlung

Wachstum von SKOV3-Zellen nach einer Laserbehandlung mit 0,5 W (A) und 1 W (B) über 30 bis 120 s bei 445 nm. Die Zellzahl wurde zu drei Zeitpunkten über einen Zeitraum von 120 h gemessen. Die Ergebnisse stammen aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind Mittelwert $\pm$ SD der absoluten Zellzahlen. Die Auswertung erfolgte mit dem Studentschen t-Test ($p < 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)).

OVCAR3-Zellen (Abb. 9) hingegen zeigten bei 90 s Laserbehandlung nach 72 h einen signifikanten antiproliferativen Effekt, der bei der Zellzahlmessung nach 120 h deutlich sichtbar war. Dies galt sowohl für eine Behandlung mit 0,5 W als auch mit 1 W.

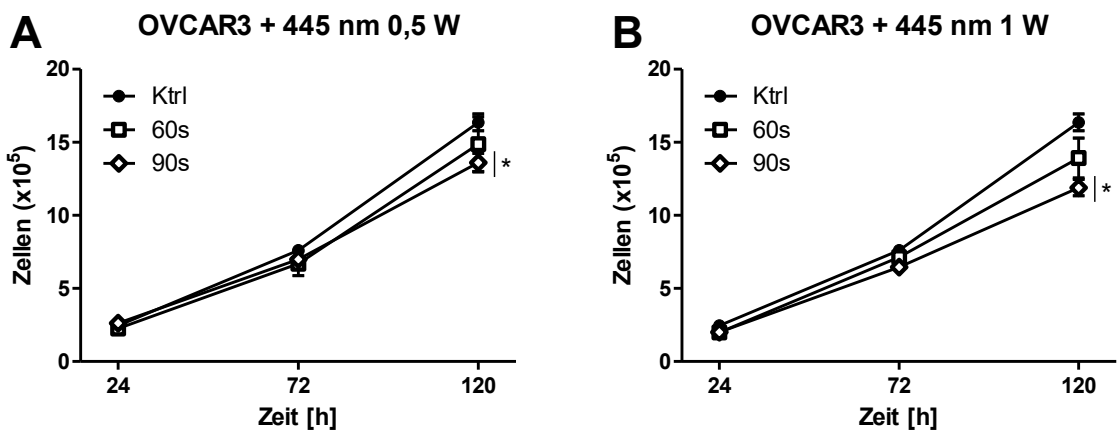


Abb. 9: Wachstumskinetik von OVCAR3-Zellen nach Laserbehandlung

Wachstum von OVCAR3-Zellen nach einer Laserbehandlung mit 0,5 W (A) und 1 W (B) über 60 und 90 s bei 445 nm. Die Zellzahl wurde zu drei Zeitpunkten über einen Zeitraum von 120 h gemessen. Die Ergebnisse stammen aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind Mittelwert $\pm$ SD der absoluten Zellzahlen. Die Auswertung erfolgte mit dem Studentschen t-Test ($p < 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)).

Da die ersten beiden Messzeitpunkte im Hinblick auf die Fragestellung weniger relevant waren, wurde in späteren Versuchen nur das Zellwachstum nach 120 h Inkubation gemessen. Weitergehend wurden für beide Zelllinien Leistungen von 1, 2, 3 und 4 W mit Behandlungszeiten von 60, 90 und 120 s getestet. Die Kontrolle (=0 W) entspricht jeweils der Population, die nicht mit Laserstrahlen behandelt wurde.

Bei Exposition von SKOV3-Zellen gegenüber Laser (Abb. 10) gab es bei einer Behandlung von 60 s ab einer Leistung von 2 W einen signifikanten antiproliferativen Effekt, bei 90 s und 120 s zeigte sich dieser erst ab 3 W.

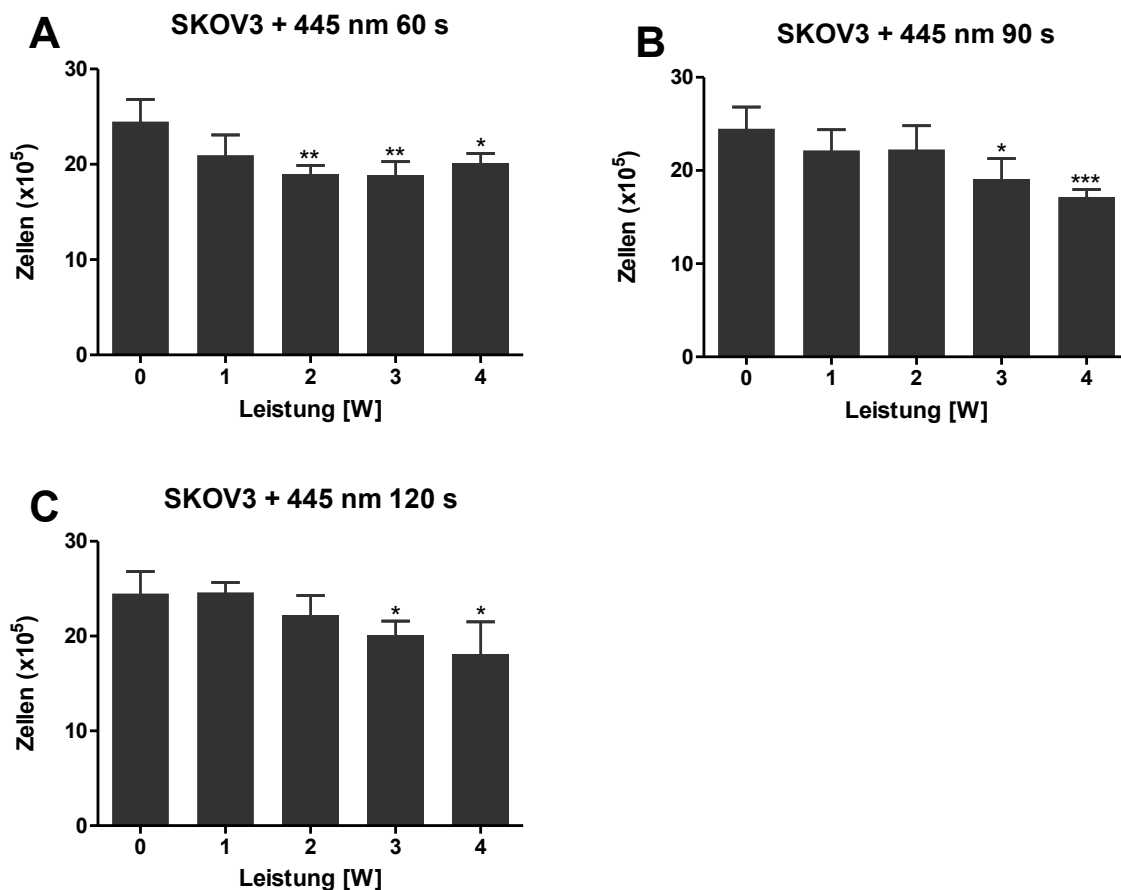


Abb. 10: Wachstum von SKOV3-Zellen nach Laserbehandlung

Wachstum von SKOV3-Zellen nach einer Laserbehandlung mit 1 bis 4 W (0 W = keine Laserbehandlung) über 60 s (A), 90 s (B) und 120 s (C) bei 445 nm. Die Zellzahl wurde nach 120 h gemessen. Die Ergebnisse stammen aus mindestens vier unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind Mittelwert $\pm$ SD der absoluten Zellzahlen. Die Auswertung erfolgte mit dem Studentischen t-Test ($p < 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)).

Wie oben dargestellt hatte eine Laserbehandlung von 60 s bei OVCAR3-Zellen (Abb. 11) keinen signifikanten Effekt auf die Zellproliferation. Ein signifikanter Wachstumsunterschied bei 1 W und 90 s Behandlung ergab sich nicht. Dieser stellte sich bei diesen Versuchen erst ab 3 W ein. Bei einer Behandlungsdauer von 120 s war eine signifikante Zellinhibition ebenfalls erst ab 3 W erkennbar.

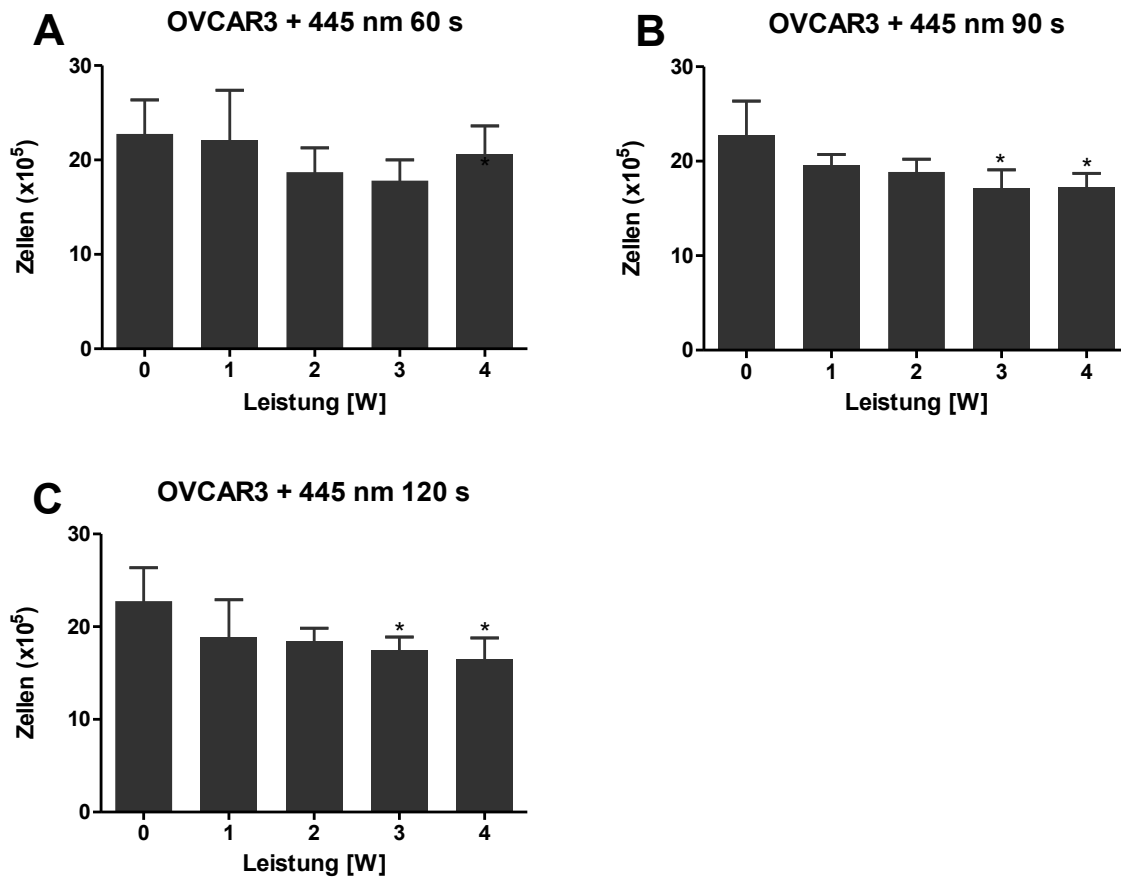


Abb. 11: Wachstum von OVCAR3-Zellen nach Laserbehandlung

Wachstum von OVCAR3-Zellen nach einer Laserbehandlung mit 1 bis 4 W (0 W = keine Laserbehandlung) über 60 s (A), 90 s (B) und 120 s (C) bei 445 nm. Die Zellzahl wurde nach 120 h gemessen. Die Ergebnisse stammen aus mindestens vier unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind Mittelwert $\pm$ SD der absoluten Zellzahlen. Die Auswertung erfolgte mit dem Studentschen t-Test ($p < 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)).

Da die Behandlung von SKOV3-Zellen über 60s und von OVCAR3-Zellen über 90 s die größte Konstanz zeigte, wurde der Fokus in den folgenden Versuchen, insbesondere bei der Laserbehandlung in Anwesenheit der Zytostatika, auf diese beiden Behandlungszeiten gelegt. Der Vollständigkeit halber und um einen ausreichenden

Vergleich zwischen den Zelllinien erhalten zu können, wurden die anderen Zeiten dennoch weiterhin getestet.

3.6 Kombination von Laser- und Zytostatikabehandlung

Nachdem Zytostatikakonzentrationen festgelegt waren, bei denen das Zellwachstum um annähernd 20 % gehemmt wurde, wurde die Wirkstoffbehandlung mit der Laserbehandlung kombiniert. SKOV3-Zellen wurden jeweils mit 3,0 μM Carbo, 0,5 nM Doce oder 2,0 nM Pacli inkubiert. Bei OVCAR3-Zellen wurden Konzentrationen von 0,5 μM Carbo, 0,2 nM Doce und 1,0 nM Pacli festgelegt. Die Zellen wurden zunächst mit den Laserstrahlen behandelt und anschließend mit dem Zytostatikum inkubiert. Insbesondere die SKOV3-Zellen reagierten sehr sensibel auf die Laserbehandlung. Es konnte eine signifikante Zellinhibition bei beiden Zelllinien gezeigt werden. Allerdings war diese auch bei alleiniger Laserbehandlung nachweisbar und nicht zielführend bei der Untersuchung synergistischer Effekte der Kombinationsbehandlung. Das Regime wurde deshalb unter der Hypothese geändert, dass die Laserstrahlen nur in einem kurzen Zeitraum während der Behandlung auf die Zellmembran und deren Transportmechanismen wirken, sodass die Zytostatika nur in dieser Zeit verstärkt in die Zelle eindringen können. In den folgenden Versuchen wurden die Zellen daher vor der Laserbehandlung mit dem Zytostatikum inkubiert und dementsprechend in Anwesenheit des Zytostatikums mit den Laserstrahlen behandelt.

Dafür wurde den Zellen nach 24 h Inkubation das Nährmedium entzogen und gegen 500 μl Medium ersetzt, welches mit der festgelegten Zytostatikakonzentration versetzt war. Anschließend wurden die Zellen mit Laserstrahlen behandelt. Danach wurden nochmals 500 μl Medium mit der festgelegten Zytostatikakonzentration hinzugefügt, sodass die Gesamtwirkstoffkonzentration unverändert blieb. Bei der Laserbehandlung wurden Leistungen von 1 W bis 3 W angewendet. Die Kontrolle (=0 W) entspricht jeweils der Population, die nicht mit Laserstrahlen behandelt wurde.

Bezüglich der Fragestellung, ob eine Zytostatikabehandlung besser wirkt, wenn die Zellen mit Laserstrahlung vorbehandelt wurden, ist besonders der Unterschied zwischen dem Zellwachstum bei alleiniger Zytostatikabehandlung im Vergleich zu dem Zellwachstum bei

der kombinierten Behandlung relevant. Dieser wurde mithilfe des Studentischen t-Tests quantifiziert und grafisch gekennzeichnet ($p < 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)).

Dargestellt ist die Behandlung von SKOV3-Zellen mit Behandlungszeiten von 60 s und 90 s bei Leistungen von 1, 2 und 3 W (Abb. 12). Die Kombination einer 60-sekündigen Laserbehandlung von SKOV3-Zellen mit 3,0 μ M Carbo zeigte keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle ohne Laser. Allerdings war erkennbar, dass die alleinige Behandlung mit Carbo nicht inhibierend auf das Zellwachstum wirkte. Dies entspricht den Ergebnissen der vorherigen Versuche mit Carbo. Bei 90 s ergab sich ab 2 W ein signifikanter Unterschied zwischen einfacher Zytostatika- und kombinierter Behandlung.

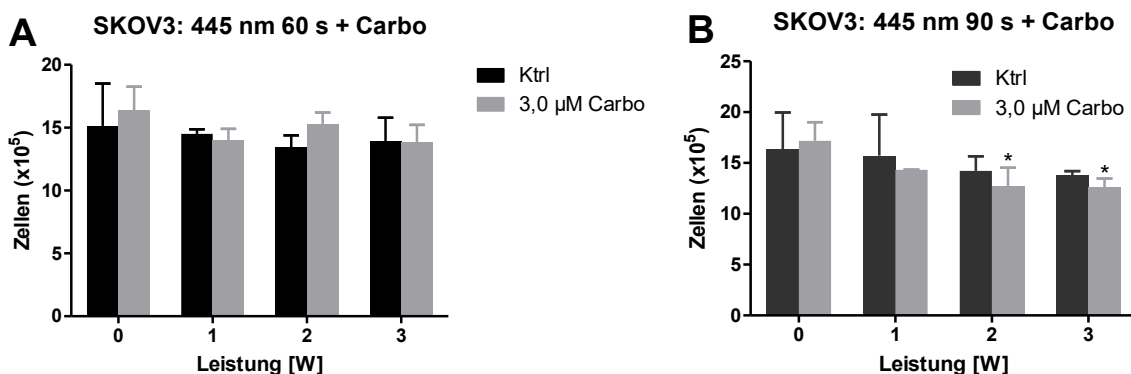


Abb. 12: Wachstum von SKOV3-Zellen unter Carbo + Laser

Wachstum von SKOV3-Zellen nach Zugabe von 3,0 μ M Carbo und nachfolgender Laserbehandlung mit 1 bis 3 W (0 W = keine Laserbehandlung) über 60 s (A) und 90 s (B) bei 445 nm. Die Zellzahl wurde nach 120 h gemessen. Die Ergebnisse stammen aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind Mittelwert $\pm$ SD der absoluten Zellzahlen. Die Auswertung erfolgte mit dem Studentischen t-Test ($p < 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)).

Das gleiche Bild zeigte sich bei den Versuchen mit Doce (Abb. 13), wobei aufgrund eines Versuchsfehlers die Messung mit einer Laserbehandlung von 90 s und 3 W ausgeschlossen werden musste. Im abgebildeten Leistungsbereich konnten weder bei 60 s noch bei 90 s Behandlung signifikante Wachstumsunterschiede zur Kontrolle ohne Laserbehandlung dargestellt werden. Jedoch wurde hier auch allein durch Doce keine signifikante Wachstumshemmung festgestellt, auch wenn die festgelegte Konzentration von 0,5 nM in Vorversuchen einen antiproliferativen Effekt hervorgerufen hatte.

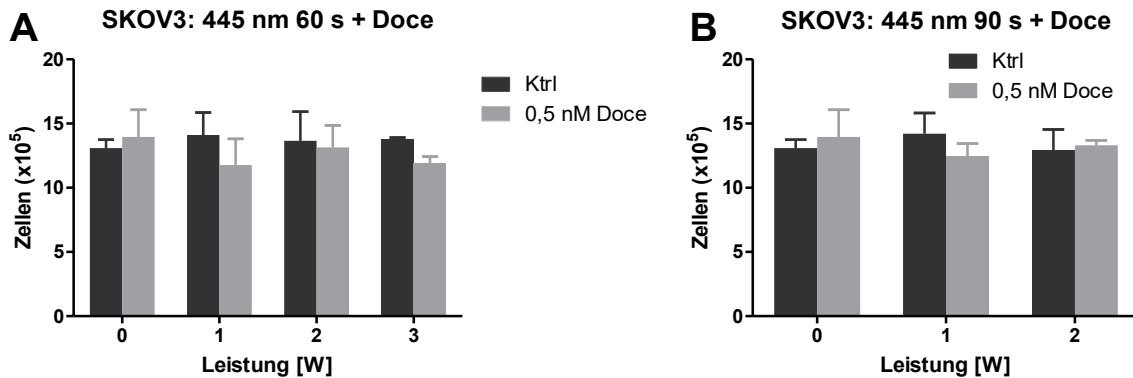


Abb. 13: Wachstum von SKOV3-Zellen unter Doce + Laser

Wachstum von SKOV3-Zellen nach Zugabe von 0,5 nM Doce und nachfolgender Laserbehandlung mit 1 bis 3 W (A) bzw. 1 und 2 W (B) (0 W = keine Laserbehandlung) über 60 s (A) und 90 s (B) bei 445 nm. Die Zellzahl wurde nach 120 h gemessen. Die Ergebnisse stammen aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind Mittelwert $\pm$ SD der absoluten Zellzahlen. Die Auswertung erfolgte mit dem Studentschen t-Test ($p < 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)).

Bei Pacli (Abb. 14) wurden Behandlungszeiten von 60 s und 90 s mit Leistungen von 1 bis 3 W getestet, wobei keine signifikanten Unterschiede zur alleinigen Behandlung mit Pacli festgestellt werden konnten. Die SKOV3-Zellen reagierten auch hier nicht signifikant auf die in Vorversuchen festgelegte Pacli-Konzentration.

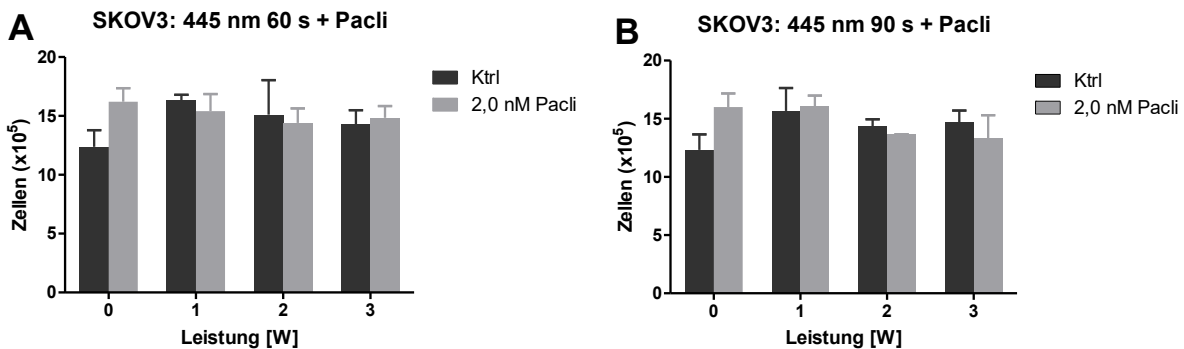


Abb. 14: Wachstum von SKOV3-Zellen unter Pacli + Laser

Wachstum von SKOV3-Zellen nach Zugabe von 2,0 nM Pacli und nachfolgender Laserbehandlung mit 1 bis 3 W (0 W = keine Laserbehandlung) über 60 s (A) und 90 s (B) bei 445 nm. Die Zellzahl wurde nach 120 h gemessen. Die Ergebnisse stammen aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind Mittelwert $\pm$ SD der absoluten Zellzahlen. Die Auswertung erfolgte mit dem Studentschen t-Test ($p < 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)).

Insgesamt erbrachte die Behandlung von SKOV3-Zellen mit Laserstrahlung und Zytostatika mit einer Ausnahme keine aussagekräftigen Ergebnisse, da die festgelegten Konzentrationen der Zytostatika nicht den in den Vorversuchen gezeigten antiproliferativen Effekt hervorgerufen haben.

OVCAR3-Zellen wiederum reagierten stärker auf die kombinierte Behandlung. Die Kombinationen von Carbo, Doce, Pacli und Laserstrahlen erbrachten jeweils vergleichbare Effekte auf das Zellwachstum.

Eine Kombination von Laserbehandlung und 0,5 μM Carbo (Abb. 15) zeigte bei OVCAR3-Zellen signifikante Wachstumsunterschiede im Vergleich zur Kontrolle mit Carbo allein, insbesondere bei höheren Laserleistungen. Eine Laserbehandlung von 60 s Dauer mit einer Leistung von 3 W ergab in Kombination im Vergleich zur einfachen Behandlung mit Carbo einen signifikanten Unterschied. Bei 90 s Behandlung zeigte sich eine signifikante Wachstumsinhibition bereits ab einer Leistung von 2 W.

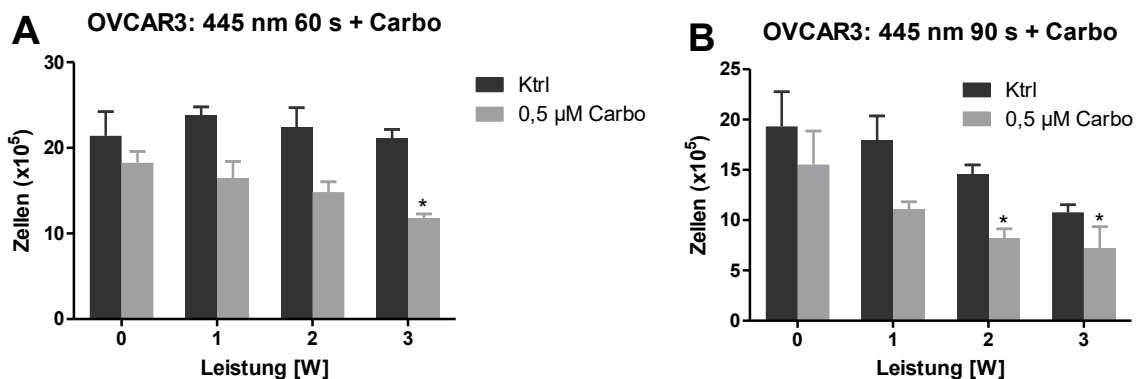


Abb. 15: Wachstum von OVCAR3-Zellen unter Carbo + Laser

Wachstum von OVCAR3-Zellen nach Zugabe von 0,5 μM Carbo und nachfolgender Laserbehandlung mit 1 bis 3 W (0 W = keine Laserbehandlung) über 60 s (A) und 90 s (B) bei 445 nm. Die Zellzahl wurde nach 120 h gemessen. Die Ergebnisse stammen aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind Mittelwert $\pm$ SD der absoluten Zellzahlen. Die Auswertung erfolgte mit dem Studentischen t-Test ($p < 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)).

Auch bei der Kombination aus Laserstrahlung und Doce (Abb. 16) konnte ein signifikanter Effekt bei höheren Laserleistungen erzielt werden. Bei 60 s zeigte sich ein signifikanter Wachstumsunterschied zur Kontrolle ohne Laser ab 3 W, bei 90 s ab 2 W.

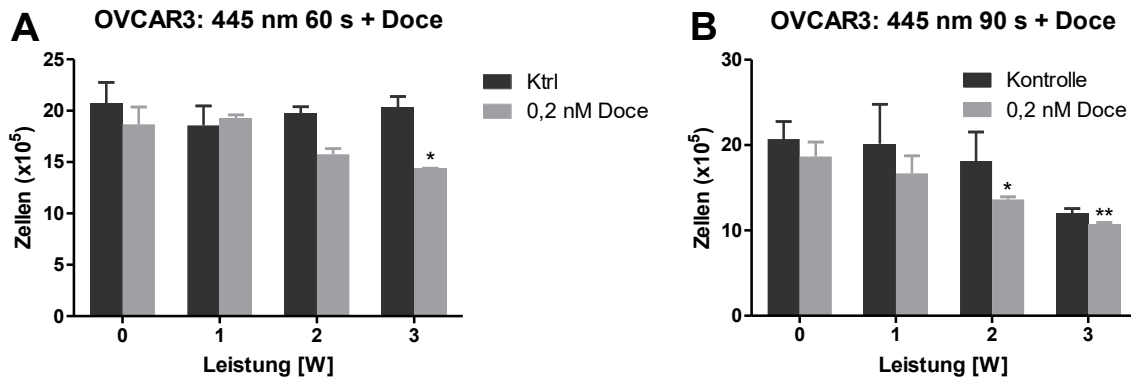


Abb. 16: Wachstum von OVCAR3-Zellen unter Doce + Laser

Wachstum von OVCAR3-Zellen nach Zugabe von 0,2 nM Doce und nachfolgender Laserbehandlung mit 1 bis 3 W (0 W = keine Laserbehandlung) über 60 s (A) und 90 s (B) bei 445 nm. Die Zellzahl wurde nach 120 h gemessen. Die Ergebnisse stammen aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind Mittelwert $\pm$ SD der absoluten Zellzahlen. Die Auswertung erfolgte mit dem Studentschen t-Test ($p < 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)).

Bei der Laserbehandlung von OVCAR3-Zellen in Anwesenheit von Pacli (Abb. 17) ergaben sich bei 60 s Behandlungsdauer keine signifikanten Wachstumsunterschiede. Bei 90 s konnte im Gegensatz dazu ab einer Leistung von 2 W eine Wachstumsinhibition festgestellt werden. Angemerkt werden muss hierbei allerdings, dass bei den vorliegenden Versuchen schon die Wachstumshemmung allein durch die ausgewählte Konzentration an Pacli wesentlich höher war als bei Doce und Carbo.

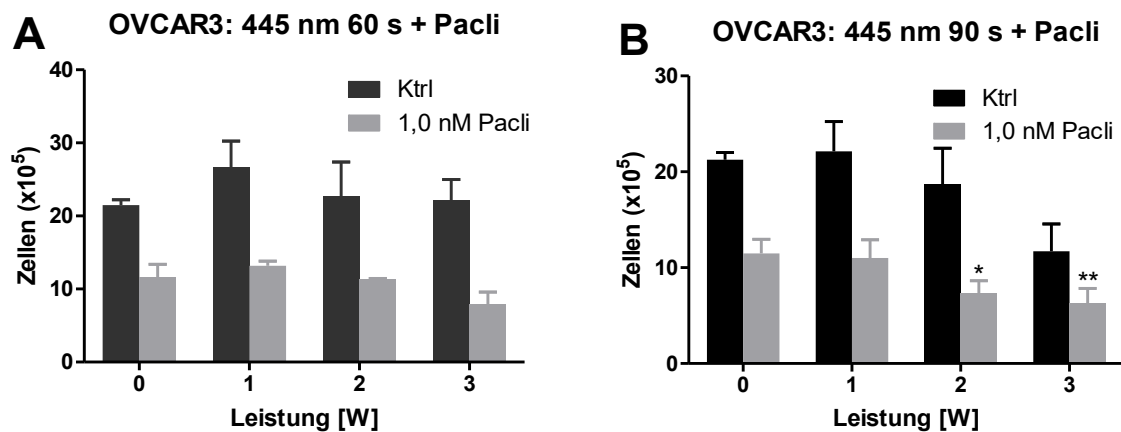


Abb. 17: Wachstum von OVCAR3-Zellen unter Pacli + Laser

Wachstum von OVCAR3-Zellen nach Zugabe von 1,0 nM Pacli und nachfolgender Laserbehandlung mit 1 bis 3 W (0 W = keine Laserbehandlung) über 60 s (A) und 90 s (B) bei 445 nm. Die Zellzahl wurde nach 120 h gemessen. Die Ergebnisse stammen aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind Mittelwert $\pm$ SD der absoluten Zellzahlen. Die Auswertung erfolgte mit dem Studentischen t-Test ($p < 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)).

4. Diskussion

Das OC wird in einem Großteil der Fälle erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert, bei denen es bereits zu einer Metastasierung innerhalb der Peritonealhöhle gekommen ist (Matulonis et al., 2016; Cortez et al., 2018). Das übliche Therapieregime beinhaltet die Gabe von Carbo und Pacli alle drei Wochen über 6 Zyklen, ggf. kombiniert mit Bevacizumab und/oder einem PARP-Inhibitor im Rahmen der Erhaltungstherapie (Leitlinienprogramm Onkologie, 2024). Jedoch sind Rezidive häufig und viele Erkrankte entwickeln eine Platinresistenz (Matulonis et al., 2016; Cortez et al., 2018; Leitlinienprogramm Onkologie, 2024). Bei 5,3 % der Patientinnen schreitet das Tumorwachstum trotz platinhaltiger Firstline-Chemotherapie fort (platinum non-sensitive), bei 17,2 % kommt es innerhalb der ersten sechs Monate nach platinhaltiger Chemotherapie zu einem Rezidiv (platinum resistant) (Cortez et al., 2018; Basta et al., 2015). Die Mechanismen sind im Detail ungeklärt, allerdings gibt es Vermutungen über eine Inaktivierung der Tumorsuppressorgene *Retinoblastom 1 (RB1)*, *Neurofibromin 1 (NF1)*, *RAD51B* und *PTEN* (Matulonis et al., 2016).

In dieser Arbeit wurden die Veränderungen der Zellzahl in Anwesenheit der Zytostatika Carbo, Doce und Pacli betrachtet, wobei auffiel, dass die beiden verwendeten OC-Zelllinien SKOV3 und OVCAR3 sehr unterschiedlich auf die Wirkstoffe reagierten. Bei SKOV3-Zellen ließ sich im Vergleich zu OVCAR3-Zellen eine geringere Sensitivität gegenüber dem platinhaltigen Zytostatikum Carbo nachweisen. Während sich die Wachstumskurve der SKOV3-Zellen bei Inkubation mit 3,0 µM Carbo wenig von der Kontrolle unterschied, sind die OVCAR3-Zellen mit derselben Carbo-Konzentration nahezu vollständig abgestorben. Dies entspricht den Ergebnissen von Pénczváltó et al. (2014), die unter vier OC-Zelllinien SKOV3 als resistanteste und OVCAR3 als sensibelste Zelllinie gegenüber Carbo identifizierten. Mitochondriale Prozesse spielen eine wesentliche Rolle in der Resistenzentwicklung von SKOV3-Zellen gegenüber platinhaltigen Chemotherapeutika. Bei resistenten SKOV3-Zellen konnten unter anderem eine verminderte Dihydropyrimidinase-related Protein- (DRP-) und eine erhöhte Mitofusion-2- (MFN2-) Expression festgestellt werden. DRP1 steuert die mitochondriale Spaltung und MFN2 die Fusion der mitochondrialen Membranschichten, wodurch beide

Faktoren über ihren Einfluss auf das intrazelluläre Adenosintriphosphat- (ATP-) und ROS-Level eine essentielle Rolle im Hinblick auf eine Platinresistenz spielen (Zou et al., 2021). OVCAR3-Zellen hingegen reagierten wesentlich sensibler auf Carbo.

In Bezug auf Doce und Pacli konnte bei Inkubation von SKOV3-Zellen zu Beginn der Studie zunächst ein zytostatischer Effekt hervorgerufen werden. Im zeitlichen Verlauf und nach mehrfachen Wiederholungen konnte allerdings kein hemmender Effekt von Doce und Pacli auf SKOV3-Zellen mehr festgestellt werden. Die SKOV3-Zellen reagierten dementsprechend in der kombinierten Behandlung auf keines der drei Zytostatika. OVCAR3-Zellen wiederum ließen sich auch durch die beiden Taxane mit dem gewünschten Effekt hemmen. Außerdem konnten zur Inhibition der OVCAR3-Zellen im Vergleich zu den SKOV3-Zellen wesentlich niedrigere Wirkstoffkonzentrationen verwendet werden. Für etwa 20 % Reduktion des Zellwachstums der OVCAR3-Zellen 120 h nach Behandlung konnten jeweils 0,2 nM Doce oder 1,0 nM Pacli verwendet werden. Für die SKOV3-Zellen lagen die Konzentrationen bei 0,5 nM Doce oder 2,0 nM Pacli, also etwa doppelt so hoch. Auch in der Literatur werden höhere Dosen an Pacli und Carbo für SKOV3- im Vergleich zu OVCAR3-Zellen verwendet (Smith et al., 2005). Es ist anzunehmen, dass SKOV3-Zellen nicht nur bei der Inkubation mit Carbo, sondern auch mit den verwendeten Taxanen eine höhere Widerstandsfähigkeit aufweisen.

Ein aktuelles Forschungsthema ist der Einsatz von HIPEC beim intraperitoneal metastasierten OC. Dabei werden Zytostatika intraoperativ direkt in die Bauchhöhle verabreicht, wobei die Aufnahme durch deren Erwärmung gesteigert wird (Tsuyoshi et al., 2020; Oei et al., 2015; Farrell et al., 2022). Im Jahre 2018 wurde die OVIHIPEC 1-Studie durchgeführt, die einen großen Nutzen in der ip Chemotherapie sah. Es zeigte sich eine verbesserte Überlebensrate durch längeres rezidivfreies Überleben und längere Gesamtüberlebenszeit, wenn an die Intervall-CRS noch eine HIPEC angeschlossen wurde (van Driel et al., 2018). Die Eindringtiefe von Cisplatin in das Tumorgewebe beträgt 1-3 mm, wodurch vor allem für Frauen mit minimaler Resterkrankung ein Vorteil durch die platinbasierte HIPEC entstehen kann (Farrell et al., 2022). Dennoch ist die HIPEC ein kontrovers diskutiertes und wenig etabliertes Verfahren, da durch die ip Katheterisierung eine optimale Medikamentenverteilung und -absorption anzuzweifeln ist (Bookman, 2016). Durch die Hyperthermie erhöht sich zwar die Penetrationsdistanz, wird diese

allerdings überschritten, geschieht die Medikamentenverteilung größtenteils über den Blutkreislauf und von Vorteilen der ip Gabe gegenüber der iv Gabe kann nicht mehr ausgegangen werden (El-Kareh und Secomb, 2004). Gleiches gilt beim Vorhandensein von Adhäsionen, Fibrose, hohem interstitiellen Druck und undichten Kapillaren (Bookman, 2016). Aufgrund der meist therapielimitierenden Nebenwirkungen hat sich die HIPEC bei der Behandlung des fortgeschrittenen OC nicht durchgesetzt und wird aktuell in der Therapie des OC nicht empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2024).

Physikalische Verfahren wie nicht-invasives physikalisches Plasma (NIPP) könnten für ein spezifischeres Tumorsprechen sorgen und damit das Auftreten systemischer Nebenwirkungen reduzieren. Im Falle von NIPP konnte an Mammakarzinom-Zellen ein inhibitorischer Effekt auf das Zellwachstum festgestellt werden. Ein besonderes Augenmerk liegt dabei auf dem Einfluss auf die Zellmembran und -struktur, der das Eindringen niedermolekularer Strukturen begünstigt (Stope et al., 2020). Ein weiteres physikalisches Verfahren, welches wie NIPP intraoperativ eingesetzt werden könnte, ist die Lasertherapie. Laserstrahlen haben zahlreiche Effekte auf die Zellen, unter anderem auf die zelluläre Signaltransduktion. Es wird angenommen, dass die Cytochrom-C-Oxidase an der inneren mitochondrialen Membran ein wesentlicher Angriffspunkt von roten und nahinfraroten Laserstrahlen ist. Darüber hat Laserstrahlung Einfluss auf die Zellproliferation und -migration (Crous und Abrahamse, 2013; Al-Watban und Andres, 2012). Anhand von Versuchen an Fibroblasten der Gingiva mit einem Laser der Wellenlänge 780 nm wurde eine Stimulation von Zellwachstum, Zellproliferation und -migration nachgewiesen. Weitere erklärende Beobachtungen waren unter anderem die Freisetzung von Wachstumsfaktor, Inhibitorproteinen der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) oder die Aktivierung der Tyrosinkinase Src. Darauf basierend wirkt Laserstrahlung positiv auf die Wundheilung und kann für Knochenregeneration und Osteointegration nach Zahnimplantaten eingesetzt werden (Jakse et al., 2007; Basso et al., 2012; Liang et al., 2015). Gleichzeitig kann Laserstrahlung zu einer Hemmung des Zellzyklus und Induktion von Apoptose führen. Bei einer Wellenlänge von 632,8 nm wurde eine applizierte Dosis von 180 mJ/cm² als optimaler Wert für einen biostimulatorischen Effekt beschrieben, während 420-600 mJ/cm² zu einer Zellinhibition führten (Crous und Abrahamse, 2013). In Bezug auf die Abhängigkeit von Wellenlänge und Leistungs- bzw. Energiedichte des Lasers herrscht in der Literatur Uneinigkeit (da Silva et al., 2020). Im

Hinblick auf die Steigerung der Membranpermeabilität beschrieben St-Louis Lalonde et al. (2013) eine vergleichbare Effektivität bei 532 nm und 1024 nm. In der Annahme, dass Wellenlängen nahe dem infraroten Spektrum tendenziell zu einer Steigerung des Zellwachstums führen, während die Bestrahlung mit Wellenlängen im Bereich des sichtbaren Lichts eher eine Hemmung des Zellwachstums hervorruft, wurde sich in dieser Arbeit für einen Laser mit der Wellenlänge von 445 nm entschieden. Die Versuche an den beiden OC-Zelllinien OVCAR3 und SKOV3 konnten diese Theorie bestätigen. Es wurde eine signifikante Inhibition beider Zelllinien ab einer Leistung von 3 W erreicht, bei SKOV3 sowohl bei 60 (87 J/cm²), 90 (131 J/cm²) und 120 s (175 J/cm²) Behandlung, bei OVCAR3 nur bei 90 (131 J/cm²) und 120 s (175 J/cm²). Die erhöhte Widerstandsfähigkeit von SKOV3-Zellen, die bei Inkubation mit den Zytostatika auffiel, konnte bei der Laserbehandlung zunächst nicht bestätigt werden. Liang et al. (2015) machten weitere Untersuchungen an Mundhöhlenkrebszellen (OC2-Zellen) mit einem Laser der Wellenlänge 810 nm und stellten dabei einen erhöhten Anteil von Zellen in der G1 und subG1-Phase nach Laserbehandlung mit 1 W/cm² über 60 s (60 J/cm²) fest. Daraus kann geschlossen werden, dass der Zellzyklus in der G1-Phase angehalten und somit der Zelltod induziert wurde. Gleichzeitig wurden ein erhöhtes Level an ROS, der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials sowie eine erhöhte Caspase-3-Aktivität beobachtet (Liang et al., 2015).

Über die Umgebungstemperatur können mit Laserstrahlen die Zellregulation und die Membranpermeabilität beeinflusst werden. Somit könnte Laserstrahlung intraoperativ in Kombination mit ip Chemotherapie eingesetzt werden. Laserstrahlung ist monochromatisches Licht, welches im Versuch mit einer Wellenlänge von 445 nm auf die Zellen im Zellkulturmedium traf. Dieses phenolrote Nährmedium wies ein hohes Absorptionspotential auf, weshalb es zu dessen Erwärmung kam (Nikolskaya et al., 2006). Schon bei einer kurzen Behandlungszeit konnte eine deutliche Erwärmung des Zellkulturmediums festgestellt werden. Bis 90 s konnte ein linearer Zusammenhang zwischen Behandlungszeit und Temperaturänderung festgestellt werden. Diese war bei niedrigeren Leistungen geringer war als bei höheren Leistungen. Auch bei Leistungen bis 5 W herrschte bei gleichbleibender Behandlungszeit ein annähernd linearer Zusammenhang. Fisher et al. (2010) nutzten die Energie der Laserstrahlen noch gezielter durch den Einsatz von multiwalled carbon nanotubes (MWNTs). Diese wurden

intrazellulär eingeschleust und absorbierten dort das Licht der spezifischen Laserwellenlänge. Durch die gezielte Ansteuerung des Tumorgewebes über die MWNTs konnte eine deutlich stärkere, aber selektive Erhitzung gewährleistet und somit eine Tumorsuppression mit gleichzeitig niedriger Expression von Hitzeschockproteinen (HSP) erreicht werden. Allerdings ist zu beachten, dass durch einen deutlichen Anstieg von HSP eine Wachstumsstimulation der Tumorzellen und eine verstärkte Resistenz gegenüber Chemo- und Strahlentherapie auftreten können (Fisher et al., 2010). Ebenso kann über HSP bei längerer milder Hyperthermie um 40 °C eine Thermotoleranz der Zellen hervorgerufen werden. Diese sind daraufhin weniger sensibel für potenziell letale Temperaturen über 43 °C. Folglich geht eine hohe Expression von HSP mit einer höheren Tumorresistenz einher und sollte für eine erfolgreiche Therapie entsprechend vermieden werden (Bettaieb und Averill-Bates, 2015). Auch Temperaturschwankungen wirken sich auf die Regulationsmechanismen der Zellen aus (Bettaieb und Averill-Bates, 2015) und sollten in der Studie verhindert werden. Da die Temperaturerhöhung nicht primär eine erhöhte Apoptoserate der Zellen hervorrufen sollte, wurde in späteren Versuchen eine Laserleistung von 4 W über eine Dauer von 120 s nicht überschritten.

Wiederum wichtig im Zusammenhang mit der Laserbehandlung ist die Hyperthermiebedingte Erhöhung des Membranpotentials (Nikolskaya et al., 2006). Hyperthermie kann zu einer erhöhten Fluidität der Phospholipidmembran und folglich zu einer erhöhten Medikamentenaufnahme führen. Nachgewiesen werden konnte dies bereits mit Cisplatin, welches bei Hyperthermie bis 43 °C einen potenzierenden Effekt zeigte, während Carbo und Oxaliplatin additiv wirkten (Gabano et al., 2008). Die erhöhte Membranpermeabilität für Medikamente ist der Grund für eine erhöhte Penetrationsdistanz von ip verabreichter Chemotherapie im Rahmen der HIPEC (EI-Kareh und Secomb, 2004). Beim Einsatz von Laserstrahlung in Kombination mit ip verabreichter Chemotherapie könnte die Erwärmung folglich förderlich wirken oder sogar ursächlich für die erleichterte ip Medikamentenaufnahme sein. In den Versuchen mit NIPP konnte bereits gezeigt werden, dass durch den Verlust der Zellmembranintegrität der Eintritt von Zytostatika in die Zelle verbessert und deren Wirkung gesteigert werden konnte (Haralambiev et al., 2020; Daeschlein et al., 2018). Bei der Laserbehandlung lag dies ebenfalls nahe. Zunächst wurden die Zellen nach der Laserbehandlung mit den Zytostatika inkubiert. Dabei konnten schon bei niedriger Energie signifikante Effekte auf das Zellwachstum gezeigt werden.

Insbesondere SKOV3-Zellen reagierten sehr sensibel auf die Laserbehandlung. Bei ihnen zeigte sich eine signifikante Zellzahlreduktion mit Laser- und anschließender Zytostatikabehandlung ab 120 J (1 W über 120 s, applizierte Dosis von 58 J/cm²). Allerdings erzeugte auch die Laserstrahlung allein schon eine deutliche Zellzahlreduktion, weshalb ein synergistischer Effekt mit den Zytostatika nicht zu beweisen war. Es wurde die Theorie aufgestellt, dass Laserstrahlen nur für einen zeitlichen Bruchteil die Membranpermeabilität stören und die Aufnahme der Zytostatika in die Zelle fördern. Dies steht in Einklang mit den Untersuchungen von Yao et al. (2005), welche bei Inkubation der Zellen mit Propidiumiodid direkt nach Laserbestrahlung eine Aufnahme über die Zellmembran beobachteten, die dann mit zunehmender Zeit abnahm. Äquivalente Ergebnisse lieferten auch Schneckenburger et al. (2002), die mithilfe eines maximal 2,5 s andauernden und 1 MW/cm² starken Laserstrahls der Wellenlänge 488 nm Löcher in der Zellmembran erzeugen konnten, welche maximal 5 min detektierbar waren. Dabei wurden nur einzelne Zellen bestrahlt und mithilfe eines Interferenzkontrastmikroskops ausgewertet (Schneckenburger et al., 2002).

Das Versuchsregime wurde folglich umgestellt und die Zellen in Anwesenheit der Zytostatika mit den Laserstrahlen behandelt. SKOV3-Zellen, die mit Carbo inkubiert und anschließend mit Laserstrahlen behandelt wurden, zeigten bei 90 s Behandlung ab 2 W (180 J, 87 J/cm²) eine signifikante Zellzahlreduktion. Dabei ließ sich weder eine signifikante Zellzahlreduktion durch die Laserstrahlen noch durch Carbo allein hervorrufen. Hier könnte die Inhibition folglich auf einem synergistischen Effekt zwischen den Laserstrahlen und der Carbo-Behandlung beruhen. Bei Inkubation von SKOV3-Zellen mit Doce und Pacli ließ sich dieses Ergebnis nicht wiederholen. Bei OVCAR3-Zellen konnte ebenfalls eine größere Wachstumshemmung durch die Kombination mit Laserstrahlen hervorgerufen werden. Ab 180 J (87 J/cm²) konnte nach Inkubation mit Carbo, Doce oder Pacli ein niedrigeres Zellwachstum als durch die Zytostatika allein hervorgerufen werden. Dies spiegelte sich in niedrigeren Zellzahlen zum Messzeitpunkt von 120 h im Vergleich zur rein mit dem jeweiligen Zytostatikum behandelten Zellen wider. Dabei machte es keinen Unterschied, ob diese Energie durch eine Laserbehandlung mit einer Leistung von 2 W über 90 s (Ausnahme: Pacli) oder mit einer Leistung von 3 W über 60 s erreicht wurde. Bei Erhöhung der applizierten Laserenergie (ab 270 J bzw. 131 J/cm²) erzielte allerdings auch die Laserstrahlung allein eine signifikante Wachstumshemmung,

sodass ein synergistischer Effekt der Kombinationsbehandlung ab dieser Energie nicht beurteilt werden kann. Über den Einfluss von Laserstrahlung auf die Membranpermeabilität von OVCAR3-Zellen wurde von Yao et al. (2017) eine umfangreiche Arbeit verfasst. Anders als in dieser Arbeit wurden Gold-Nanopartikel (AuNPs) verwendet und an Cetuximab gekoppelt, welches spezifisch den Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) von OVCAR3-Zellen angriff. Anschließend wurden diese mit einem gepulstem Laserstrahl der Wellenlänge 532 nm bestrahlt, wodurch 150 kDa FITC-Dextran besser in die Zelle aufgenommen werden konnte. Durch die AuNPs war eine gezielte Erzeugung von Poren in der Zellmembran möglich. Bei einer applizierten Dosis über 600 mJ/cm² lag die Rate an Zellen mit permeabler Membran bei 20-30 %. Die Laserenergie und die Behandlungszeit korrelierten positiv mit der Zelltodrate (Yao et al., 2017), welches mit den Ergebnissen dieser Arbeit übereinstimmt. Je länger und je stärker die Zellen ohne Zytostatikum bestrahlt wurden, desto niedriger war die gemessene Zellzahl nach 120 h. Eine signifikant verringerte Zellzahl war bei OVCAR3-Zellen allerdings erst ab 270 J (entspricht einer applizierten Dosis von 131 J/cm²) feststellbar. Im Gegensatz zur genannten Studie wurde in dieser Arbeit ein kontinuierlich emittierender Laser verwendet. Nach den Ergebnissen von Khalaj et al. (2023) können sowohl durch kontinuierliche Laserstrahlung als auch durch gepulste Laserstrahlung signifikante Effekte auf die Zellproliferation erzeugt werden. Hierbei wurde ein Laser der Wellenlänge 980 nm mit applizierten Dosen von 5,2 J/cm² (CW) bzw. 5 J/cm² (PW) mit einer Wiederholungsrate von 50 Hz verwendet. Auf die Zellmigration hatte die gepulste Anwendung im Gegensatz zur kontinuierlichen Strahlung keine signifikanten Auswirkungen (Khalaj et al., 2023). In dieser Arbeit wurden die Zellen im adhärenen Zustand und in 500 µl Nährmedium behandelt, um die Störfaktoren in der Zellkultivierung weitestgehend zu reduzieren. Yao et al. (2017) variierten bei ihren Versuchen die Bedingungen der bestrahlten Zellen. Dabei wurde festgestellt, dass die Aufnahme des Dextrans durch vorherige Inkubation der Zellen mit Trypsin gesteigert werden konnte. Bei Inkubation der Zellen in PBS konnte das Optimum von 70 % permeablen Zellen bei niedrigeren Bestrahlungsdichten erreicht werden als bei Behandlung in RPMI, gleichzeitig war schon früher eine höhere Zelltodrate zu verzeichnen (Yao et al., 2017).

Insgesamt wurden Laserenergien zwischen 30 und 480 J (15-233 J/cm²) getestet. In der Literatur finden sich vor allem Studien mit Verwendung von Laserenergie im niedrigen

zweistelligen Bereich. Es muss erwähnt werden, dass ein hoher Leistungsverlust bei der Laserstrahlung festgestellt werden konnte und die am Laser eingestellte Leistung nicht vollständig auf die Zellen traf. Bei Leistungen zwischen 1 und 10 W erreichten die Zellen in der 24-Well-Zellkulturplatte mit 500 µl Nährmedium nur 58-65 % der Leistung. Die technischen Gegebenheiten erlaubten keine Versuche mit niedrigeren Leistungen. Die Ergebnisse zeigen auch, dass dies nicht sinnvoll gewesen wäre. Es war nicht das Ziel, allein mit der Laserstrahlung das Zellwachstum zu hemmen. Außerdem konnte in der Kombination mit den Zytostatika in keinem Versuch ein signifikanter Wachstumsunterschied zu den nur mit Zytostatika behandelten Zellen im Bereich unter 120 J (58 J/cm²) festgestellt werden. Eine Erhöhung der Membranpermeabilität oder Beeinflussung der Transportmechanismen der Zellmembran konnte durch niedrigere Energie entsprechend nicht hervorgerufen werden. Dies kann möglicherweise auf den zu geringen Temperaturanstieg zurückgeführt werden, der bei 120 J (58 J/cm²) nur 4,4 °C betrug. Die meisten signifikanten Ergebnisse wurden bei einer Laserbehandlung ab 180 J (87 J/cm²) erreicht, wobei ein Temperaturanstieg von über 6 °C hervorgerufen wurde. Dies ist übereinstimmend mit Ergebnissen der Literatur, bei denen eine exponentielle Steigerung der Medikamentenaufnahme bei höherer Temperatur erreicht werden konnte (Gabano et al., 2008).

Da bei den SKOV3-Zellen ein synergistischer Effekt zwischen Laserstrahlung und Carbo, nicht aber Doce und Pacli, festgestellt wurde, können molekularbiologische Unterschiede zwischen den Zytostatika diskutiert werden. Carbo verfügt über ein Molekulargewicht von 371,25 g/mol, mit dem es weniger als halb so schwer ist wie Doce mit 807,9 g/mol und Pacli mit 853,9 g/mol (PubChem, 2023a, 2023b, 2023c). Dieser Unterschied wird auch bei Betrachtung der Strukturformeln (Abb. 1) deutlich. Gegebenenfalls konnten die SKOV3-Zellen Carbo dadurch besser aufnehmen als die beiden Taxane Doce und Pacli. Bei OVCAR3-Zellen ist kein Unterschied zwischen Carbo und den Taxanen im Hinblick auf eine bessere Aufnahme über die Membran feststellbar. Dies könnte dafür sprechen, dass die durch die Laserstrahlen vermittelte Durchlässigkeit eine Ausschlussgröße aufweist, die alle drei Zytostatika erreichen. Eine Untersuchung mit einem hochauflösenden Mikroskop könnte Aufschluss darüber geben, welche Größe die Poren in der Zellmembran aufweisen. Außerdem könnten Untersuchungen mit unterschiedlich großen niedermolekularen Substanzen durchgeführt werden, um die genannte

Ausschlussgröße zu ermitteln. Bei Inkubation der Zellen mit unterschiedlich großen FITC-Dextranen könnte nach der Laserbehandlung mittels Durchflusszytometrie das erfolgreiche Einbringen des Dextrans in die Zelle bis zu einer bestimmten Ausschlussgröße nachgewiesen werden. Um generell die erhöhte Membranpermeabilität durch die Laserbehandlung nachzuweisen, wäre ebenso die Inkubation mit einem Fluoreszenzfarbstoff, bspw. Trypanblau, sinnvoll. Dieser Farbstoff ist normalerweise nicht membrangängig. War die Membranpermeabilisierung durch die Laserbehandlung erfolgreich, könnte im Anschluss mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops überprüft werden, ob der Farbstoff in die Zellen aufgenommen wurde.

Die Möglichkeit, die Membranpermeabilität durch Laserstrahlung zu erhöhen, eröffnet neben der Krebsbehandlung auch verschiedene weitere Möglichkeiten. Es könnten z. B. andere Medikamente in Zellen eingeschleust und somit deren Dosis reduziert werden. Gleichzeitig bestünde die Möglichkeit zur Plasmidtransfektion von Zellen. Laserpulse wurden dafür bereits zur Erhitzung von Plasmonic Nanobubbles (PNBs) genutzt, mit denen eine Gentransfektion ausgewählter Zellen erreicht werden konnte (Lukianova-Hleb et al., 2011). Aber auch der Laser allein kann durch Erhöhung der Membranpermeabilität und Bildung einer vorübergehenden Membranpore das Einführen zellfremder DNA ermöglichen (Stevenson et al., 2006; Palumbo et al., 1996). Mit dem Laser ließe sich neben dem Zellwachstum auch die Zelldifferenzierung im Rahmen der Stammzellforschung beeinflussen. Weitergehende Studien könnten außerdem den Einfluss von Laser auf Bakterien und Viren untersuchen. Da bereits Unterschiede bei der Modifizierung der Laserparameter wie Leistung, Wellenlänge, Behandlungsabstand und Behandlungsdauer auftraten, sollte der Einfluss der jeweiligen Parameter eingehender untersucht werden.

Klinische Anwendung könnte der Laser bspw. im Rahmen der ip Chemotherapie finden. Tumorareale könnten gezielt bestrahlt und somit für die Chemotherapie sensibilisiert werden. Synergistisch würde wie bei der HIPEC die Wärme wirken, die die Penetrationsdistanz der medikamentösen Behandlung hebt (Oei et al., 2015). Die Vorteile in der zusätzlichen Laserbehandlung würden in der Reduktion der Medikamentendosis und somit der einhergehenden Nebenwirkungen liegen. Eine gezielte Laserbestrahlung würde außerdem zu einer höheren Schonung des gesunden Gewebes beitragen. Ein

Einsatz bei der Behandlung des fortgeschrittenen OC nach der primären Debulking-Operation bietet sich an. Dabei könnten sowohl peritoneale Absiedlungen als auch postoperative Tumorreste behandelt werden.

Der klinische Einsatz von Laserstrahlung ist vielseitig. So können Laserstrahlen mit niedriger Energie bei Mukositis im Rahmen von Radiochemotherapie die Schmerzen sowie den Opioidbedarf und Bedarf an parenteraler Ernährung senken (Gautam et al., 2012). In der Zahnheilkunde wird Laserstrahlung bei aphtöser Stomatitis eingesetzt und kann dabei zu einer verbesserten Wundheilung und Schmerzreduktion führen (Suter et al., 2017). Auch bei der Versorgung von Brandnarben wird Laserstrahlung erfolgreich eingesetzt (Issler-Fisher et al., 2017). Ein intraoperativer Einsatz von Laser ist vorstellbar, weshalb die Interaktionen mit ip Chemotherapie weiter untersucht werden sollten. Neben dem OC könnte Laserstrahlung in Kombination mit ip Chemotherapie auch bei anderen Malignitäten wie einem peritoneal metastasierten Magenkarzinom zum Einsatz kommen (Chen et al., 2023).

5. Zusammenfassung

Die Laserbehandlung ist ein physikalisches Verfahren, welches in der Gynäkologie bereits Anwendung in der Therapie des Lichen sclerosus der Vulva oder bei Condylomata acuminata der Zervix findet (Yordanov et al., 2020; Wu et al., 2024), aber auch in der Krebsforschung zunehmend in den Fokus gelangt. Dabei macht man sich den Einfluss auf die Zellproliferation zunutze, wobei Laserstrahlung in Abhängigkeit von der Wellenlänge und der applizierten Dosis sowohl inhibierend als auch fördernd wirken kann (Liang et al., 2015; Matsumoto et al., 2014). Gleichzeitig kann Laserstrahlung zumindest einen zeitweiligen Einfluss auf die Membranpermeabilität von Zellen haben (Yao et al., 2005). Daraus entstand die Hypothese, dass eine Laserbehandlung zu einer Sensibilisierung der Zellen gegenüber Zytostatika führen kann.

In dieser Arbeit wurden zwei OC-Zelllinien SKOV3 und OVCAR3 verwendet. Zunächst wurden geeignete Konzentrationen an Carboplatin (Carbo), Docetaxel (Doce) und Paclitaxel (Pacli) gesucht, die das Zellwachstum um etwa 20 % hemmen. Parallel wurde ein geeigneter Versuchsaufbau mit dem Laser entwickelt. Dabei wurden externe Störfaktoren auf die Zellkultur weitestgehend reduziert, um eine größtmögliche Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. Außerdem wurde der Parameter Temperatur eingehender untersucht. Einerseits sollte es nicht zu einer thermischen Inaktivierung der Zellen kommen, andererseits spielt die Temperatur in Bezug auf die Membranpermeabilität eine entscheidende Rolle. Nach Optimierung der Versuchsbedingungen konnte erfolgreich der hemmende Einfluss von alleiniger Laserstrahlung auf das Zellwachstum nachgewiesen werden. Weitergehend sollten die synergistischen Effekte von Laserstrahlung auf die Behandlung mit Zytostatika überprüft werden. Dazu wurden die Zellen mit einem der Zytostatika inkubiert und anschließend mit dem Laser behandelt. Bei den SKOV3-Zellen konnte eine signifikant größere Zellinhibition in Kombination als mit der Laserstrahlung und Carbo einzeln erreicht werden. Bei den OVCAR3-Zellen ergab sich ab einer applizierten Laserenergie von 180 J ein signifikanter Unterschied in der kombinierten Behandlung im Vergleich zur rein medikamentös behandelten Kontrolle. Auch dort hatte die Kombination einen größeren Effekt als die Laserbehandlung allein. Es konnten folglich synergistische Effekte zwischen den

Behandlungsmethoden festgestellt werden. Inwieweit diese auf einer Steigerung der Membranpermeabilität beruhen, müsste mithilfe weiterer Untersuchungen überprüft werden.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Strukturformeln und Molmassen (MW) von Carbo (A), Pacli (B) und Doce (C) (PubChem, 2023a, 2023b, 2023c)	13
Abb. 2: Wachstumskinetik von SKOV3-Zellen und OVCAR3-Zellen	24
Abb. 3: Wachstumskinetik von SKOV3-Zellen mit Carbo, Pacli und Doce	26
Abb. 4: Wachstumskinetik von OVCAR3-Zellen mit Carbo, Pacli und Doce.....	27
Abb. 5: Laserparameter	28
Abb. 6: Aufbau zur Detektion des Leistungsabfalls	31
Abb. 7: Temperaturentwicklung durch Laserbehandlung	34
Abb. 8: Wachstumskinetik von SKOV3-Zellen nach Laserbehandlung	35
Abb. 9: Wachstumskinetik von OVCAR3-Zellen nach Laserbehandlung.....	35
Abb. 10: Wachstum von SKOV3-Zellen nach Laserbehandlung	36
Abb. 11: Wachstum von OVCAR3-Zellen nach Laserbehandlung.....	37
Abb. 12: Wachstum von SKOV3-Zellen unter Carbo + Laser.....	39
Abb. 13: Wachstum von SKOV3-Zellen unter Doce + Laser	40
Abb. 14: Wachstum von SKOV3-Zellen unter Pacli + Laser.....	40
Abb. 15: Wachstum von OVCAR3-Zellen unter Carbo + Laser	41
Abb. 16: Wachstum von OVCAR3-Zellen unter Doce + Laser	42
Abb. 17: Wachstum von OVCAR3-Zellen unter Pacli + Laser	43

7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Detektierte Restleistung des Laserstrahls	32
---	----

8. Literaturverzeichnis

Akbarzadeh M, Nouri M, Banekohal MV, Cheraghi O, Tajalli H, Movassaghpour A, Soltani S, Cheraghi H, Feizy N, Montazersaheb S, Rahbarghazi R, Samadi N. Effects of combination of melatonin and laser irradiation on ovarian cancer cells and endothelial lineage viability. *Lasers Med Sci* 2016; 31: 1565–1572

Al-Watban FAH, Andres BL. Laser biomodulation of normal and neoplastic cells. *Lasers Med Sci* 2012; 27: 1039–1043

Armstrong DK, Alvarez RD, Bakkum-Gamez JN, Barroilhet L, Behbakht K, Berchuck A, Chen L-M, Cristea M, DeRosa M, Eisenhauer EL, Gershenson DM, Gray HJ, Grisham R, Hakam A, Jain A, Karam A, Konecny GE, Leath CA, Liu J, Mahdi H, Martin L, Matei D, McHale M, McLean K, Miller DS, O'Malley DM, Percac-Lima S, Ratner E, Remmenga SW, Vargas R, Werner TL, Zsiros E, Burns JL, Engh AM. Ovarian Cancer, Version 2.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 2021; 19: 191–226

Ataseven B, Grimm C, Harter P, Heitz F, Traut A, Prader S, Du Bois A. Prognostic impact of debulking surgery and residual tumor in patients with epithelial ovarian cancer FIGO stage IV. *Gynecol Oncol* 2016; 140: 215–220

Basso FG, Pansani TN, Turrioni APS, Bagnato VS, Hebling J, Souza Costa CA de. In vitro wound healing improvement by low-level laser therapy application in cultured gingival fibroblasts. *Int J Dent* 2012; 2012: 719452

Basta A, Bidziński M, Bieńkiewicz A, Blecharz P, Bodnar L, Jach R, Knapp P, Kojs Z, Kotarski J, Markowska J, Misiek M, Sznurkowski J, Wicherek Ł, Sawicki W, Timorek A, Bahyrycz J, Mądry R, The Board of the Polish Society of Oncological Gynaecology and Working Group on Ovarian Cancer. Recommendation of the Polish Society of Oncological Gynaecology on the diagnosis and treatment of epithelial ovarian cancer. *Oncology in Clinical Practice* 2015; 11: 233–243

Bettaieb A, Averill-Bates DA. Thermotolerance induced at a mild temperature of 40°C alleviates heat shock-induced ER stress and apoptosis in HeLa cells. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1853: 52–62

Blohmer J-U, David M, Henrich W, Sehouli J. *Charité-Compendium Gynäkologie*: De Gruyter 2020

Bogani G, Coleman RL, Vergote I, van Gorp T, Ray-Coquard I, Oaknin A, Matulonis U, O'Malley D, Raspagliesi F, Scambia G, Monk BJ. Mirvetuximab soravtansine-gynx: first antibody/antigen-drug conjugate (ADC) in advanced or recurrent ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2024; 34: 469–477

Bookman MA. Optimal primary therapy of ovarian cancer. *Ann Oncol* 2016; 27 Suppl 1: i58-i62

Chen Z, Ali M, Kai Z, Wang Y, Wang C. HIPEC with CRS versus cytoreductive surgery (CRS) for the gastric cancer metastasis to peritoneum. *Clin Transl Oncol* 2023; 25: 1011–1016

Corte-Rodríguez M, Espina M, Sierra LM, Blanco E, Ames T, Montes-Bayón M, Sanz-Medel A. Quantitative evaluation of cellular uptake, DNA incorporation and adduct formation in cisplatin sensitive and resistant cell lines: Comparison of different Pt-containing drugs. *Biochem Pharmacol* 2015; 98: 69–77

Cortez AJ, Tudrej P, Kujawa KA, Lisowska KM. Advances in ovarian cancer therapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 2018; 81: 17–38

Crous AM, Abrahamse H. Lung cancer stem cells and low-intensity laser irradiation: a potential future therapy? *Stem Cell Res Ther* 2013; 4: 129

da Silva JL, Silva-de-Oliveira AFS, Andraus RAC, Maia LP. Effects of low level laser therapy in cancer cells-a systematic review of the literature. *Lasers Med Sci* 2020; 35: 523–529

Daeschlein G, Hillmann A, Gumbel D, Sicher C, Podewils S von, Stope MB, Junger M. Enhanced Anticancer Efficacy by Drug Chemotherapy and Cold Atmospheric Plasma Against Melanoma and Glioblastoma Cell Lines In Vitro. *IEEE Trans Radiat Plasma Med Sci* 2018; 2: 153–159

Du Bois A, Reuss A, Pujade-Lauraine E, Harter P, Ray-Coquard I, Pfisterer J. Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO). *Cancer* 2009; 115: 1234–1244

Earhart RH. Docetaxel (Taxotere): preclinical and general clinical information. *Semin Oncol* 1999; 26: 8–13

Edelman MJ, Rupard EJ. TUMORS, MALIGNANT | Chemotherapeutic Agents *Encyclopedia of Respiratory Medicine*: Elsevier, 2006: 332–338

El-Kareh AW, Secomb TW. A theoretical model for intraperitoneal delivery of cisplatin and the effect of hyperthermia on drug penetration distance. *Neoplasia* 2004; 6: 117–127

European Medicines Agency. 2024. Elahere. Verfügbar unter <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/elahere> (Zugriffsdatum: 26.01.2025)

Farrar MC, Jacobs TF. Paclitaxel: StatPearls 2022

Farrell R, Burling M, Lee YC, Pather S, Robledo K, Mercieca-Bebber R, Stockler M. Clinical Trial Protocol for HyNOVA: Hyperthermic and Normothermic intraperitoneal chemotherapy following interval cytoreductive surgery for stage III epithelial OVArian, fallopian tube and primary peritoneal cancer (ANZGOG1901/2020). *J Gynecol Oncol* 2022; 33: e1

Fisher JW, Sarkar S, Buchanan CF, Szot CS, Whitney J, Hatcher HC, Torti SV, Rylander CG, Rylander MN. Photothermal response of human and murine cancer cells to multiwalled carbon nanotubes after laser irradiation. *Cancer Res* 2010; 70: 9855–9864

Gabano E, Colangelo D, Ghezzi AR, Osella D. The influence of temperature on antiproliferative effects, cellular uptake and DNA platination of the clinically employed Pt(II)-drugs. *J Inorg Biochem* 2008; 102: 629–635

Gautam AP, Fernandes DJ, Vidyasagar MS, Maiya GA. Low level helium neon laser therapy for chemoradiotherapy induced oral mucositis in oral cancer patients - a randomized controlled trial. *Oral Oncol* 2012; 48: 893–897

Gelissen JH, Adjei NN, McNamara B, Mutlu L, Harold JA, Clark M, Altwerger G, Dottino PR, Huang GS, Santin AD, Azodi M, Ratner E, Schwartz PE, Andikyan V. Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy in Ovarian Cancer. *Ann Surg Oncol* 2023; 30: 5597–5609

Gerson SL, Caimi PF, William BM, Creger RJ. Pharmacology and Molecular Mechanisms of Antineoplastic Agents for Hematologic Malignancies *Hematology: Elsevier*, 2018: 849–912

Goff B. Symptoms associated with ovarian cancer. *Clin Obstet Gynecol* 2012; 55: 36–42

Haralambiev L, Nitsch A, Jacoby JM, Strakeljahn S, Bekeschus S, Mustea A, Ekkernkamp A, Stope MB. Cold Atmospheric Plasma Treatment of Chondrosarcoma Cells Affects Proliferation and Cell Membrane Permeability. *Int J Mol Sci* 2020; 21

Holschneider CH, Berek JS. Ovarian cancer: Epidemiology, biology, and prognostic factors. *Semin Surg Oncol* 2000; 19: 3–10

Issler-Fisher AC, Fisher OM, Smialkowski AO, Li F, van Schalkwyk CP, Haertsch P, Maitz PKM. Ablative fractional CO₂ laser for burn scar reconstruction: An extensive subjective and objective short-term outcome analysis of a prospective treatment cohort. *Burns* 2017; 43: 573–582

Jakse N, Payer M, Tangl S, Berghold A, Kirmeier R, Lorenzoni M. Influence of low-level laser treatment on bone regeneration and osseointegration of dental implants following sinus augmentation. An experimental study on sheep. *Clin Oral Implants Res* 2007; 18: 517–524

Jayde V, White K, Blomfield P. Symptoms and diagnostic delay in ovarian cancer: a summary of the literature. *Contemp Nurse* 2009; 34: 55–65

Katsumata N, Yasuda M, Isonishi S, Takahashi F, Michimae H, Kimura E, Aoki D, Jobo T, Kodama S, Terauchi F, Sugiyama T, Ochiai K. Long-term results of dose-dense paclitaxel and carboplatin versus conventional paclitaxel and carboplatin for treatment of advanced epithelial ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal cancer (JGOG 3016): a randomised, controlled, open-label trial. *Lancet Oncol* 2013; 14: 1020–1026

Kavanagh JJ. Docetaxel in the treatment of ovarian cancer. *Oncology (Williston Park)* 2002; 16: 73–81

Khalaj S, Iranpour B, Hodjat M, Azizi A, Kharazifard MJ, Hakimiha N. Photobiomodulation effects of pulsed and continuous wave near-infrared laser on the proliferation and migration of human gingival fibroblasts: An in vitro study. *Photochem Photobiol* 2023

Leitlinienprogramm Onkologie. 2024. S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren. Verfügbar unter <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/ovarialkarzinom/> (Zugriffsdatum: 20.12.2024)

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 Surg Med* 2015; 47: 756–764

Lukianova-Hleb EY, Samaniego AP, Wen J, Metelitsa LS, Chang C-C, Lapotko DO. Selective gene transfection of individual cells in vitro with plasmonic nanobubbles. *J Control Release* 2011; 152: 286–293

Malander S, Ridderheim M, Måsbäck A, Loman N, Kristoffersson U, Olsson H, Nilbert M, Borg A. One in 10 ovarian cancer patients carry germ line BRCA1 or BRCA2 mutations: results of a prospective study in Southern Sweden. *Eur J Cancer* 2004; 40: 422–428

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 Res* 2014; 34: 4709–4716

Matulonis UA, Sood AK, Fallowfield L, Howitt BE, Sehouli J, Karlan BY. Ovarian cancer. *Nat Rev Dis Primers* 2016; 2: 16061

Mekhail TM, Markman M. Paclitaxel in cancer therapy. *Expert Opin Pharmacother* 2002; 3: 755–766

Menon U, Karpinskyj C, Gentry-Maharaj A. Ovarian Cancer Prevention and Screening. *Obstet Gynecol* 2018; 131: 909–927

Muggia F. Weekly Carboplatin and Paclitaxel for Ovarian Cancer: The "Finer Points". *Oncologist* 2021; 26: 1–3

Naumann RW, Sukumvanich P, Edwards RP. Practice patterns of intraperitoneal chemotherapy in women with ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2009; 114: 37–41

Netsch C, Becker B, Herrmann TRW, Miernik A, Sievert K-D, Schöb DS, Westphal J, Lusuardi L, Fiedler M, Haecker A, Homberg R, Klein J-T, Lehrich K, Olbert P, Gross AJ. Laser in der Urologie : Relevante Grundlagen. *Urologe A* 2021; 60: 1211–1219

Nikolskaya AV, Nikolski VP, Efimov IR. Gene printer: laser-scanning targeted transfection of cultured cardiac neonatal rat cells. *Cell Commun Adhes* 2006; 13: 217–222

Oei AL, Vriend LEM, Crezee J, Franken NAP, Krawczyk PM. Effects of hyperthermia on DNA repair pathways: one treatment to inhibit them all. *Radiat Oncol* 2015; 10: 165

Palumbo G, Caruso M, Crescenzi E, Tecce MF, Roberti G, Colasanti A. Targeted gene transfer in eucaryotic cells by dye-assisted laser optoporation. *J Photochem Photobiol B* 1996; 36: 41–46

Pénzváltó Z, Lánczky A, Lénárt J, Meggyesházi N, Krenács T, Szoboszlai N, Denkert C, Pete I, Györffy B. MEK1 is associated with carboplatin resistance and is a prognostic biomarker in epithelial ovarian cancer. *BMC cancer* 2014; 14: 837

Pienta KJ. Preclinical mechanisms of action of docetaxel and docetaxel combinations in prostate cancer. *Seminars in oncology* 2001; 28: 3–7

Prat J. Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *International Journal of Gynecology & Obstetrics* 2014; 124: 1–5

PubChem. 2023a. PubChem Compound Summary for CID 10339178. Verfügbar unter <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cbdca> (Zugriffsdatum: 03.11.2023)

PubChem. 2023b. PubChem Compound Summary for CID 148124. Verfügbar unter <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Docetaxel> (Zugriffsdatum: 03.11.2023)

PubChem. 2023c. PubChem Compound Summary for CID 36314. Verfügbar unter <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/paclitaxel> (Zugriffsdatum: 03.11.2023)

Ramalingam SS, Pillai RN, Reinmuth N, Reck M. Frontline Systemic Therapy Options in Nonsmall Cell Lung Cancer IASLC Thoracic Oncology: Elsevier, 2018: 418-433.e6

Reid BM, Permuth JB, Sellers TA. Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biology & Medicine* 2017; 14: 9–32

Schneckenburger H, Hendinger A, Sailer R, Strauss WSL, Schmitt M. Laser-assisted optoporation of single cells. *Journal of biomedical optics* 2002; 7: 410–416

Smith JA, Ngo H, Martin MC, Wolf JK. An evaluation of cytotoxicity of the taxane and platinum agents combination treatment in a panel of human ovarian carcinoma cell lines. *Gynecologic oncology* 2005; 98: 141–145

Stein CA. Mechanisms of action of taxanes in prostate cancer. *Seminars in oncology* 1999; 26: 3–7

Stevenson D, Agate B, Tsampoula X, Fischer P, Brown CTA, Sibbett W, Riches A, Gunn-Moore F, Dholakia K. Femtosecond optical transfection of cells: viability and efficiency. *Optics express* 2006; 14: 7125–7133

St-Louis Lalonde B, Boulais E, Lebrun J-J, Meunier M. Visible and near infrared resonance plasmonic enhanced nanosecond laser optoporation of cancer cells. *Biomedical Optics Express* 2013; 4: 490–499

Stope MB, Benouahi R, Sander C, Haralambiev L, Nitsch A, Egger E, Mustea A. Protherapeutic Effects and Inactivation of Mammary Carcinoma Cells by a Medical Argon Plasma Device. *Anticancer research* 2020; 40: 6205–6212

Suter VGA, Sjölund S, Bornstein MM. Effect of laser on pain relief and wound healing of recurrent aphthous stomatitis: a systematic review. *Lasers in medical science* 2017; 32: 953–963

Torre LA, Trabert B, DeSantis CE, Miller KD, Samimi G, Runowicz CD, Gaudet MM, Jemal A, Siegel RL. Ovarian cancer statistics, 2018. *CA: a cancer journal for clinicians* 2018; 68: 284–296

Tsuyoshi H, Inoue D, Kurokawa T, Yoshida Y. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) for gynecological cancer. *The journal of obstetrics and gynaecology research* 2020; 46: 1661–1671

van Driel WJ, Koole SN, Sikorska K, van Schagen Leeuwen JH, Schreuder HWR, Hermans RHM, Hingh IHJT de, van der Velden J, Arts HJ, Massuger LFAG, Aalbers AGJ, Verwaal VJ, Kieffer JM, van de Vijver KK, van Tinteren H, Aaronson NK, Sonke GS. Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy in Ovarian Cancer. *The New England journal of medicine* 2018; 378: 230–240

Vasey PA, Jayson GC, Gordon A, Gabra H, Coleman R, Atkinson R, Parkin D, Paul J, Hay A, Kaye SB. Phase III randomized trial of docetaxel-carboplatin versus paclitaxel-carboplatin as first-line chemotherapy for ovarian carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* 2004; 96: 1682–1691

Wacker J, Sillem M, Bastert G, Beckmann MW. *Therapiehandbuch Gynäkologie und Geburtshilfe*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg 2020

Webb PM, Jordan SJ. Epidemiology of epithelial ovarian cancer. *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology* 2017; 41: 3–14

Wu Y, Sun X, Yan Y, Zhou Z, Chang Q, Chen D, Yan J, Zhang H, Wang X. Successful treatment by a chlorin e6 derivative mediated photodynamic therapy combined holmium laser for cervical and vaginal giant condyloma acuminata and low-grade intraepithelial neoplasia: A case report. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* 2024; 46: 104022

Yao C, Rahmanzadeh R, Endl E, Zhang Z, Gerdes J, Hüttmann G. Elevation of plasma membrane permeability by laser irradiation of selectively bound nanoparticles. *Journal of biomedical optics* 2005; 10: 64012

Yao C, Rudnitzki F, Hüttmann G, Zhang Z, Rahmanzadeh R. Important factors for cell-membrane permeabilization by gold nanoparticles activated by nanosecond-laser irradiation. *International journal of nanomedicine* 2017; 12: 5659–5672

Yordanov A, Tantchev L, Kostov S, Slavchev S, Strashilov S, Vasileva P. Vulvar leukoplakia: therapeutic options. *Przegląd menopauzalny = Menopause review* 2020; 19: 135–139

Zentrum für Krebsregisterdaten. 2022. Eierstockkrebs (Ovarialkarzinom). Verfügbar unter https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Eierstockkrebs/eierstockkrebs_node.html (Zugriffsdatum: 16.12.2024)

Zhang C, Xu C, Gao X, Yao Q. Platinum-based drugs for cancer therapy and anti-tumor strategies. *Theranostics* 2022; 12: 2115–2132

Zou G-P, Yu C-X, Shi S-L, Li Q-G, Wang X-H, Qu X-H, Yang Z-J, Yao W-R, Yan D-D, Jiang L-P, Wan Y-Y, Han X-J. Mitochondrial Dynamics Mediated by DRP1 and MFN2 Contributes to Cisplatin Chemoresistance in Human Ovarian Cancer SKOV3 cells. *Journal of Cancer* 2021; 12: 7358–7373

9. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Klinik für Gynäkologie und Gynäkologische Onkologie unter Betreuung von Prof. Dr. med. Dr. h.c. Alexander Mustea durchgeführt. Die Konzeption der Arbeit erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. Dr. Matthias Stope (Leiter Forschung, Klinik für Gynäkologie und Gynäkologische Onkologie, Universitätsklinikum Bonn) und Herrn PD Dr. Jörg Meister (Leiter Laserlabor, Poliklinik für Parodontologie, Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde, Universitätsklinikum Bonn). Die Einarbeitung erfolgte durch Frau Rachana Subedi (Forschungsassistentin, Klinik für Gynäkologie und Gynäkologische Onkologie, Universitätsklinikum Bonn). Bei der Ausarbeitung der Labormethoden wurde sich an die Standards des Zellbiologischen Labors der Klinik für Gynäkologie und Gynäkologische Onkologie, Universitätsklinikum Bonn angelehnt. Die Durchführung der orientierenden Versuche sowie deren initiale Auswertung erfolgten teilweise in Zusammenarbeit mit Frau Helen Becker. Der wesentliche Teil der Versuche, ebenso wie die Auswertung des verwendeten Datenmaterials und die statistische Auswertung erfolgten eigenständig. Ich übernehme die volle Verantwortung für den Inhalt der veröffentlichten Dissertationsschrift.

10. Danksagung

Mein Dank gilt zunächst dem Direktor der Gynäkologie und Gynäkologischen Onkologie Herrn Prof. Dr. Dr. Alexander Mustea, der mir die Durchführung dieser Arbeit im Labor seiner Klinik ermöglichte.

In besonderem Maße danke ich Herrn PD Dr. Dr. Matthias Stope für die exzellente Betreuung während und nach meiner Laborzeit. Er brachte mir viel Unterstützung und außerordentliches Engagement bei der Auswahl, Planung und Durchführung dieser Arbeit entgegen und stand zu jeder Tages- und Nachtzeit bei allen Problemen und Fragen zur Verfügung.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Jörg Meister, stellvertretend für das Zentrum für angewandte Laser-Medizinforschung und biomedizinische Optik (AMLaReBO) der Universität Bonn. Er half mir mit viel Expertise und Wissen im Bereich der Laserforschung, unterstützte mich tatkräftig bei den Experimenten und war stets ein zuverlässiger Ansprechpartner.

Ein großes Dankeschön möchte ich auch aussprechen an Rachana Subedi für ihr unermüthliches Engagement im Labor und das ganze Doktoranden-Team, insbesondere Helen Becker, für die lustige Zeit und angenehme Zusammenarbeit.

Zuletzt gebührt mein Dank meinen Eltern und meinem Großvater für die kritische Durchsicht dieser Arbeit, ebenso wie meiner Familie und meinen Freundinnen und Freunden für die stete Unterstützung und Rückendeckung über die gesamte Studiums- und Promotionszeit.