

**In vitro Charakterisierung der antiproliferativen  
Wirksamkeit von nicht-invasivem physikalischem  
Plasma (NIPP: Non invasive physical plasma) in den  
drei gynäkologischen Malignitäten Leiomyosarkom  
(SK-UT-1), Mammakarzinom (MCF-7 und MDA-MB-  
231) und Endometriumkarzinom (MFE-296)**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)  
der Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

**Rim Benouahi**

aus Rabat, Marokko

2025

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. Alexander Mustea
2. Gutachter: Prof. Dr. Ingo G. H. Schmidt-Wolf

Tag der mündlichen Prüfung: 30.09.2025

Aus der Klinik für Gynäkologie und Gynäkologische Onkologie

*Für meine Großeltern*



## **Inhaltsverzeichnis**

|                                                                                       |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b>                                                          | <b>7</b>  |
| <b>1. Einleitung</b>                                                                  | <b>9</b>  |
| 1.1 Das Mammakarzinom (Mamma Carcinoma - MC)                                          | 9         |
| 1.2 Das Endometriumkarzinom (Endometrial Carcinoma - EC)                              | 11        |
| 1.3 Das uterine Leiomyosarkom (uLMS)                                                  | 13        |
| 1.4 Therapieresistenz und der Einsatz von Nicht-Invasivem Physikalische Plasma (NIPP) | 14        |
| <b>2. Materialien und Methoden</b>                                                    | <b>16</b> |
| 2.1 Materialien                                                                       | 16        |
| 2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien                                                | 16        |
| 2.1.2 Chemikalien                                                                     | 17        |
| 2.1.3 Zelllinien                                                                      | 17        |
| 2.1.4 Zellkulturmedien und -zusätze                                                   | 18        |
| 2.1.5 Software                                                                        | 18        |
| 2.2 Methoden:                                                                         | 18        |
| 2.2.1 Konservierung und Auftauen von Zelllinien                                       | 19        |
| 2.2.2 Zellkultur                                                                      | 20        |
| 2.2.3 NIPP Behandlung der Zellen                                                      | 22        |
| 2.2.4 NIPP Behandlung der Medien                                                      | 23        |
| 2.2.5 Migrationassay                                                                  | 23        |
| 2.3 Statistische Auswertung                                                           | 24        |
| <b>3. Ergebnisse</b>                                                                  | <b>25</b> |
| 3.1 Direkte Behandlung mit NIPP                                                       | 25        |
| 3.2 Die indirekte NIPP-Behandlung                                                     | 29        |
| 3.3 Migration Assay                                                                   | 31        |
| <b>4. Diskussion</b>                                                                  | <b>36</b> |

|                                     |           |
|-------------------------------------|-----------|
| <b>5. Zusammenfassung</b>           | <b>43</b> |
| <b>6. Abbildungsverzeichnis</b>     | <b>44</b> |
| <b>7. Tabellenverzeichnis</b>       | <b>45</b> |
| <b>8. Literaturverzeichnis</b>      | <b>46</b> |
| <b>9. Erklärung zum Eigenanteil</b> | <b>50</b> |
| <b>10. Veröffentlichung</b>         | <b>51</b> |
| <b>11. Danksagung</b>               | <b>52</b> |

## Abkürzungsverzeichnis

|                               |                                                                                                      |
|-------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Abb                           | Abbildung                                                                                            |
| AK                            | Antikörper                                                                                           |
| BRCA1/2                       | Breast Cancer 1 and 2                                                                                |
| CASY                          | Gerät zur Zellzählanalyse                                                                            |
| CAT                           | Katalase, baut Wasserstoffperoxid ab                                                                 |
| DMEM                          | Dulbecco's Modified Eagle Medium                                                                     |
| DMSO                          | Dimethylsulfoxid                                                                                     |
| EC                            | Endometrial Carcinoma (Endometriumkarzinom)                                                          |
| EDTA                          | Ethylendiamintetraessigsäure                                                                         |
| EGFR                          | Epidermal Growth Factor Receptor                                                                     |
| ER Status                     | Estrogen Receptor Status                                                                             |
| F12                           | Ham's F-12 Nutrient Mix                                                                              |
| FBS                           | Fetal Bovine Serum                                                                                   |
| FIGO                          | Fédération internationale de Gynécologie et d'Obstétrique                                            |
| GTH Px                        | Glutathion Peroxidase                                                                                |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Wasserstoffperoxid                                                                                   |
| HER-2                         | Human Epidermal Growth Factor Receptor 2                                                             |
| KOLON CA                      | Kolorektales Karzinom                                                                                |
| MC                            | Mamma Carcinoma (Mamma Karzinom)                                                                     |
| MCF-7                         | Zelllinie aus menschlichen Brustkrebs (ER-positiv, hormonabhängig)                                   |
| MDA-MB-231                    | Menschliche Brustkrebszelllinie (tripel-negativ, keine Estrogen-, Progesteron- oder HER2-Rezeptoren) |
| MEM                           | Minimum Essential Medium                                                                             |
| MFE 296                       | Zelllinie aus Endometriumkarzinom                                                                    |
| mTOR                          | Mechanistic Target of Rapamycin                                                                      |
| NIPP                          | Non Invasive Physical Plasma                                                                         |
| NO                            | Stickstoffmonoxid                                                                                    |
| OC                            | Ovarian Cancer (Ovarialkarzinom)                                                                     |

|           |                                                                  |
|-----------|------------------------------------------------------------------|
| P21       | Tumorsuppressorprotein (Inhibitor von Cyclin-abhängigen Kinasen) |
| P53       | Tumorsuppressorprotein (Regulator des Zellzyklus und Apoptose)   |
| PALB2     | Partner and Localizer of BRCA2                                   |
| PARP      | Poly(ADP-ribose)-Polymerase                                      |
| PBS       | Phosphate-Buffered Saline                                        |
| PCOS      | Polycystic Ovary Syndrome (Polyzystisches Ovarialsyndrom)        |
| PTEN      | Phosphatase and Tensin Homolog (Tumorsuppressorgen)              |
| RKI       | Robert Koch Institut                                             |
| ROS       | Reactive Oxygen Species (reaktive Sauerstoffspezies)             |
| RPMI 1640 | Roswell Park Memorial Institute Medium 1640                      |
| SD-CA     | Schilddrüsen Karzinom                                            |
| SKUT1     | Zelllinie aus einem menschlichen Leiomyosarkom des Uterus        |
| SOD       | Superoxide Dismutase                                             |
| Tab.      | Tabelle                                                          |
| TNM       | Tumor, Node, Metastasis                                          |
| UICC      | Union for International Cancer Control                           |
| uLMS      | Uterine Leiomyosarcoma (Uterus-Leiomyosarkom)                    |



## 1. Einleitung

### 1.1 Das Mammakarzinom (Mamma Carcinoma - MC)

#### Epidemiologie und Risikofaktoren

Die bösartige Neoplasie der Brustdrüse ist die häufigste Todesursache bei Frauen zwischen dem 35. und 55. Lebensjahr (Petru et al., 2011). Seit Jahrzehnten machten sich Gesellschaften der Medizin und Naturwissenschaften auf der Suche nach Ätiologie, Risikofaktoren und Therapieansätze. Leider bleibt das MC einer der häufigsten malignen Todesursache der Frau, selbst in Ländern mit fortgeschrittener Medizin (Todesursachenstatistik 2020).

2005 ist in Deutschland das Mammographie-Screening-Programm eingeführt worden (Bauerfeind, 2017). 2010 zeigte die Inzidenz eine leicht regrediente Tendenz (Bauerfeind, 2017). Dennoch bleibt das MC der häufigste bösartige Tumor der Frau (Bauerfeind, 2017). Erwähnenswert ist, dass 0,5-1% des diagnostizierten MCs sich bei Männern befinden (Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, 2021))

Heutzutage sind einige Faktoren, die die Entstehung eines MC begünstigen, bekannt. Diese lassen sich in drei Kategorien unterteilen: hereditäre, hormonelle und lebensstilbedingte. Genetische Veranlagungen versucht man im Rahmen der gynäkologischen Betreuung mithilfe der Familienanamnese und gegebenenfalls der humangenetischen Beratung festzustellen, um den Patientinnen und Patienten eine möglichst passende Vorsorge anbieten zu können. Die bis jetzt bekannten, wichtige Gene in diesem Rahmen sind BReast CAncer Gene BRCA1, BRCA2 und Partner And Localizer of BRCA2 (PALB2) (Wallwiener et al., 2019). Das heißt es lassen sich nur in diesen Genen Mutationsnachweise finden (Petru et al., 2011). Da 80% der Mutationsträgerinnen und -träger im Laufe ihres Lebens an einem MC und häufig an einer sekundären Neoplasie erkranken (Petru et al., 2011), sind individualisierte Vorsorgemaßnahmen von besonderer Bedeutung.

Die hormonelle Komponente spielt eine der wichtigsten Rollen, im therapeutischen Vorgehen beim MC. Es geht weit darüber hinaus, zu bestimmen, welche Hormone bzw. welche Hormonkonstellationen die Entstehung eines MCs fördert, sondern die

sogenannte Rezeptor- und Status Human Epidermal growth factor Receptor 2 (HER-2) des MCs zu bestimmen und dementsprechend die Therapieplanung zu optimieren. Das Leitlinienprogramm des MC empfiehlt die Bestimmung der Progesteron-, Östrogenrezeptorstatus und HER2-Status vorzugsweise schon in der Stanzbiopsie (Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, 2021)).

Zu den Risikofaktoren, die durch den Lebensstil beeinflussbar sind, gehören die niedrige Geburtenrate, Adipositas, hoher Alkohol- und Nikotinkonsum sowie die geringe körperliche Aktivität (Petru et al., 2011). Daher empfiehlt sich bei der jährlichen gynäkologischen Untersuchung diese Risikofaktoren anzusprechen und im besten Fall zu minimieren.

### Therapieoptionen

Generell gilt bei fast allen gynäkologischen Tumoren, die vollständige Resektion in den Frühstadien als Mittel der Wahl (Petru et al., 2011). Chemotherapie und Radiotherapie spielen als adjuvante oder neoadjuvante Therapien eine Rolle. Beim MC ist mittlerweile bekannt, dass eine adjuvante Radiotherapie einen großen Überlebensvorteil darstellt (Bauerfeind, 2017). Sie stellt die wichtigste Maßnahme dar, Rezidive zu verhindern (Bauerfeind, 2017). Sowohl die adjuvante Chemo- als auch die Hormontherapie sind bei der Therapie des MCs seit Beginn der onkologischen Behandlungen unverzichtbar (Bauerfeind, 2017). Das MC wird in HER2-positiv und -negativ unterteilt und je nach Konstellation, gibt es besondere Therapieschemata, die zum Einsatz kommen. HER2-negatives MC geht mit einer schlechten Prognose einher, da es auf nur wenige Therapien anspricht. Im Gegensatz dazu finden sich bei dem HER2-positiven MC eine Reihe an medikamentöse Möglichkeiten, darunter orale Tyrosin-Kinase-Inhibitoren, monoklonale Antikörper (AK) und deren Konjugate (Bose und Ma 2021).

20% der an MC Erkrankten weisen eine Mutation im BRCA1 und/oder BRCA2 Gen auf (Petru et al., 2011). Die individualisierte Medizin bietet in diesem Fall kaum zielgerichtete Therapien an. 2017 hat eine Studie gezeigt, dass Olaparib (Poly (adenosine diphosphate [ADP]–ribose) polymerase, PARP- Inhibitor) eine signifikante Erhöhung der Überlebensrate bei Patientinnen mit BRCA-Mutation und HER2-negativem MC (Robson,

2017; Fong, 2009). Ansonsten werden Therapiekonzepte nur nach Rezeptorstatus und HER-2-Status erstellt.

Zusammenfassend, kommen mehrere Therapien beim MC zum Einsatz: operative, Radio-, Chemo- und endokrine Therapie. Trotz der hohen Komplexität und Toxizität dieser Therapiekombination, bleibt die Mortalität in Deutschland relativ hoch (Bauerfeind, 2017).

## 1.2 Das Endometriumkarzinom (Endometrial Carcinoma - EC)

### Epidemiologie, Einteilung und Risikofaktoren

Das EC betrifft am häufigsten postmenopausale Frauen, um das Alter von 68 Jahren (Petru et al., 2011). Mit einer Inzidenz in Deutschland von 10 900 /Jahr und eine Rate von 41% aller Genitaltumore, bildet das EC die häufigste gynäkologische Neoplasie (Petru et al., 2011; S3-Leitlinie Endometriumkarzinom, 2024). Die 5-Jahre-Überlebensrate beim EC beträgt unabhängig vom Stadium ca. 82% (Kuhn et al., 2012). 2020 sind 1438 Frauen in Deutschland an bösartigen Neubildungen des Endometriums verstorben (Todesursachenstatistik, 2020).

Das Risiko an einem EC zu erkranken, erhöht sich mit zunehmendem Alter (S3-Leitlinie Endometriumkarzinom, 2024). Erst ab dem 80. Lebensjahr nimmt das Risiko wieder ab (S3-Leitlinie Endometriumkarzinom, 2024). Das mittlere Alter bei Erstdiagnose in Deutschland beträgt 68 Jahre (S3-Leitlinie Endometriumkarzinom, 2024).

Das EC lässt sich in Typ-I und Typ-II unterteilen. Diese beiden Typen unterscheiden sich im Wesentlichen durch die Pathogenese und histologische Struktur. Damit einher gehen unterschiedliche Verläufe, Therapieansätze und Prognosen. Während die Entstehung des Typ-I-ECs auf Pathologien des Tumorsuppressorgens PTEN, Mikrosatelliteninstabilitäten und k-ras- und oder  $\beta$ -Catenin-Mutationen beruht, spielen die p53-Mutationen und HER2-Überexpressionen bei Typ-II-ECs die entscheidende Rolle (Kuhn et al., 2012). Ein zweiter entscheidender Unterschied ist die Abhängigkeit des ECs von dem Hormonhaushalt. Während Typ-I-EC hormonabhängig ist, ist Typ-II-EC dagegen nicht. Damit ist die Prognose des Typ-II-ECs sehr schlecht (Kuhn et al., 2012; Petru et al.,

2011). Aufgrund der variablen Pathogenese gibt es entsprechend unterschiedliche Therapieangriffspunkte.

Aufgrund der unterschiedlichen Pathomechanismen der beiden Typen, gibt es abweichende Risikofaktoren. Zu den Risikofaktoren, die die Entstehung eines Typ-I-ECs begünstigen, gehören unter anderem das fortgeschrittene Alter, Adipositas, eine gestörte Glukosetoleranz, das metabolische Syndrom und das polyzystische Ovarialsyndrom (PCOS). Die Hormontherapie stellt ein besonderes Risiko dar, da sie meistens iatrogen sein kann. Darunter ist die isolierte Therapie gemeint, also reine Östrogene ohne Gestagenenschutz. Hier ist besonders wichtig darauf hinzuweisen, dass eine kombinierte-kontinuierliche Therapie abhängig von der Dauer karzinogen sein kann. Während eine Therapiedauer von unter 5 Jahren als sicher gilt, ist eine Therapie ab 10 Jahren in den meisten Fällen krebserregend. Unter den Medikamenten, die eine Entstehung des ECs fördern, gehören insbesondere Tamoxifen und Tibolon. Tamoxifen besitzt eine antagonisierende Wirkung am Östrogenrezeptor der Brustdrüsen und wird deswegen in der Chemotherapie des MCs genutzt. Gleichzeitig ist es aber ein Östrogenrezeptoragonist am Endometrium und begünstigt dort die Entstehung eines Karzinoms. Tibolon ist ein synthetisches Steroid, was für die Behandlung klimakterischen Beschwerden zugelassen ist. Das Typ-II-EC kann nach einer Bestrahlung des Beckens oder auch ohne vorherige Risikofaktoren auftreten (Petru et al., 2011).

### Therapieoptionen

Je nach FIGO-Stadium kommt es beim EC, sowie beim MC, ebenfalls zur operativen Therapie. Hier im Rahmen einer totalen Hysterektomie inklusive beidseitiger Adnexexstirpation oder beidseitige Salpingektomie (bei prämenopausalen Frauen) (Kuhn et al., 2012). Je nach histologischen Differenzierungen, kommt es zusätzlich zur Chemotherapie. Meistens wird eine Kombination aus Doxurobucin und Cisplatin angewendet. Auch hier spielt die Radiotherapie eine wichtige Rolle, gerade bei Inoperabilität der Patientinnen (Kuhn et al., 2012). Die adjuvante endokrine Therapie ist auch beim positiven Rezeptorstatus nicht mehr indiziert. Es konnte keine positive Beeinflussung des Gesamtüberlebens gezeigt werden (Kuhn et al., 2012).

### 1.3 Das uterine Leiomyosarkom (uLMS)

#### Epidemiologie und Ätiologie

Das Leiomyosarkom gehört zu den nicht-epithelialen Tumoren und kommt überall vor, wo glatte Muskulatur zu finden ist. Mit einer Häufigkeit von 63% stellt das uLMS das häufigste Sarkom des Corpus uteri (Petru et al., 2011). Das uLMS tritt sowohl einzeln als auch zusammen mit Leiomyomen (Leitlinienprogramm S2k Uterine Sarkome, 2024). Häufig treten klinisch Blutungsstörungen und je nach Größe Druckgefühle vaginal oder abdominal auf (Leitlinienprogramm S2k Uterine Sarkome, 2024).

Die Klinik bei Leiomyomen ist allerdings sehr ähnlich, sodass eine sichere Differenzierung, sowohl klinisch als auch bildmorphologisch, eine Herausforderung darstellt (Leitlinienprogramm S2k Uterine Sarkome, 2024). Selbst eine Abrasio oder Endometriumbiopsie bei postmenopausalen Frauen zeigte zu 50% falsch-negative Ergebnisse (Leitlinienprogramm S2k Uterine Sarkome, 2024). Damit bleibt das uLMS ein hoch aggressiver Tumor, dessen Diagnose nur histologisch endgültig festzustellen ist. Schon bei Verdacht auf ein auf das Uterus begrenztes uLMS sollte eine Hysterektomie, möglichst ohne Morcellement oder Uterusverletzung, erfolgen (Leitlinienprogramm S2k Uterine Sarkome, 2024). Studien haben gezeigt, dass Risikofaktoren des endometrioiden ECs (Typ I) meistens auch auf die uterinen Sarkome übertragbar sind (Leitlinienprogramm S2k Uterine Sarkome, 2024).

#### Therapieoptionen

Bei diesem hochaggressiven Tumor bleibt die Hysterektomie bei auf dem Uterus begrenztes uLMS Mittel der ersten Wahl (Kuhn et al., 2012). Es gibt keine etablierten Schemata zur Chemotherapie, da es sehr schlecht auf diese anspricht. Selbst auf eine Kombination aus zwei Zytostatika zeigt das uLMS nur eine 30%-53%ige Ansprechrates (Petru et al., 2011; Kuhn et al., 2012). Obwohl 40% der uLMS einen positiven Hormonrezeptorstatus aufweisen, zeigte sich die Antihormontherapie bedauerlicherweise nicht erfolgreich. Eine Radiotherapie ist beim uLMS nur nach positiven Resektionsrändern indiziert (Petru et al., 2011). Generell gesehen, bleiben für Patientinnen, die sich im entwickelten Stadium befinden, oder die die zwar im frühen Stadium sind, aber aufgrund

von anderen Faktoren (Bsp. Alter, Komorbiditäten..) nicht operabel sind, keine kurative Therapien zur Auswahl.

#### 1.4 Therapieresistenz und der Einsatz von Nicht-Invasivem Physikalische Plasma (NIPP)

Für Jahrzehnte galt eine Krebserkrankung als ein Todesurteil. Eine kausale Therapie war unvorstellbar. Heutzutage lassen sich eine Reihe an Krebserkrankungen, die früh entdeckt werden, kurativ therapieren. Darunter das Kolon-CA, SD-CA, selbst LMS, EC, MC und andere. Die Therapie erfolgt meistens in Kombination mehrerer Techniken, operativ, radioaktiv und pharmakologisch im Sinne der Chemotherapie. Mithilfe der Wissenschaft findet eine ständige Entwicklung der Zytostatika mit besonderem Fokus auf Target-Proteine statt. Die zellbiologische Forschung konnte mehrere Signalwege und Proteine identifizieren, die entweder durch deren Aktivierung oder Inhibierung einen direkten Einfluss auf die Entstehung der Krebserkrankung haben, zum Beispiel p53. Leider ist zu beobachten, dass viele Karzinome, die initial auf eine Chemotherapie angesprochen haben, plötzlich kein Ansprechen mehr zeigten. Ein deutliches Beispiel bietet das kleinzellige Lungenkarzinom anhand der Epithelial Growth Factor Receptor (EGFR) Mutationen an (Zuan-Fu und Ma, 2019). Es konnte gezeigt werden, dass ein simpler Austausch von Aminosäuren, in diesem Fall Methionin gegen Threonin an der Stelle 790 (T790M) des EGFR, schon das kleinzellige Lungenkarzinom gegen Erst- und Zweitgeneration Tyrosinkinase-Inhibitoren resistent machen (Zuan-Fu und Ma, 2019). Das Nicht-Invasive Physikalische Plasma (NIPP) scheint in der Behandlung von bösartigen Tumoren vielversprechend zu sein, da es unterschiedliche Effekte auslöst. Die Wirkung von NIPP geht auf die Entstehung einer großen Menge an reaktive Sauerstoffspezies, sogenannte ROS (reactive oxygen species) zurück (Motaln et al., 2021).  $H_2O_2$  und NO scheinen die wichtigste zytotoxische Wirkung intra- und interzellulär zu erzielen (Motaln et al., 2021). Es konnte gezeigt werden, wie diese Substanzklassen bestimmt Aquaporine in der Zellmembran der Tumorzellen passieren und für die Erschöpfung der Glutathione sorgen (Motaln et al., 2021). Dieses dann führt zum Zelltod. Selbstverständlich stellte sich die Frage der Selektivität zwischen Tumorzellen und normalen Zellen, da diese ebenfalls Aquaporine in der Zellmembran exprimieren, scheinen allerdings bei derselben Behandlungsdauer mit NIPP intakt zu bleiben. Eine

Studie konnte zeigen, dass Glioblastom-Zellen im Vergleich zu den Astrozyten eine viel größere Menge an Aquaporinen in der Zellmembran exprimieren und daher schneller die ROS absorbieren (Yan et al., 2015).

Es scheint zudem einen Zusammenhang zwischen der NIPP-Wirkung und der Inaktivierung bestimmter membrangebundener Katalasen, die zu Apoptose führen, zu geben. Der genaue molekulare Signalweg ist allerdings noch nicht geklärt. In Cholangiokarzinomen konnte gezeigt werden, wie NIPP die Konzentration von Caspase 3 in Tumorzellen erhöht (Vaquero, 2020). Eine Erhöhung der p53-Expression in Osteosarkom-Zellen und p21-Expression in Zellen des Colonkarzinoms konnte ebenfalls erzielt werden, nach Behandlung dieser Karzinome mit NIPP und mit behandeltem Medium (Motaln et al., 2021). Es wird also vermutet, dass NIPP weitere Signalwege intra- und extrazellulär antiproliferativ beeinflusst. Die Forschung befindet sich allerdings noch in den frühen Stadien. NIPP ist daher keine Target-Therapie im engeren Sinne. Diese Behandlung muss multimodal betrachtet werden, da sie einfach in mehreren Signalwegen eingreift. Das spricht dafür, dass NIPP noch intensiv erforscht werden muss, um mögliche potenzielle Nebenwirkungen zu identifizieren und die wichtigen Maßnahmen dabei zu ergreifen.

Die Ziele dieser Arbeit sind herauszufinden, ob eine antiproliferative NIPP-Wirkung auf Zellen des MC, EC und uLMS zu beobachten ist. Hierbei sollten insbesondere die klinischen Aspekte in Betracht gezogen werden, v.a. die Untersuchung von Nebenwirkungen auf gesundes umliegendes Gewebe.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

**Tab. 1:** Geräte und Verbrauchsmaterialien

| Geräte/Materialien                                        | Herkunft                                                                                                               |
|-----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| accu-jet pro                                              | BRAND GmbH (Wertheim, DE)                                                                                              |
| Acrylglasgestell 4x12                                     | Carl Roth (Karlsruhe, DE)                                                                                              |
| Autoklav VX-150                                           | Systec (Wettenberg, DE)                                                                                                |
| CASY Model TT                                             | Cell counter and Analyzer Roche Diagnostics (Basel, Schweiz)                                                           |
| CASY-Röhrchen                                             | Roche Innovatis AG (Bielefeld, DE)                                                                                     |
| Inkubationsbad 1003                                       | GFL (Burgwedel, DE)                                                                                                    |
| Kryo-Aufbewahrungsbox mit Deckel                          | neoLab (Heidelberg, DE)                                                                                                |
| Kryo-Einfrierröhrchen                                     | Greiner bio-one (Frickenhausen, DE)                                                                                    |
| 50 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml, 2000 ml Laborglasflaschen | DURAN Group GmbH (Wertheim/Main, DE)                                                                                   |
| Mikroskop Nikon TMS                                       | Nikon Instruments (Düsseldorf, DE)                                                                                     |
| Multiwell 24-Well (für Zeiss-Mikroskop)                   | BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)                                                                               |
| Neubauer-Zählkammer                                       | LO-Laboroptik (Lancing, GB)                                                                                            |
| Pipettensatz, 0,5 - 1.000 µl                              | Eppendorf (Hamburg, DE)                                                                                                |
| Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße                       | BD Biosciences (Heidelberg, DE); Biozym GmbH (Hessisch Oldendorf, DE); Sarstedt (Nümbrecht, DE); VWR (Radnor, PA, USA) |
| Plasmajet – kIN-Pen <sup>®</sup> MED                      | Neoplas tools (Greifswald, DE)                                                                                         |
| Sicherheitswerkbank                                       | Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)                                                                                   |



|                               |                                                                                                 |
|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Zellkulturplastik             | Sarstedt (Nümbrecht, DE); Greiner bio-one (Frickenhausen, DE); Merck Millipore (Billerica, USA) |
| Zentrifugen - 5810R und 5415R | Eppendorf (Hamburg, DE)                                                                         |

### 2.1.2 Chemikalien

**Tab. 2:** Chemikalien

| <b>Chemikalie</b>                       | <b>Herkunft/Zusammensetzung</b>                                                                                                           |
|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Argon                                   | Air Liquide (Düsseldorf, DE)                                                                                                              |
| CASYton                                 | 0,9 % NaCl; 0,02925 % EDTA                                                                                                                |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)     | Carl Roth (Karlsruhe, DE)                                                                                                                 |
| Fetal Bovine Serum (FBS)                | Biochrom AG (Berlin, DE)                                                                                                                  |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)                 | Sigma-Aldrich (München, DE)                                                                                                               |
| 10x PBS                                 | 1,37 M NaCl; 26,8 mM KCl; 17,6 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 101,1 mM Na <sub>2</sub> PO <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O; pH 7,4 |
| Natriumchlorid (NaCl)                   | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)                                                                                                        |
| Stopplösung                             | 10 % h.i. FBS in PBS                                                                                                                      |
| Trypsin/EDTA Solution (10x) 0,5 %/0,2 % | Merc Millipore (Billerica, MA, USA)                                                                                                       |

### 2.1.3 Zelllinien

**Tab. 3:** Gynäkologischen Zelllinien

| <b>Zelllinie</b> | <b>Herkunft</b>                                                                    |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| SK-UT-1          | Cell Lines Service (Eppelheim, DE)                                                 |
| MCF-7            | DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH (Braunschweig, DE) |

|             |                                                                                    |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| MDA-MB- 231 | American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)                               |
| MFE-296     | DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH (Braunschweig, DE) |

#### 2.1.4 Zellkulturmedien und -zusätze

**Tab. 4:** Medien und Zusätze

| Medium/Zusatz            | Herkunft/Zusammensetzung                           |
|--------------------------|----------------------------------------------------|
| DMEM/F12                 | Gibco Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, CA, USA) |
| Einfriermedium           | 95 % Vollmedium 5 % DMSO                           |
| Fetal Bovine Serum (FBS) | Biochrom AG (Berlin, DE)                           |
| Gentamycin               | Ratiopharm (Ulm, DE)                               |
| RPMI1640                 | Biochrom AG (Berlin, DE)                           |
| MEM (Earle's)            | Biochrom AG (Berlin, DE)                           |

#### 2.1.5 Software

**Tab. 5:** Benutzte Softwares

| Software                              | Hersteller                               |
|---------------------------------------|------------------------------------------|
| GraphPad Prism 5                      | GraphPad Software (LA Jolla, USA)        |
| Microsoft Excel/Word/Power Point 2019 | Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA) |
| Zeiss ZEN pro 2012                    | Carl Zeiss AG (Oberkochen, DE)           |

#### 2.2 Methoden:

### 2.2.1 Konservierung und Auftauen von Zelllinien

Um reproduzierbare Experimente durchführen zu können, müssen die Zellen passagiert und konserviert werden.

#### Auftauen

Um die konservierte Zelllinie aufzutauen, wurden in einem mit 37 °C vorgeheiztem Wasserbad 10 ml Medium (für 1 Kryovat) in einem 50 ml Falcon erwärmt. Das eingefrorene Kryovat wurde für 30 sec. in dem Wasserbad erwärmt. Nach komplettem Auftauen wurden die Zellen in das Falcon überführt und zentrifugiert. Alle vier Zelllinien mussten für 5 Minuten mit einer Geschwindigkeit von 300 U/min für 5min zentrifugiert werden. Den Überstand wurde abgesaugt und das übrig gebliebene Zellpellet mit 1 ml Medium resuspendiert und in eine, mit 10ml zelllinienspezifischem Medium gefüllte T 75 Flasche gegeben. Die Flasche wurde ebenfalls bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden jeden Tag mikroskopisch kontrolliert.

#### Passagieren

Unabhängig davon welche Zelllinie man kultiviert hat, erfolgten die Schritte des Passagierens gleich. Nachdem mikroskopisch festzustellen ist, die Zellen sind dicht zusammengewachsen, müssen diese verdünnt werden, um ein Absterben zu verhindern. Dies geschieht durch das „Passagieren“. Ein Verfahren, indem man die Zellen in Suspension bringt. Es wurden hier immer T 75 Flaschen genutzt. Dafür hat man erstens das Medium abgesaugt und mit 3 ml PBS gespült und anschließend abgesaugt. Es wurden 2 ml Trypsinlösung auf die Zellen gegeben und die Flasche wurde 3-5 min. inkubiert. Die Zellen lösten sich mithilfe der Trypsinlösung vom Boden ab. Währenddessen hat man die sogenannte STOP-Lösung vorbereitet: in einem 50ml Falcon kommen 9 ml PBS und 1 ml FBS pro T 75 Flasche. Zusätzlich zum chemischen Ablösen, wurden die Flaschen geklopft (mechanisches Ablösen), sogenannte „Shake-Off-Verfahren“. Die Flasche wurde danach mit der STOP-Lösung gespült und die komplette Suspension in ein 50 ml Falcon überführt und zentrifugiert.

Nach Zentrifugieren und Absaugen des Überstandes, ist ein Verdünnungsverhältnis ausgewählt worden und die Zellen wurden in eine neue Flasche überführt. Das Verdünnungsverhältnis der jeweiligen Zelllinie wurde der folgenden Tabelle entnommen.

**Tab. 6:** Verdünnungsverhältnis der jeweiligen Zelllinien

|            | 3 Tage | 4 Tage |
|------------|--------|--------|
| SK-UT-1    | 1:10   | 1:12   |
| MFE-296    | 1:10   | 1:12   |
| MCF-7      | 1:3    | 1:4    |
| MDA-MB-231 | 1:3    | 1:4    |

Jede Passage wurde dokumentiert. Für diese Arbeit sind die Zellen aller Zelllinien ab Passage 30 nicht mehr zu benutzen.

#### Kryokonservierung

Die Zellen wurden erstens mit PBS und dann mit Trypsin gespült, danach erneut mit 1 ml FBS und 9 ml Medium (STOP-Lösung) gewaschen, um die trypsinogene Wirkung zu hemmen. Das Falcon wurde zentrifugiert und die nach Absaugen gebliebene Zellpellet in wenigen Milliliter Medium suspendiert. Die Zellzahl wurde mit der Neubauer-Zellkammer bestimmt. Für je 3 Mio. Zellen kommt 1 ml Medium und 5 % DMSO ins Kryovat. Das Kryovat wurde für maximal 24h bei -80 °C gelagert und danach permanent bei -140 °C.

#### 2.2.2 Zellkultur

##### Aussaat

Sowohl für die Behandlungen mit NIPP als auch für das Migrationassay wurden Zellen in 24er Wellplatten ausgesät. Da die drei Entitäten unterschiedliche Wachstumsverhältnisse aufweisen, wurde für jede Zelllinie eine passende Anfangszellzahl bestimmt. Diese ist aus Tabelle 2 zu entnehmen. Nach dem Passagieren wurden die Zellen in Suspension mit

Medium weiter verdünnt um eine Zellzahlbestimmung mittels des CASY Gerätes zu ermöglichen (Zelllinien wie SK-UT-1 und MFE-296 brauchten ungefähr 6 ml Medium bis es möglich war, die richtige Verdünnung zu erzielen). Um die Zellzahl zu errechnen, die man aussäen möchte wurde folgende Formel benutzt:

$$\frac{\text{Anzahl der Wells (+1 oder 2 Reserve)} * \text{Anfangsanzahl}}{\text{gemessene Zellzahl}}$$

Für die Beobachtungskinetiken wurde jeweils 1ml Suspension pro Well zugegeben, d.h. die Zellzahl, die man errechnet hat, plus zelllinienspezifischen Medium, um auf 1ml zu kommen. Idealerweise wurde die Suspension vorsichtig und langsam mittig in das Well pipettiert. Zu rasches Pipettieren führt zum „Splattering“ der Zellen. Diese kann dazu führen, dass die Zellen an den Wänden haften und dementsprechend nicht richtig wachsen. Diese Methode ist außerdem auch für Migrationassay extrem wichtig, da sonst ein zelldichter Rasen nicht erzielt werden kann. Die Wellplatte wurde dann bei 37 °C inkubiert.

**Tab. 7:** Empfohlene Anfangszahl pro Zelllinie für die Kultivierung

|            | 24er Well |
|------------|-----------|
| SK-UT-1    | 10.000    |
| MFE-296    | 20.000    |
| MCF-7      | 45.000    |
| MDA-MB-231 | 30.000    |

## Ernte

Um eine möglichst kleine Standardabweichung zu bekommen, ist eine Methode für das Ernten ausgewählt worden, die gut reproduzierbar ist. In dieser Arbeit erfolgte die Ernte wie folgt: nach der Inkubation ist die Platte erstmals mikroskopisch beurteilt worden. Danach folgte ein Absaugen des Mediums, und ein Abwaschen mit 500 µl PBS, was wieder abgesaugt wurde. Es erfolgte danach die Zugabe von 200 µl Trypsinlösung. Die Platte wurde erneut 1 min lang inkubiert. Für jedes Well, wurde vor der Ernte ein 1,5 ml

Reaktionsgefäß vorbereitet. Nach der Inkubation wurde mit der 200 µl Trypsinlösung das Well gespült, dreimal resuspendiert und dann ins Reaktionsgefäß überführt. Das Well wurde weiter mit 800 µl PBS gespült. Hier wurde die Spülung immer 12 h zugegeben und erst nach 6 h hoch und herruntersuspendiert. Anschließend ins Reaktionsgefäß überführt. Um sich zu versichern, dass man alle Zellen mitgenommen hat, ist ein Mikroskopieren des Wells nach der Ernte sinnvoll.

### Zellzählung mittels CASY TT

Nachdem die Wells geerntet und die Suspension ins Reaktionsgefäß überführt wurde, konnte man mittels CASY die Lebendzellzahl messen. Man bereitet die Gefäße mit jeweils 10 ml CASY TON Lösung vor und vor dem Pipettieren wurden das Reaktionsgefäß dreimal hin und her geschwenkt und abgeklopft. Danach sind 100 µl in den mit CASYTON gefüllten Gefäßen pipettiert und verdünnt. Diese wurden zugemacht und sind ebenfalls drei mal hin und her geschwenkt worden. Die Messung konnte erst dann erfolgen. Dafür im CASY Gerät besonderes wichtig zu beachten sind die Grenzeinstellungen, da jede Zelllinie unterschiedlich groß ist. Zwischen Zelllinien musste das CASY geeicht werden. Die Zellzahl wird dann in Zellen/ml gegeben.

### 2.2.3 NIPP Behandlung der Zellen

Für die Behandlung mit NIPP sind 200 µl der Zellsuspension pro Well ausgesät worden. Da es sich um voneinander unabhängige Experimente handelt, brauchte man für 1 Versuch mit NIPP und Kontrolle, Zellen aus einer Flasche. Der Plasma-Pen sollte ungefähr 10 min vor Versuchsbeginn angeschlossen sein und laufen. Nach Pipettieren der zu behandelnder Menge (hier 200 µl) beginnt man mit der Behandlung. Man behandelt mit dem Pen in pendelnder Bewegung, schwankend von rechts nach links bis die Zeit um ist. Wichtig ist dabei zu beachten, dass die Plasma Flamme die Oberfläche der Suspension berührt. Ist die Flamme zu weit weg von der Oberfläche, kommt nur der Trägergas an und man bekommt keine Ergebnisse der Behandlung. Ist der Pen zu tief, kann es zur Funktionsstörung dessen kommen. Nach der NIPP Behandlung behandelt man die Kontrolle mit Argon. Idealerweise wird die Suspension gleich in eine neue Platte

geführt und mit 800 µl Medium das alte Well gespült und ins neue zugegeben. Dieser Schritt ist essentiell, um Interaktionen des Plasmas mit der Platte ausschließen zu können. Man notiert die Zeit der Behandlung und kann die Platte bei 37 °C inkubieren.

#### 2.2.4 NIPP Behandlung der Medien

Dafür hat man die Zellen ausgesät, wie im Schritt 2.1 und für 24 Stunden inkubiert. Erst dann hat man 1 ml Medium/Well in einer 24er Platte pipettiert und mit NIPP bzw. Argon für die Kontrolle behandelt. Man holt die Platte vom Inkubationsschrank nur raus, wenn das neue Medium behandelt und bereit für eine vorsichtige Übertragung ist. Man saugt das alte Medium ab und ersetzt es mit dem mit NIPP behandelten Medium.

#### 2.2.5 Migrationassay

Um den Einfluss der NIPP-Behandlung, sowohl direkt als auch indirekt, auf die Zellmotilität zu bestimmen, ist ein Migrationassay über 120h für alle vier Zelllinien durchgeführt worden.

Dafür ist eine Zellzahl gewählt worden, worunter nach 24 Stunden den Boden eines Wells gänzlich bewachsen konnte. Diese Zellzahl ist danach in zwei Wells aufgeteilt worden. Ein Well ist mit NIPP behandelt worden, die Kontrollgruppe mit Argon. Eine zu starke Inhibierung des Zellwachstums wurde das Experiment negativ beeinflussen, daher die Notwendigkeit der Festlegung der Zellzahl.

Nach der Behandlung sind die Zellen in neuen Wells ausgesät und inkubiert worden. Nach 24 Stunden erfolgte das „Trennen“ der Zellen. Dies bedeutet, mithilfe einer 200 µl Pipettenspitze ist eine gerade Linie in der Mitte des Wells durchgezogen worden, um einen „Scratch“ zu erzeugen, eine Trennung mittig im Well um eine mikroskopisch zellfreie Fläche zu erzielen. Danach ist mikroskopisch mithilfe des Zeiss ZEN pro 2012 Programm alle 6 Stunden für insgesamt 120h ein Bild der zellfreien Flächen der Wells gemacht worden. Mithilfe des gleichen Programms erfolgte anschließend die Auswertung. Diese beinhaltet die zellfreie Fläche auszumessen.

### 2.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mithilfe von Microsoft Excel 2019. Es erfolgte eine grafische Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  die Standardabweichung. Die Grafen wurden dann mittels GraphPad Prism 5 verfasst. Als statistischer Verfahren wurde ein gepaarter t-Test durchgeführt. Die statistische Signifikanz ließ sich hierbei mit  $p < 0,05$  (\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*) und  $p \leq 0,001$  (\*\*\*) definieren.



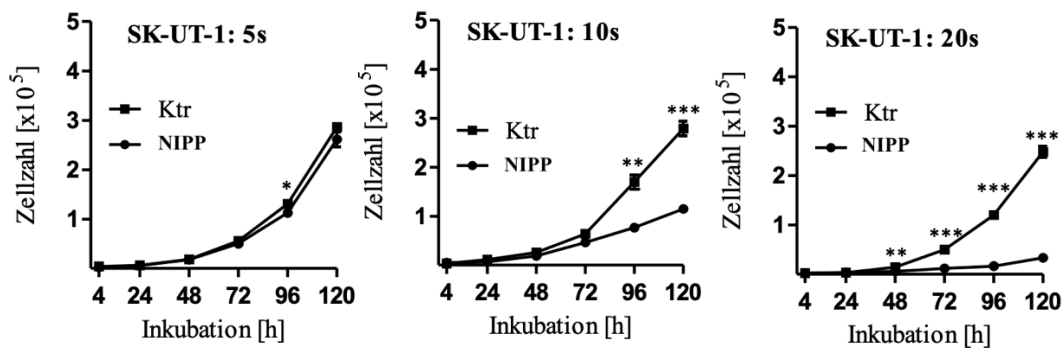
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Direkte Behandlung mit NIPP

Es wurde drei Entitäten gynäkologischer Tumoren mit raumtemperiertem nicht-invasivem physikalischem Plasma (NIPP) behandelt: uLMS (Zelllinie: SK-UT-1), EC (MFE-296) und MC (Hormonsensitive Zelllinie MCF-7 und eine nicht-hormonsensitive MDA-MB-231. Hierfür sind die Zellen in 24er Wellplatten ausgesät und direkt mit NIPP behandelt worden. Als Kontrolle wurde eine Behandlung mit dem Trägergas Argon durchgeführt. Die Behandlungsdauer wurde jeder Zelllinie individuell angepasst. Mittels CASY TT System ist über 120h die Zellzahl bestimmt worden, um eine Aussage über das Zellwachstum treffen zu können. Der Einfluss von NIPP auf die Entitäten ist von Zelllinie zu Zelllinie unterschiedlich. Bei allen vier Zelllinien gab es eine antiproliferative Wirkung zu sehen.

##### **uLMS**

Im Rahmen dieser Behandlung wurde die Leiomyosarkom Zelllinie SK-UT-1 für 5, 10 und 20s behandelt. Nach 5s zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Die behandelten Zellen wurden auf nur 95% reduziert. Erst ab einer Behandlungszeit von 10s konnte man eine Abnahme der Zellzahl auf 41% ( $p \leq 0,0001$ ) im Vergleich zu kontrollbehandelten Zellen feststellen. Die Behandlung von 20s zeigte ebenfalls statistisch signifikante Ergebnisse. Hier sank die Zellzahl nach NIPP-Behandlung auf 14,5% ( $p \leq 0,0001$ ) der Kontrollansätze. Damit war zu beobachten, dass die direkte Behandlung mit NIPP eine wachstumshemmende Eigenschaft auf die Leiomyosarkomzellen hatte.

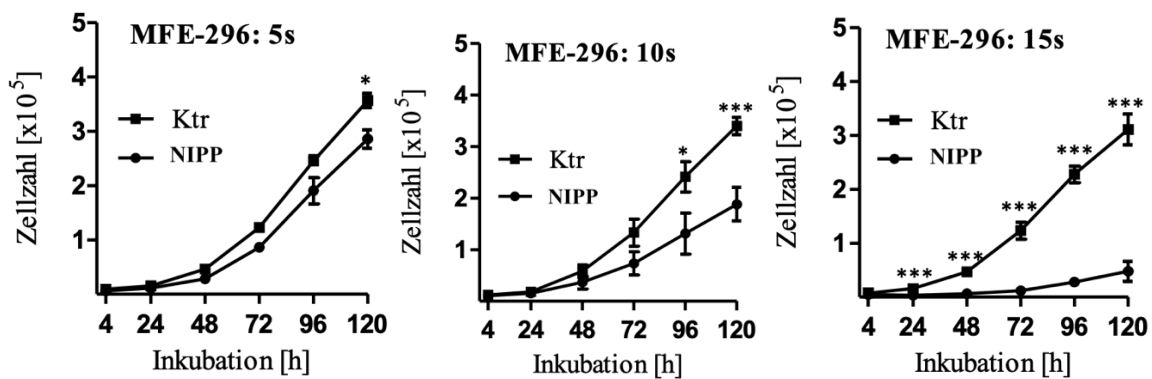


**Abb. 1:** Einfluss von NIPP auf die Zellen des Leiomyosarkoms am Beispiel der SK-UT-1 Zelllinie

Die Zellen wurden für jeweils 5, 10 und 20 Sekunden behandelt. Die Kontrolle wurde mit dem Trägergas Argon behandelt. Es zeigte sich eine antiproliferative Wirkung, in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer. Es erfolgten mindestens vier unabhängige Versuche. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der absoluten Zellzahlen angegeben. Für den statistischen Vergleich wurde ein gepaarter t-Test verwendet; p-Werte von  $< 0,05$  (\*),  $\leq 0,01$  (\*\*), und  $\leq 0,001$  (\*\*\*) wurden als statistisch signifikant interpretiert.

## EC

Die Zellen des Endometrium-CAs wurden ebenfalls für 5, 10 und 15s behandelt. Nach 5s Behandlung ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Lediglich die Messungen und 120h Inkubation unterschieden sich signifikant von den Kontrollen (88%,  $p = 0,009$ ). Allerdings nach 10s auf 57% ( $p = 0,0001$ ) und nach 15s drastisch auf nur noch 28,5% ( $p \leq 0,0001$ ). Damit hatte sich hier ebenfalls eine Hemmung des Zellwachstums gezeigt. Anhand dieser Zelllinie ist das EC, die Tumorentität, die man am kürzesten behandeln musste, um einen Effekt von NIPP zu erzeugen.

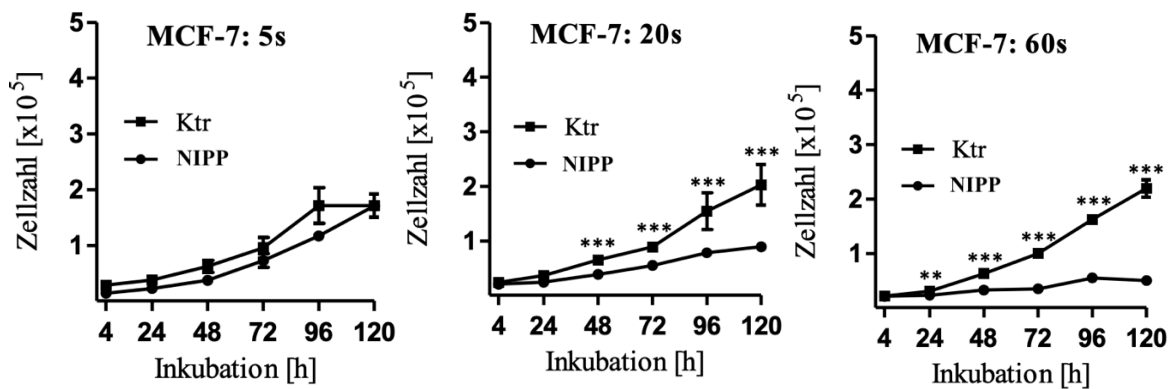


**Abb. 2:** Einfluss von NIPP auf die Zellen des Endometrium-CAs am Beispiel der MFE-296 Zelllinie

Die Zellen wurden für jeweils 5, 10 und 15 Sekunden behandelt. Die Kontrolle wurde mit dem Trägergas Argon behandelt. Es zeigte sich ebenfalls eine antiproliferative Wirkung, in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer. Es erfolgten mindestens fünf unabhängige Versuche. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der absoluten Zellzahlen angegeben. Für den statistischen Vergleich wurde ein gepaarter t-Test verwendet; p-Werte von  $< 0,05$  (\*),  $\leq 0,01$  (\*\*), und  $\leq 0,001$  (\*\*\*) wurden als statistisch signifikant interpretiert.

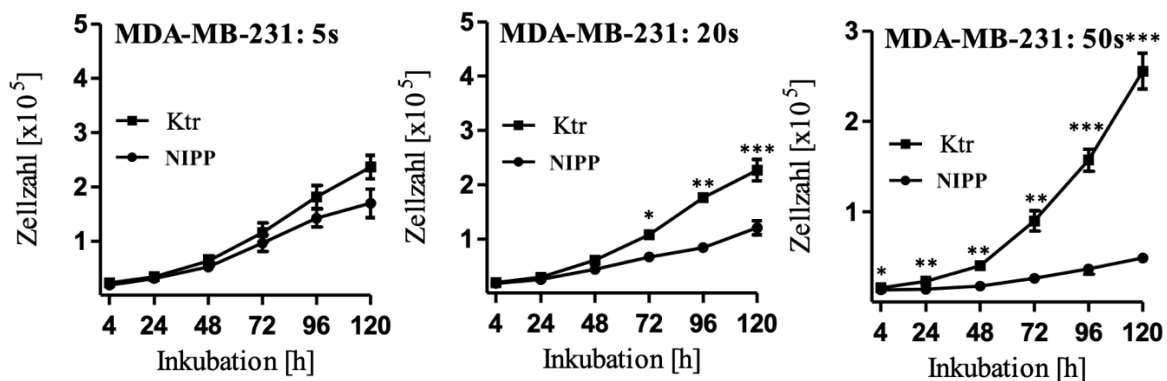
## MC

Anders als bei der vorherigen Zelllinien, mussten die Zellen des MC relativ lange behandelt werden. Obwohl die Behandlungsdauer von 5s die Zellzahl schon auf 72% (MCF-7) und 82% (MDA-MB-231) sank, musste eine mittlere Behandlungsdauer von 20s für beide Zelllinien ausgewählt werden, um jeweils auf 40% ( $p = 0,0002$ , MCF-7) und 61% ( $p = 0,001$ , MDA-MB-231) zu kommen. Die MDA-MB-231 Zelllinie wurde dann für 50 Sekunden behandelt, um nur noch 20,5% ( $p = 0,0001$ ) der Kontrollansätze zu erreichen. Die MCF-7 Zelllinie musste allerdings für 60 Sekunden behandelt werden, um ein statistisch signifikantes Ergebnis von einer Zellzahlreduktion auf 24% ( $p \leq 0,0001$ ) zu erzielen. Damit war festzustellen, dass die hormonsensitiven Zellen die längste Behandlungsdauer brauchen, um einen Einfluss von NIPP zu beobachten.



**Abb. 3:** Einfluss von NIPP auf die Zellen des Mamma-CAs am Beispiel der hormonsensitiven MCF-7 Zelllinie

Die Zellen wurden für jeweils 5, 20 und 60 Sekunden behandelt. Die Kontrolle wurde mit dem Trägergas Argon behandelt. Es zeigte sich eine antiproliferative Wirkung, in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer. Es erfolgten mindestens vier unabhängige Versuche. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der absoluten Zellzahlen angegeben. Für den statistischen Vergleich wurde ein gepaarter t-Test verwendet; p-Werte von  $< 0,05$  (\*),  $\leq 0,01$  (\*\*), und  $\leq 0,001$  (\*\*\*) wurden als statistisch signifikant interpretiert.



**Abb. 4:** Einfluss von NIPP auf die Zellen des Mamma-CAs am Beispiel der MDA-MB-231 Zelllinie

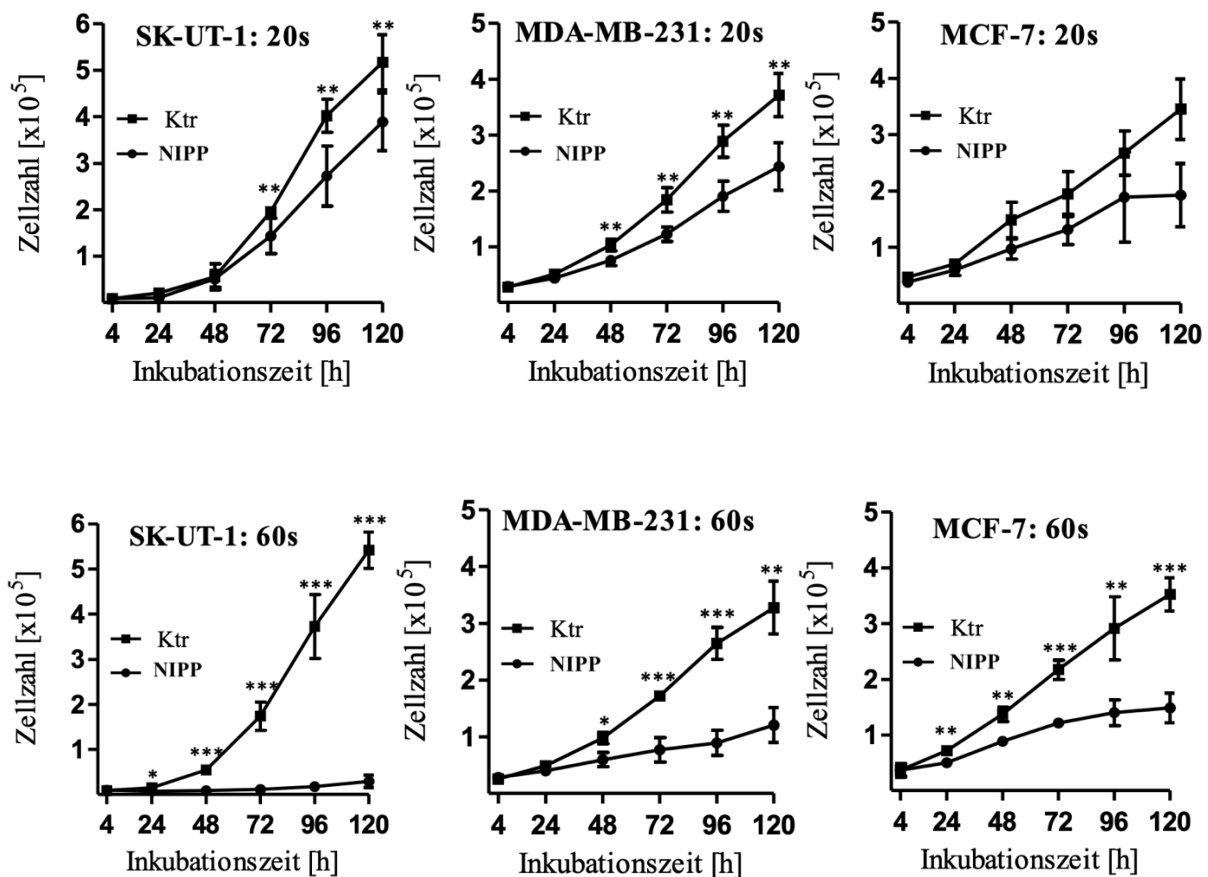
Die Zellen wurden für jeweils 5, 20 und 50 Sekunden behandelt. Die Kontrolle wurde mit dem Trägergas Argon behandelt. Es zeigte sich eine antiproliferative Wirkung, in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer. Es erfolgten mindestens vier unabhängige Versuche. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der absoluten Zellzahlen angegeben. Für den statistischen Vergleich wurde ein gepaarter t-Test verwendet; p-Werte von  $< 0,05$  (\*),  $\leq 0,01$  (\*\*), und  $\leq 0,001$  (\*\*\*) wurden als statistisch signifikant interpretiert.

### 3.2 Die indirekte NIPP-Behandlung

Da NIPP redox-aktive Teilchen erzeugt, ist es denkbar, dass die zytotoxischen Eigenschaften einer NIPP-Behandlung über das Zellkulturmedium übertragen wird, ohne dass die Zellen direkt mit NIPP in Kontakt kommen. Dafür wurden die Zellen 24h inkubiert, der Zellkulturüberstand abgenommen und durch frisches, mit NIPP behandeltes Medium ersetzt. Das Medium in diesem Versuch wurde für jeweils 20 und 60 Sekunden behandelt. Es hat sich bei allen drei Tumorentitäten eine Hemmung des Zellwachstums gezeigt.

#### **LMS-und MC-Medium: DMEM/F12 + 10%FBS**

Sowohl für uLMS- als auch für MC-Zellen wurde das gleiche Zellkultur-Medium eingesetzt. Nach dem Mediumwechsel ist das Wachstum der drei Zelllinien über 120 Stunden beobachtet worden. Bei allen drei konnte man feststellen, dass es zu einer Hemmung des Zellwachstums gekommen ist. Für SK-UT-1 und MDA-MB-231 hat man sowohl für die 20 als auch die 60s Behandlung signifikante Werte erzielen können. Die hormonsensitive Zelllinie des MC, MCF-7 hat allerdings signifikante Ergebnisse nur bei der 60s Behandlung zeigen können.

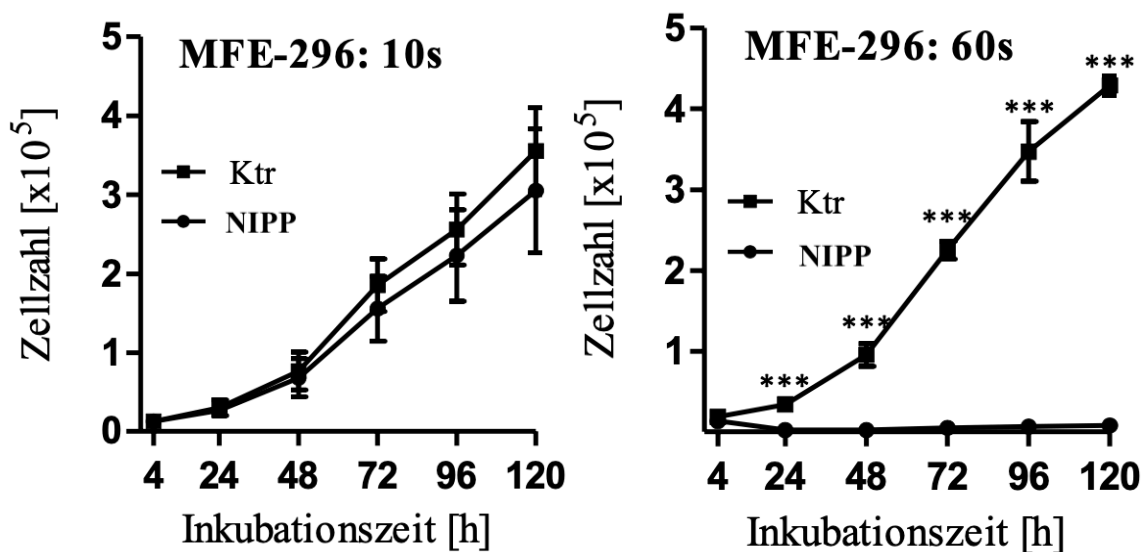


**Abb. 5:** Mediumbehandlung der uLMS- und MC-Zelllinien für 20 Sekunden (obere Reihe) und 60 Sekunden (untere Reihe)

Die Kontrolle wurde mit dem Trägergas Argon behandelt. Es erfolgten mindestens drei unabhängige Versuche. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der absoluten Zellzahlen angegeben. Für den statistischen Vergleich wurde ein gepaarter t-Test verwendet; p-Werte von  $< 0,05$  (\*),  $\leq 0,01$  (\*\*), und  $\leq 0,001$  (\*\*\*) wurden als statistisch signifikant interpretiert.

#### **EC-Medium: RPMI1640 + MEM (Earle's) + 20%FBS + 1x ITS-G**

Die direkte Wirkung von NIPP konnte man am deutlichsten bei MFE-296 Zellen sehen. Daher wurde bei der Mediumbehandlung nur für 10s behandelt und später 60s. Eine geringe antiproliferative Wirkung deutete sich nach 10s der Behandlung an, war allerdings statistisch nicht signifikant. Die Behandlung für 60s hingegen konnte signifikante Ergebnisse zeigen. Es wurde hier ebenfalls beobachtet, dass NIPP einen hemmenden Einfluss auf das Zellwachstum der Tumorzellen hatte.



**Abb. 6:** Mediumbehandlung der EC-Zelllinie MFE-296 für jeweils 10 und 60 Sekunden

Die Kontrolle wurde mit dem Trägergas Argon behandelt. Es erfolgten mindestens drei unabhängige Versuche. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der absoluten Zellzahlen angegeben. Für den statistischen Vergleich wurde ein gepaarter t-Test verwendet; p-Werte von  $< 0,05$  (\*),  $\leq 0,01$  (\*\*), und  $\leq 0,001$  (\*\*\*) wurden als statistisch signifikant interpretiert.

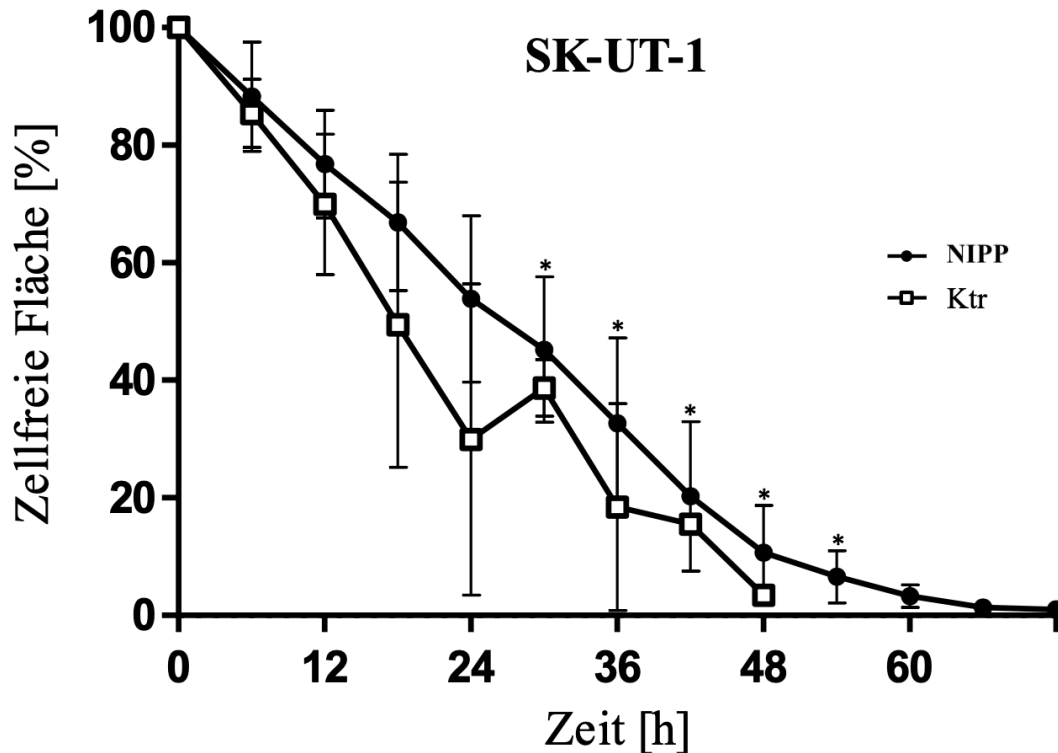
### 3.3 Migration Assay

Dass die drei untersuchten Tumorentitäten die Eigenschaften des schnellen Wachstums und der Metastasierung besitzen, wurde bereits gezeigt (Gunjal Garg et al., 2011). Es wurde untersucht, ob die mit NIPP behandelten Zellen, in der Lage waren, sich wie die Kontrollansätze zu bewegen. Es wurde gemessen, wie lange die Tumorzellen benötigen, eine zellfreie Fläche zu besiedeln. Dafür wurden die Zellen direkt mit NIPP, die Kontrolle mit Argon, behandelt und erst nach 24-48h Inkubationszeit wurde eine zellfreie Fläche innerhalb des Wells mittels einer Pipettenspitze verursacht. Danach wurde die Wellplatte unter einem Mikroskop gestellt, das alle 6h ein Bild dieser Fläche gemacht hatte, über insgesamt 96 h. Bei allen drei Entitäten konnte eine verringerte Motilität der mit NIPP behandelten Tumorzellen beobachtet werden.

#### uLMS:

Das LMS gilt als schnell wachsender Tumor mit hohen Metastasierungsraten (Gunjal Garg et al., 2011). Dieses war im gesamten Verlauf der Experimente in der Kontrolle

sichtbar. Auch hier im Migration Assay war es nicht überraschend, dass die mit Argon behandelten Zellen die zellfreie Fläche rasch zudecken konnten. Um 54,8% der Fläche zu besiedeln, hatten die mit NIPP behandelten Zellen 30 Stunden gebraucht, währenddessen hatte die Kontrolle 80,6% ( $p = 0,04$ ) dieser Fläche bedecken können.



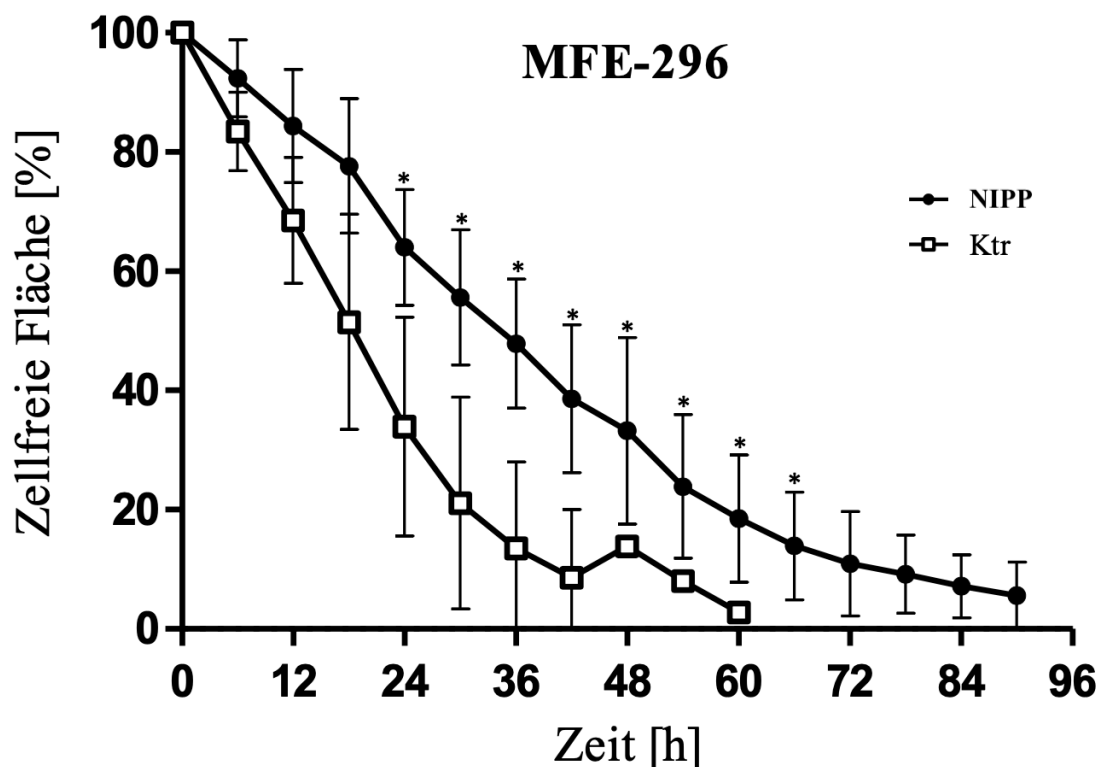
**Abb. 7:** Einfluss von NIPP auf die Zellmotilität des uLMS am Beispiel der SK-UT-1 Zelllinie

Die Kontrolle wurde mit dem Trägergas Argon behandelt. Es erfolgten mindestens sechs unabhängige Versuche. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der absoluten Zellzahlen angegeben. Für den statistischen Vergleich wurde ein gepaarter t-Test verwendet; p-Werte von  $< 0,05$  (\*),  $\leq 0,01$  (\*\*), und  $\leq 0,001$  (\*\*\*) wurden als statistisch signifikant interpretiert.

#### EC:

Bei den Zellen des ECs konnte ebenfalls eine Einschränkung der Motilität nach Behandlung mit NIPP beobachtet werden. Nach nur 24h hatten die Kontrollzellen 63,5 % der Fläche zugedeckt und nach nur 60 Stunden 98,6% erreicht. Im Gegensatz dazu, hatten die mit NIPP behandelten Zellen nach 24 Stunden nur 36,0% ( $p = 0,03$ ) und erst nach 60 Stunden 81,5% ( $p = 0,039$ ) dieser Fläche besiedeln können.



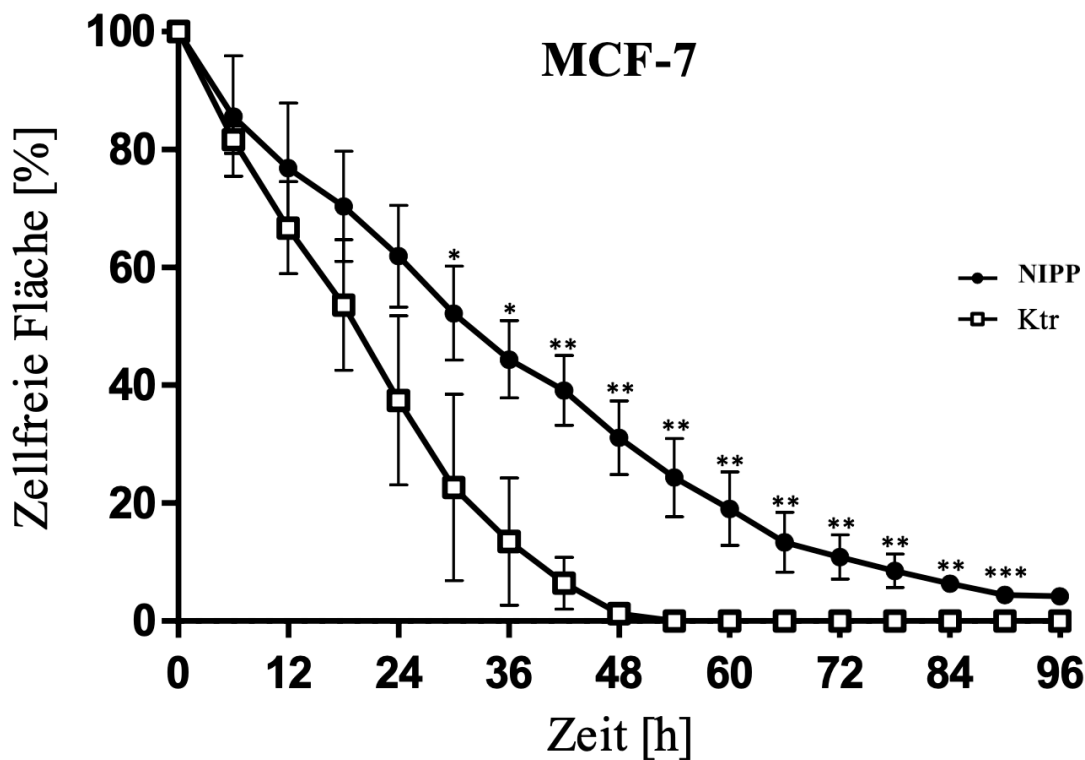


**Abb. 8:** Einfluss von NIPP auf die Zellmotilität des EC am Beispiel der MFE-296 Zelllinie

Die Kontrolle wurde mit dem Trägergas Argon behandelt. Es erfolgten mindestens fünf unabhängige Versuche. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der absoluten Zellzahlen angegeben. Für den statistischen Vergleich wurde ein gepaarter t-Test verwendet; p-Werte von  $< 0,05$  (\*),  $\leq 0,01$  (\*\*), und  $\leq 0,001$  (\*\*\*) wurden als statistisch signifikant interpretiert.

#### MC: MCF-7

Die Beweglichkeit der hormonsensitiven Zellen des MC konnte auch nach NIPP Behandlung verlangsamt werden. Nach 30h haben es die mit NIPP behandelten Zellen geschafft, ungefähr die Hälfte des zellfreien Areales zuzudecken (48,8%). In der Zeit hatte die Kontrolle 77,3% ( $p = 0,04$ ) dieser Fläche besiedeln können. Nach nur 48h war die zellfreie Fläche zu 98,7% durch die Kontrollansätze zu. Durch die mit Plasma behandelten Zellen war noch eine zellfreie Lücke von 31,1% ( $p = 0,001$ ) noch vorhanden.

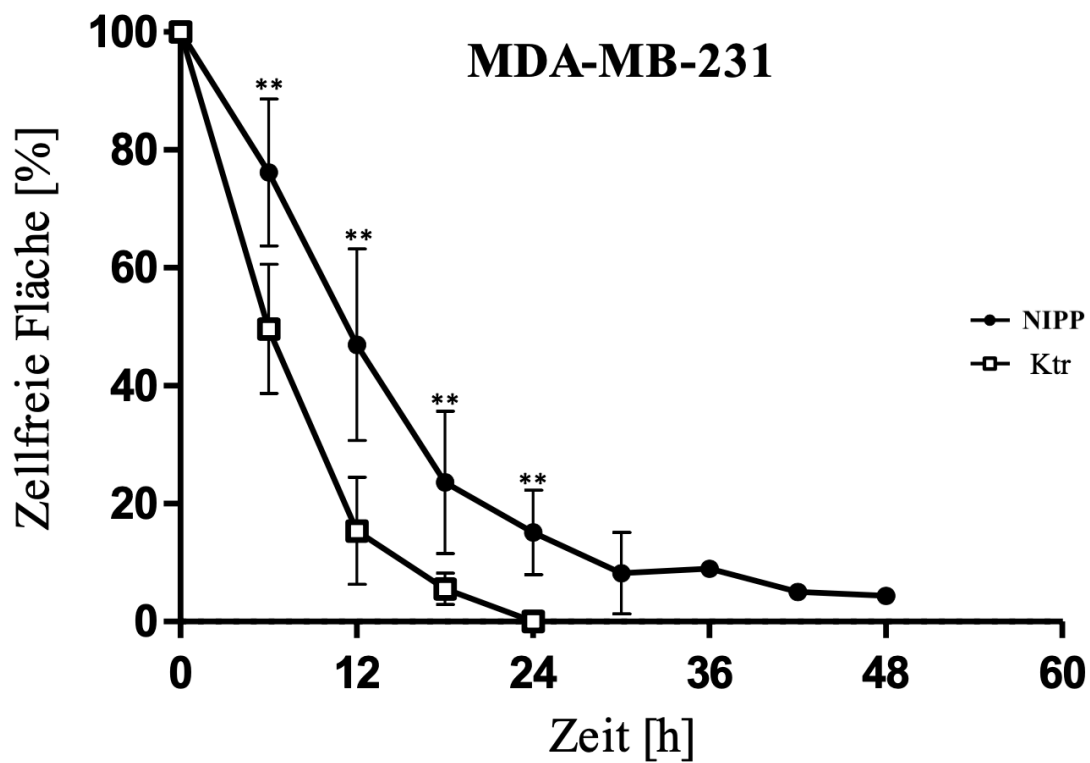


**Abb. 9:** Einfluss von NIPP auf die Zellmotilität des MC am Beispiel der hormonsensitiven Zelllinie MCF-7

Die Kontrolle wurde mit dem Trägergas Argon behandelt. Es erfolgten mindestens vier unabhängige Versuche. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der absoluten Zellzahlen angegeben. Für den statistischen Vergleich wurde ein gepaarter t-Test verwendet; p-Werte von  $< 0,05$  (\*),  $\leq 0,01$  (\*\*), und  $\leq 0,001$  (\*\*\*) wurden als statistisch signifikant interpretiert.

### MDA-MB-231

Die zweite Zelllinie des MC wurde auch durch NIPP Behandlung in ihrer Motilität eingeschränkt. Nach nur 6h hatten die Zellen der Kontrolle 51,0% der vorher zellfreien Fläche zugedeckt, währenddessen die mit NIPP behandelten Zellen nur 24,0% ( $p = 0,004$ ) zudecken konnten. 97,3% der Fläche war nach nur 18h durch die Kontrollansätze zu. Innerhalb dieser Zeit haben die Zellen, die eine Plasma Behandlung bekommen haben, 77,0% ( $p = 0,003$ ) des Areales besiedeln können.



**Abb. 10:** Einfluss von NIPP auf die Zellmotilität des MC am Beispiel der Zelllinie MDA-MB-231

Die Kontrolle wurde mit dem Trägergas Argon behandelt. Es erfolgten mindestens fünf unabhängige Versuche. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der absoluten Zellzahlen angegeben. Für den statistischen Vergleich wurde ein gepaarter t-Test verwendet; p-Werte von  $< 0,05$  (\*),  $\leq 0,01$  (\*\*), und  $\leq 0,001$  (\*\*\*) wurden als statistisch signifikant interpretiert.

## 4. Diskussion

NIPP hat seit 1970 eine Anwendung in der Medizin gefunden (Vaquero, 2020). Sei es zur aseptischen Wundheilung in der Dermatologie, zur Dekontamination in der Hygiene oder zur Heilung komplizierter Kraniofaszialer Traumata in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie (Winter et al., 2020; Arndt et al., 2013). Aktuell wird der Einsatz von NIPP in der Onkologie angestrebt (Koensgen et al., 2017). Bei unterschiedlichen Tumorentitäten - neurologischen, urologischen und orthopädischen - hat NIPP bereits eine antiproliferative Wirkung gezeigt (Conway et al., 2019; Gelbrich et al., 2019; Gümbel et al., 2017). Auch im Bereich der Gynäkologie fand NIPP einen Einsatz gegen OC-Zellen (Koensgen et al., 2017). Diese Arbeit hat sich mit drei weiteren gynäkologischen Tumorentitäten; LMS, MC und EC; auseinandergesetzt.

Das Wirkprinzip von NIPP wird seit Jahren erforscht. Es hat sich gezeigt, dass NIPP für die Erhöhung der intrazellulären Konzentration von reaktiven Sauerstoffspezies, ROS, sorgt (Ishaq et al., 2014). Dadurch steigt der oxidative Stress innerhalb der Zelle und der Zelltod wird induziert (Ishaq et al., 2014). Interessanterweise kann man den NIPP-Effekt so modulieren, dass dieser antiproliferative Effekt nur die Tumorzellen betrifft und nicht das umliegende gesunde Gewebe. In vitro Experimente haben gezeigt, dass im Gegensatz zu gesunden Zellen die Tumorzellen nur schwer die ROS/RNS entgiften können (Kuhn et al., 2021). Während gesunde Körperzellen enzymatische (SOD, CAT, GTH-Px) und nicht enzymatische Mechanismen (Bilirubin, beta-Karoten usw) besitzen, um sich von ROS zu befreien (Liguori und Russo, 2018), scheint dies bei Tumorzellen nicht ausreichend zu sein.

In der vorliegenden Arbeit wurden Zellen des LMS, der EC und des MC sowohl direkt als auch indirekt mit NIPP behandelt. Zusätzlich wurde ein Migrationsassay durchgeführt.

Mit aufsteigender Behandlungsdauer nimmt die antiproliferative Wirkung zu. Das heißt, eine kurze Behandlungsdauer sorgt für keine bis sehr geringe Wirkung, eine längere hingegen ist in der Lage die Zellen zu schädigen (Wang et al., 2013). Die Anpassung der Behandlungsdauer ist hierbei entscheidend und entspricht der Dosisanpassung eines Chemotherapeutikums. Allerdings reicht es nicht aus, eine Behandlungszeit nach Entität zu bestimmen, sondern nach Zelllinien. Wie in dieser Arbeit zu sehen ist, war bei den beiden unterschiedliche Zelllinien des MCs unterschiedliche Behandlungsdauer nötig.

Dieser Effekt lässt sich nicht nur während der NIPP Behandlung beobachten, sondern auch bei der Chemotherapie (Jokar et al., 2019). Im Vergleich zu den anderen Entitäten, musste das MC am längsten behandelt werden. Diese könnte drauf beruhen, dass Zellen des MCs; insbesondere die Zelllinie MDA-MB-231; eine der aggressivsten CA darstellt (Kumari et al., 2019). Es müssen daher, vermutlich während der Biopsien auch die histologischen Eigenschaften individuell bestimmt werden, um eine entsprechend gezielte Therapie zu erreichen.

Der Einsatz der direkten Behandlung mit NIPP in der Klinik kann nur während operativer Maßnahmen erfolgen. Es gibt sowohl die Möglichkeit der intraoperativen als auch der endoskopischen Verfahren. Eine Studie hat ein kleines Plasma erzeugendes Gerät benutzt, um Glioblastome bei Mäusen endoskopisch zu behandeln (Chen et al., 2019). Das Gerät an sich konnte ohne Komplikationen angewendet werden. Problematisch wird es, wenn der Tumor in tiefsitzenden Strukturen liegt oder viel zu groß ist. Außerdem ist es auch interessant zu untersuchen, wie viele operative Eingriffe durchgeführt werden müssen um eine 100% Eradikation des Tumors zu erreichen. Die In-Vivo Behandlung der Glioblastome war nur einmalig für insgesamt 15s. Die Zellen haben zwar eine antiproliferative Wirkung gezeigt, die Tumorgroße hat abgenommen, der Tumor war aber noch vorhanden und würde vermutlich weiterwachsen (Chen et al., 2019). Das zeigt, dass NIPP nicht alle Tumorschichten inaktiviert und daher kommt es zu keiner vollständigen Tumorentfernung. Theoretisch müssten mehrere Behandlungen über einen längeren Zeitraum erfolgen, um eine komplette Heilung zu erwarten. Da dies praktisch nicht durchführbar ist, könnte man sich die Effekte der indirekten Behandlung zunutze machen.

Eigene Daten haben auch bei der indirekten Behandlung gezeigt, dass nach zunehmender Behandlungsdauer eine stärkere antiproliferative Wirkung zu sehen war. Nach 20s konnte man bei den Zelllinien, die mit DMEM Medium kultiviert werden, eine leichte antiproliferative Wirkung sehen. Hier war ebenfalls ein Unterschied zwischen den beiden MC Zelllinien zu beobachten. Unabhängig von der Mediumzusammensetzung oder Zelllinie, hat es 60s gebraucht um eine starke Antiproliferation bei allen drei Entitäten zu sehen.

Die Wirksamkeit der indirekten Behandlung, auch Behandlung mit Plasma Activated Solutions/Media (PAS/PAM) genannt, wurde in einigen Anwendungsbereichen inklusive der onkologischen Forschung nachgewiesen (Kaushik et al., 2018). Das Wirkprinzip dieser Methode ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Eine Analyse mehrerer PAM Studien hat wichtige Beobachtungen erbracht: erstens, spielt die Menge an ROS, insbesondere  $H_2O_2$ , die entscheidende Rolle. Zweitens, greifen die ROS in mehreren intrazelluläre Signalwege ein, darunter Faktoren des Zellzyklus und der Zelldifferenzierung. Zusätzlich wurde eine Abnahme der mTOR Konzentration detektiert (Yan et al., 2017). Diese ist insbesondere in der gynäkologischen Onkologie relevant, da die Chemotherapie beim MC oft auf mTOR-Inhibitoren, wie Temsirolimus beruht (Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, 2021)).

Die Wirkung von PAM kann man unterschiedlich modulieren. Ein Review der bisherigen NIPP- Anwendungen in der Medizin hat gezeigt, dass man auf drei Faktoren achten sollte um die PAM-Wirkung zu steigern: erstens die Größe des Gefäßes (gleiches mit NIPP-behandeltem Volumen im 6er Well wirkt potenter als das im 24er Well), der Abstand zwischen dem NIPP-Gerät und Oberfläche des Mediums und zuletzt das zu behandelndem Volumen (Yan et al., 2017). Allerdings bleibt der wichtigste und entscheidende Faktor die Behandlungsdauer (Yan et al., 2017). Dieses konnte auch anhand dieser Arbeit belegt werden.

Eine einfache Erklärung dafür wäre, mit steigender Behandlungsdauer, würde die ROS-Konzentration zunehmen. Dieses erschwert den Tumorzellen die Entgiftung und führt daher schneller zum Zelltod.

Einen weiteren Vorteil bietet die indirekte Behandlung gegenüber der direkten durch die Möglichkeit der Konservierung von PAM. Eine Studie hat DMEM und PBS mit NIPP behandelt und das PAM bei unterschiedlichen Temperaturen für 7 Tage gelagert. Eine herabgesetzte Wirkung konnte man bei DMEM festgestellt werden. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass es nicht an der Temperatur, sondern an der Zusammensetzung von DMEM lag. Aminosäuren wie Methionin und Cystein sorgen dafür, dass konserviertes PAM nicht die volle Wirksamkeit entfalten kann, wie das nicht-

konservierte (Yan et al., 2017) Dieser Punkt ist von extremer Bedeutung für die klinische Anwendung.

Mit der antiproliferativen Wirkung von PAM, könnte man sich einen guten klinischen Ansatz vorstellen. Im Gegensatz zur direkten NIPP-Behandlung, wo ein invasiver OP-Eingriff Voraussetzung ist, wäre eine Behandlung mit PAM durch Infusionen oder Injektionen vorstellbar, mithilfe der Konservierungsmöglichkeit vermutlich auch als Fertig-Spritzen einsetzbar. Es bleibt trotzdem eine Herausforderung, da eine PAM-Injektion mittig in das Tumorgewebe erfolgen sollte bzw. einen flüssigen Raum darum schaffen muss. Man könnte sich hierfür zum Beispiel die physiologischen (Pleura, Perikard, Peritoneum) und pathologischen (Aszites) Flüssigkeitsansammlungen im Körper zunutze machen. Hierbei wären unterstützende bildgebende Verfahren sicherlich eine hilfreiche Ergänzung.

Nach Möglichkeiten der Anwendung ist die Suche nach dem Nebenwirkungsprofil ebenfalls sehr relevant. In-vitro Experimente haben gezeigt, dass im Vergleich zum gesunden Gewebe die antiproliferative Wirkung von NIPP hauptsächlich bei Tumorzellen zu beobachten war (Kumari et al., 2019). Im gesunden umliegenden Gewebe konnten keine Effekte nachgewiesen werden. Dennoch kann eine systemische Nebenwirkung nicht ausgeschlossen werden. Vorstellbar wäre eine starke Immunantwort gegen PAM. Aktuell gibt es keine Studien, die solche Nebenwirkungen untersucht haben.

Die Klassifikation der Tumorstadien erfolgt prinzipiell durch die internationale TNM Klassifikation. Die T1-3 Klassifikation bezeichnet ein Tumor, der meist auf das befallene Organ begrenzt ist, T4 hingegen beschreibt ein Überschreiten der Organgrenze. N beschreibt die Anzahl an befallenen Lymphknoten und M beschreibt letztlich die An- oder Abwesenheit von Metastasen (M0 oder M1) (Krebsinformationsdienst 2023). 2019-2020 befanden sich 40% der Frauen in T0-1, N0-1, M0 (UICC I) bei der Erstdiagnose des MCs, 51% in den Stadien T0-T4, N1-3, M0 (UICC II-III) und 9% in jedem T- und N-Stadium bei mindestens M1 (UICC IV) (RKI Brustdrüse, 2023). Das heißt bei über 50% der Frauen befinden sich bei der Erstdiagnose noch keine Metastasen. Dennoch ist das MC bekannt für zahlreiche Metastasen in sehr kurzer Zeit, was meistens entscheidend ist für eine

schlechte Prognose. Bei den Entitäten EC und LMS ist die Metastasierung ebenfalls ein prognostisch schlechter Faktor. In dieser Arbeit hat die Behandlung mit NIPP nicht nur eine antiproliferative Wirkung gezeigt, sondern auch eine Hemmung der Zellmotilität. Im Gegensatz zu den meisten Chemotherapieverfahren, ist die NIPP-Behandlung in der Lage die Zellmotilität und Metastasierungsrate zu hemmen. Dieses wäre ein Durchbruch in der Onkologie. Durch Chemotherapie kann man die Tumorgöße verkleinern und damit das Metastasierungsrisiko mindern aber nicht ausschließen. Eine Studie hat gezeigt, dass NIPP metastasierungsfördernde Gene im MC, darunter VEGF, herunterreguliert (Zhu et al., 2016). Dies führt dazu, dass die Tumorzellen nicht mehr in der Lage sind, sich frei zu bewegen. Dass NIPP zur Hemmung der Zellmotilität führt, wurde in dieser Arbeit ebenfalls gezeigt.

Natürlich spielten die Unterschiede zwischen den Zelllinien eine signifikante Rolle bei der Beurteilung der Zellmotilität und der Hemmung derselben. Die Tumorentität, die am schnellsten die zellfreie Fläche ohne Behandlung bedeckte, war beim MC die Zelllinie MDA-MB-231. Diese Zellen migrierten so schnell, dass die Unterschiede nach 6h nicht mehr analysiert werden konnten. Man musste diese in einem neuen Medium, mit der niedrigsten FBS Konzentration von 2%, kultivieren, um überhaupt ein Ergebnis zu sehen. Das zeigt die hohe Motilität und größte Fähigkeit dieser Tumorzellen zu translozieren und sich auszubreiten. Es erklärt außerdem, warum MDA-MB-231 Zellen zu den aggressivsten Tumoren des MCs gehört. Die MCF-7 Zelllinie hingegen bräuchte ohne NIPP-Behandlung viel mehr Zeit um diese Fläche zuzudecken. Andere Unterschiede hat eine Studie gezeigt, indem man beide Zelllinien mit unterschiedlichen Chemotherapeutika, darunter Epirubicin, Cyclophosphamid, Docetaxel und 5-Fluoracil, behandelt hat und anschließend die Autophagozytose beurteilt hat (Garbar et al., 2017). Es zeigte sich, dass bei der Zelllinie MDA-MB-231 keine Induktion der Autophagozytose erzielt werden konnte. Im Gegensatz dazu war die Induktion in der MCF-7 Zelllinie erfolgreich. Man konnte daraus schlussfolgern, dass tripple negative MDA-MB-231 Zellen (Östrogen-, Progesteron- & HER2-Rezeptornegativ), eher resistent gegenüber einer Routinetherapie ist. MCF-7 besitzt hingegen sowohl Östrogen- als auch Progesteron-Rezeptoren, was die Zelllinie vulnerabler machen könnte. Die höhere Aggressivität der MDA-MB-231 Zellen verglichen mit MCF-7 Zellen konnte in dieser Arbeit ebenso gezeigt werden.



Zu den hochaggressiven Tumoren der Frau zählt ebenfalls das uLMS. Das uLMS verursacht in den Frühstadien keine Symptome und wird deswegen entweder als Zufallsbefund bei Hysterektomien oder erst in fortgeschrittenen Stadien aufgrund einer Begleitsymptomatik entdeckt (Leitlinienprogramm S2k Uterine Sarkome, 2024). Eine typische Lokalisation der Metastasen des uLMS ist die Lunge (Leitlinienprogramm S2k Uterine Sarkome, 2024). Im Rahmen der Dyspnoe-Symptomatik wird bei den meisten Frauen die Diagnose des uLMS gestellt. Die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate liegt zwischen 40 und 50% (Leitlinienprogramm S2k Uterine Sarkome, 2024). Aufgrund der Fortschreitung des uLMS bei der Erstdiagnose, sollte die möglichst effektive Therapie benutzt werden, um weitere Metastasen zu verhindern. Diese Arbeit konnte hoch signifikante Ergebnisse bezüglich der Inhibition der Motilität des uLMS zeigen. Der kurative Ansatz liegt vermutlich zwar noch in weiter Ferne aber eine drastische Verbesserung der Lebensqualität der Betroffenen gehört zu den grundlegenden Zielen in der Medizin. Die NIPP-Behandlung konnte dieses Ziel ermöglichen.

Die Modulierung der Zellmotilität konnte auch beim EC nachgewiesen werden. Das EC zeigte 2019-2020 eine 5-Jahres-Überlebensrate von 92% für Frauen in Stadium T1N0M0 (UICC I) (RKI Gebärmutterkrebs, 2023). Bei der Erstdiagnose befinden sich 68% der Frauen in dieser Phase und können also von einer kurativen Therapie profitieren. Allerdings befinden sich 14% der Frauen bei der Erstdiagnose im Stadium UICC III und 11% im UICC IV (RKI Gebärmutterkrebs, 2023). In diesen letzteren Stadien ist sowohl mit Lymphknoteninvasion als auch Metastasen zu rechnen. Die Motilität der EC-Tumorzellen könnte mit NIPP-Behandlung eingeschränkt werden.

Insgesamt erscheint eine klinische NIPP Anwendung sehr vielversprechend. Während die direkte Behandlungsmethode in der Regel einen operativen Eingriff erfordert, stellt die indirekte Methode eine nicht-invasive Therapieoption dar. Mithilfe von unterstützenden bildgebenden Verfahren würde sich die behandelte Spüllösung ohne Schwierigkeiten in das Tumorgewebe injizieren lassen. Die Risiken, die bei beiden Applikationsformen auftreten könnten, würden die einer konventionellen OP/ Bildgebungsgestützten Behandlung nicht übersteigen.

Im Rahmen jeder zytostatischen Behandlung, darf man die möglichen Nebenwirkungen der Therapie natürlich nicht ignorieren. Einen Vorteil der NIPP Therapie würde darin bestehen, dass diese keine systemische Nebenwirkungen erzeugen würde. Dies würde einen Durchbruch in der onkologischen Therapie darstellen, da die meisten Chemotherapeutika aufgrund ihrer hoch toxischen Nebenwirkungen nicht immer vertragen werden (Naito, Y. et al., 2020).

Die NIPP-Therapie ist zudem hochindividuell. Vor Behandlungsbeginn müssten jedoch Intensität und Dauer der NIPP Exposition festgelegt werden, was bisher die größte Herausforderung der klinischen NIPP Anwendung darstellt. Diese ließen sich jedoch möglicherweise, nach histopathologischer Untersuchung einer Tumorbiopsie, bestimmen.

Im Zusammenschau der Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich viele klinische Anwendungsmöglichkeiten feststellen. Trotz signifikanter Ergebnisse der direkten NIPP-Behandlung gestaltet sich die klinische Anwendbarkeit dieser Methode, aufgrund von ausschließlich isolierter Anwendungsmöglichkeit im operativen Bereich, wenig gut vorstellbar. Die indirekte NIPP-behandlung, mit den sogenannten Treated Liquids, zeigt allerdings ein vielversprechendes und breit aufgefächertes Anwendungsgebiet. Es kommen sowohl systemischen Therapien i.S. intravenösen Therapien als auch lokale Anwendungen, die auch bildmorphologisch gesteuert sein könnten in Frage. Darüber hinaus ist eine Kombinationstherapie, chirurgisch als auch strahlentherapeutisch oder medikamentös (Zytostatika), ebenfalls sehr gut vorstellbar.

## 5. Zusammenfassung

Neben dem Ovarialkarzinom sind das Mammakarzinom, das Endometriumkarzinom und das uterine Leiomyosarkom die aggressivsten gynäkologischen Tumore. Der antiproliferative Effekt der NIPP-Behandlung auf die aggressivste Zelllinien des Ovarialkarzinom ist bereits charakterisiert worden (Koensgen et al., 2017). In der vorliegenden Arbeit, wurde untersucht, ob die NIPP-Behandlung einen ähnlichen Einfluss auf die anderen drei Tumorentitäten erzielen könnte.

Sowohl das MC, EC und uLMS zeigten ein sehr gutes Ansprechen auf die NIPP-Behandlung. Einige Zellen brauchten eine längere Behandlungsdauer als andere. Sowohl die direkte als auch die indirekte NIPP-Behandlung zeigten vielversprechende Ergebnisse. Die „Dosierung“ sollte dann im späteren Verlauf genauer bestimmt werden, um die Balance zwischen der antiproliferativen Wirkung auf Tumorzellen und keine großen toxischen Nebenwirkungen zu finden.

Die direkte NIPP-Behandlung führte bei allen vier Zelllinien zur Reduktion des Wachstums und zur Antiproliferation noch lebender Zellen. Die indirekte NIPP-Behandlung konnte ebenfalls bei allen vier Zelllinien eine antiproliferative Wirkung erzielen. Darüber hinaus konnte die NIPP-Behandlung eine Einschränkung der Motilität aller vier Zelllinien im Migrationassay zeigen. Dies ist ausschlaggebend, da die NIPP-Behandlung die Metastasierung verzögern könnte. Viele Patientinnen sind, aufgrund der Metastasen, der palliativen Therapie ausgeliefert. Die NIPP-Behandlung könnte auch supportiv diese Zustände verzögern und in Kombination mit anderen Therapien eine kurative Aussicht beibehalten.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass NIPP auf drei der aggressivsten Tumorentitäten sowohl in einer direkten als auch indirekten Behandlung antiproliferative und anti-metastatische Wirkung hat. Die Behandlung führte zur Inaktivierung der Tumorzellen, unabhängig von deren Rezeptorzusammensetzung (ER-Status bei MCF-7 und MDA-MB-231), was meistens die Herausforderung der Chemotherapie darstellt. Diese Behandlung ist auf zellulärer Ebene sehr vielversprechend.

## 6. Abbildungsverzeichnis

|                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Abb. 1:</b> Einfluss von NIPP auf die Zellen des Leiomyosarkoms am Beispiel der SK-UT-1 Zelllinie                     | 26 |
| <b>Abb. 2:</b> Einfluss von NIPP auf die Zellen des Endometrium-CAs am Beispiel der MFE-296 Zelllinie                    | 27 |
| <b>Abb. 3:</b> Einfluss von NIPP auf die Zellen des Mamma-CAs am Beispiel der hormonsensitiven MCF-7 Zelllinie           | 28 |
| <b>Abb. 4:</b> Einfluss von NIPP auf die Zellen des Mamma-CAs am Beispiel der MDA-MB-231 Zelllinie                       | 28 |
| <b>Abb. 5:</b> Mediumbehandlung der uLMS- und MC-Zelllinien für 20 Sekunden (obere Reihe) und 60 Sekunden (untere Reihe) | 30 |
| <b>Abb. 6:</b> Mediumbehandlung der EC-Zelllinie MFE-296 für jeweils 10 und 60 Sekunden                                  | 31 |
| <b>Abb. 7:</b> Einfluss von NIPP auf die Zellmotilität des uLMS am Beispiel der SK-UT-1 Zelllinie                        | 32 |
| <b>Abb. 8:</b> Einfluss von NIPP auf die Zellmotilität des EC am Beispiel der MFE-296 Zelllinie                          | 33 |
| <b>Abb. 9:</b> Einfluss von NIPP auf die Zellmotilität des MC am Beispiel der hormonsensitiven Zelllinie MCF-7           | 34 |
| <b>Abb. 10:</b> Einfluss von NIPP auf die Zellmotilität des MC am Beispiel der Zelllinie MDA-MB-231                      | 35 |

## 7. Tabellenverzeichnis

|                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tab. 1:</b> Geräte und Verbrauchsmaterialien                          | 16 |
| <b>Tab. 2:</b> Chemikalien                                               | 17 |
| <b>Tab. 3:</b> Gynäkologischen Zelllinien                                | 17 |
| <b>Tab. 4:</b> Medien und Zusätze                                        | 18 |
| <b>Tab. 5:</b> Benutzte Softwares                                        | 18 |
| <b>Tab. 6:</b> Verdünnungsverhältnis der jeweiligen Zelllinien           | 20 |
| <b>Tab. 7:</b> Empfohlene Anfangszahl pro Zelllinie für die Kultivierung | 21 |

## 8. Literaturverzeichnis

Arndt, S. et al. Cold atmospheric plasma (CAP) changes gene expression of key molecules of the wound healing machinery and improves wound healing in vitro and in vivo. PLoS One. 2013;8:e79325

Bauerfeind, I. Mammakarzinome. Stuttgart: Thieme Verlag, 2017: 304

Bose, R. & Ma, C. Breast Cancer, HER2 Mutations, and Overcoming Drug Resistance. N Engl J Med. 2021;385:1241-1243

Chen, Z., Simonyan, H., Cheng, X., Gjika, E., Lin, L., Canady, J., Sherman, J. H., Young, C. & Keidar, M. A Novel Micro Cold Atmospheric Plasma Device for Glioblastoma Both In Vitro and In Vivo. Cancers (Basel). 2019;9:61

Conway, G. E. et al. Cold Atmospheric Plasma induces accumulation of lysosomes and caspase-independent cell death in U373MG glioblastoma multiforme cells. Sci Rep. 2019;9:12891

Fong, P. C. Inhibition of Poly(ADP-Ribose) Polymerase in Tumors from BRCA Mutation Carriers. N Engl J Med. 2009;361:1230-1243

Garbar, C., Mascaux, C., Giustiniani, J., Merrouche, Y. & Bensussan, A. Chemotherapy treatment induces an increase of autophagy in the luminal breast cancer cell MCF7, but not in the triple-negative MDA-MB231. Sci Rep. 2017;7:7417.

Gelbrich, N., Stope, M. & Burchardt, M. Kaltes atmosphärisches Plasma für die urologische Tumorthherapie. Urologe A. 2019;58:1286-1292.

Gümbel, D. et al. Cold Atmospheric Plasma in the Treatment of Osteosarcoma. Int J Mol Sci. 2017;18:2004.

Gunjal Garg, J. P. S., Kumar, S., Bryant, C. S., Munkarah, A. & Morris, R. T. Ovarian and uterine carcinosarcomas: a comparative analysis of prognostic variables and survival outcomes. Int J Gynecol Cancer. 2011;21:528-532

Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. 2021. S3-Leitlinie

Mammakarzinom. [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/032-045OLI\\_S3\\_Mammakarzinom\\_2021-07.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-045OLI_S3_Mammakarzinom_2021-07.pdf) (Zugriffsdatum: 15.12.2024).

Ishaq, M., Evans, M. & Ostrikov, K. Effect of atmospheric gas plasmas on cancer cell signaling. *Int J Cancer*. 2014;134:1517-1528

Jokar, F. et al. Differential Expression of HSP90 $\beta$  in MDA-MB-231 and MCF-7 Cell Lines after Treatment with Doxorubicin. *J Pharmacopuncture*. 2019;22:28-34.

Kaushik, N. K. et al. Biological and medical applications of plasma-activated media, water, and solutions. *Biol Chem*. 2018;400:39-62.

Koensgen, D. et al. Cold Atmospheric Plasma (CAP) and CAP-Stimulated Cell Culture Media Suppress Ovarian Cancer Cell Growth - A Putative Treatment Option in Ovarian Cancer Therapy. *Anticancer Res*. 2017;37:6739-6744.

Krebsinformationsdienst. Stadieneinteilung des Brustkrebses. 2023. <https://www.krebsinformationsdienst.de/brustkrebs/stadieneinteilung> (Zugriffsdatum: 15.12.2024).

Kuhn, W., Possinger, K. & Willich, N. (Hrsg.). *Gynäkologische Malignome*. 2. Aufl. München: W. Zuckschwerdt Verlag, 2012:288

Kumari, S., Mohan, M. G., Shailender, G., Badana, A. K. & Malla, R. R. Synergistic enhancement of apoptosis by coralyne and paclitaxel in combination on MDA-MB-231 a triple-negative breast cancer cell line. *J Cell Biochem*. 2019;120:18104–18116.

Liguori, I. & Russo, G. Oxidative stress, aging, and diseases. *Aging Clin Exp Res*. 2018;30:6-14.

Leitlinienprogramm S2k Uterine Sarkome. DGGG, OGGG &SGGG. 2024. [https://register.awmf.org/assets/guidelines/015-074I\\_S2k\\_Uterine\\_Sarkome\\_2024-10.pdf](https://register.awmf.org/assets/guidelines/015-074I_S2k_Uterine_Sarkome_2024-10.pdf) (Zugriffsdatum: 15.12.2024).

Motaln, H., Recek, N. & Rogelj, B. Intracellular Responses Triggered by Cold Atmospheric Plasma and Plasma-Activated Media in Cancer Cells. *Molecules*. 2021;26:1336.

Naito, Y., Kai, Y., Ishikawa, T., Fujita, T., Uehara, K., Doihara, H., Tokunaga, S., Shimokawa, M., Ito, Y. & Saeki, T. Chemotherapy-induced nausea and vomiting in patients with breast cancer: a prospective cohort study. Support Care Cancer. 2020;28:2293-2301 (Zugriffsdatum: 15.12.2024).

Petru, E., Jonat, W., Fink, D. & Köchli, O. R. (Hrsg.) Praxisbuch Gynäkologische Onkologie. Berlin: Springer, 2011

Robert Koch-Institut. Krebs in Deutschland. Häufigkeiten von Krebserkrankungen, ICD-10 C50 (Brustkrebs). 2023. [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/kid\\_2023/kid\\_2023\\_c50\\_brust.pdf?blob=publicationFile](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2023/kid_2023_c50_brust.pdf?blob=publicationFile) (Zugriffsdatum: 15.12.2024)

Robert Koch-Institut. Krebs in Deutschland. Häufigkeiten von Krebserkrankungen, ICD-10 C54 und C55 (Gebärmutterkörperkrebs). [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/kid\\_2023/kid\\_2023\\_c54\\_c55\\_gebaermutterkoerper.pdf?blob=publicationFile](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2023/kid_2023_c54_c55_gebaermutterkoerper.pdf?blob=publicationFile) (Zugriffsdatum: 15.12.2024).

Robson, M. Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. N Engl J Med. 2017;377:625-633

S3-Leitlinie Endometriumkarzinom. 2024. [https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user\\_upload/Downloads/Leitlinien/Endometriumkarzinom/Version\\_3/LL\\_Endometriumkarzinom\\_Langversion\\_3.0.pdf](https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Endometriumkarzinom/Version_3/LL_Endometriumkarzinom_Langversion_3.0.pdf) (Zugriffsdatum: 15.12.2024).

Todesursachenstatistik. Statistisches Bundesamt Deutschland. GENESIS-Online. <https://www-genesis.destatis.de/datenbank/online/table/23211-0002> (Zugriffsdatum: 15.12.2024).

Vaquero, J. Cold-Atmospheric Plasma Induces Tumor Cell Death in Preclinical In Vivo and In Vitro Models of Human Cholangiocarcinoma. Plasma Med. 2020;10:27-41.

Wallwiener, D., Grischke, E.-M., Brucker, S. Y., Taran, F.-A., Bastert, G. Gynäkologische Onkologie. Berlin: Springer, 2019:398-399.

Wang, M., Holmes, B., Cheng, X., Keidar, M. & Zhang, L. G. Cold atmospheric plasma for selectively ablating metastatic breast cancer cells. Cancer Res. 2013;73:1557-1567



Winter, S., Meyer-Lindenberg, A., Wolf, G., Reese, S. & Nolff, M. C. In vitro evaluation of the decontamination effect of cold atmospheric argon plasma on selected bacteria frequently encountered in small animal bite injuries. *J Microbiol Methods*. 2020;169:105728

Yan, D. et al. Toward understanding the selective anticancer capacity of cold atmospheric plasma—A model based on aquaporins. *Biointerphases*. 2015;10:040801

Yan, D., Sherman, J. H. & Keidar, M. The Application of the Cold Atmospheric Plasma-Activated Solutions in Cancer Treatment. *Biomolecules*. 2017;7:45

Zhu, W., et al. Synergistic Effect of Cold Atmospheric Plasma and Drug Loaded Core-shell Nanoparticles on Inhibiting Breast Cancer Cell Growth. *Sci Rep*. 2016;6:21974.

Zuan-Fu, L. & Ma, P. C. Emerging insights of tumor heterogeneity and drug resistance mechanisms in lung cancer targeted therapy. *J Hematol Oncol*. 2019;12:76

## **9. Erklärung zum Eigenanteil**

Diese Arbeit wurde im Labor für Gynäkologie und gynäkologische Onkologie der Universitätsmedizin Greifswald unter meinem Doktorvater Prof. Dr. Alexander Mustea und meinem Betreuer PD Dr. Matthias Stope durchgeführt.

Die Konzeption der Arbeit erfolgte in Zusammenarbeit mit PD Dr. Matthias Stope, Forschungsleiter der Klinik für Gynäkologie und gynäkologische Onkologie des Universitätsklinikums Bonn.

Alle drei Experimente wurden nach Einarbeitung durch PD Dr. Matthias Stope, Dr. Madeleine Paditz und Dr. Rebekka Einenkel von mir eigenständig durchgeführt.

Das zur Auswertung verwendete Datenmaterial wurde eigenständig generiert.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig nach Anleitung durch PD Dr. Matthias Stope.

## 10. Veröffentlichung

Teile dieser Arbeit wurde bereits in folgenden Publikationen veröffentlicht:

**Kongressabstracts zur Tagung 2020 der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG), Thieme 2020.** M. Stope, R. Benouahi, T. Grüter, F. Pfister, C. Sander, E. Egger, D. Könsgen, MD. Keyver-Paik, A. Mustea doi:[10.1055/s-0040-1718186](https://doi.org/10.1055/s-0040-1718186)

Analyse der biologischen Wirkung von kaltem physikalischem Plasma auf gynäkologische Tumorzellen - Eine innovative Therapiemethode für gynäkologische Onkologie

**Protherapeutic Effects and Inactivation of Mammary Carcinoma Cells by a Medical Argon Plasma Device** doi: [10.21873/anticancerres.14640](https://doi.org/10.21873/anticancerres.14640)

Matthias B Stope, Rim Benouahi, Caroline Sander, Lyubomir Haralambiev, Andreas Nitsch, Eva Egger, Alexander Mustea

## 11. Danksagung

Für diese Arbeit möchte ich mich herzlich bei Ihnen bedanken:

Prof. Dr. med. Dr. h.c. Alexander Mustea, Direktor der Klinik für Gynäkologie und Gynäkologische Onkologie am Universitätsklinikum Bonn, danke ich für die großartige Gelegenheit in die laborchemische Welt der gynäkologischen und onkologischen Forschung einzutauchen und meine Versuche während des Medizinstudiums durchführen zu dürfen.

Priv.-Doz. Dr. Dr. Matthias Stope, Leiter der gynäkologischen und gynäkologisch-onkologische Forschung am Universitätsklinikum Bonn, danke ich für die engmaschige wissenschaftliche Betreuung, die tägliche Motivation und mentale Unterstützung. Außerdem danke ich ihm für die uneingeschränkte Bereitschaft alle Fragen zu beantworten, für die stetige Erreichbarkeit und seine grenzlose Hilfsbereitschaft.

Außerdem möchte ich mich bei meinem Partner bedanken, Mohamed Ismail, der mich durch alle Höhen und Tiefen des Medizinstudiums und vor allen während der Laborzeit uneingeschränkt und rund um die Uhr unterstützt hat. Ferner möchte ich mich bei meinem besten Freund bedanken, Yassine Ghanjaoui, der stets zur Verfügung stand, alle wissenschaftlichen Fragen offen zu diskutieren und großartige sowie unermüdliche Unterstützung angeboten hat.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, Sofia El Bahaj und Mohamed Benouahi und an meinen Geschwistern Lamiae und Hafsa Benouahi. Ihre uneingeschränkte und umfassende Unterstützung war von Anfang an und in jeder Hinsicht spürbar.