

Chemosensitivierung von Ovarialkarzinom-Zellen mittels nicht-invasivem Physikalischem Plasma

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Florian Alexander Maass

aus Kiel

2026

Angefertigt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. hc. Alexander Mustea

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Manuel Ritter

Tag der mündlichen Prüfung: 16.03.2026

Aus der Klinik für Gynäkologie und Gynäkologische Onkologie

Für Mareile

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	9
1.1 Ovarialkarzinom	9
1.2 Therapieoptionen	10
1.3 PARP-Inhibitoren	12
1.4 Nicht invasives physikalisches Plasma	14
1.5 Quellen der Plasmagewinnung	15
1.6 NIPP in der medizinischen Anwendung	16
1.7 Zielsetzung	17
2. Material und Methoden	19
2.1 Material	19
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	19
2.1.2 Chemikalien und kommerzielle Lösungen	20
2.1.3 Zelllinien	20
2.1.4 Zellkultur: Medien und Zusätze	21
2.1.5 Software und genutzte Programme	21
2.2 Methoden	22
2.2.1 Zelllinien	22
2.2.2 Zellbiologische Methoden: Kryokonservierung und Auftauen der Zellen	22
2.2.3 Kultivierung und Normalpassage der Zellen	23
2.2.4 Aussaat und Behandlung der Zellen	23
2.2.5 Bestimmung der Zellzahl	24
2.3 pH Bestimmung nach NIPP Behandlung	25

2.4 Temperaturbestimmung nach NIPP Behandlung	26
2.5 Statistische Auswertung	26
3. Ergebnisse	28
3.1 Etablierung geeigneter Kultivierungsbedingungen	28
3.2 Abhängigkeit von pH und Temperatur von der NIPP Behandlung	33
3.3 Bestimmung der Temperatur in Abhängigkeit der NIPP Behandlungszeiten	35
4. Diskussion	39
4.1 Das Ovarialkarzinom	39
4.2 Temperatur und pH Veränderungen durch den Einfluss von NIPP	41
4.3 Unterschiede zwischen OVCAR3 und Skov3 Zellen	43
4.3.1 Olaparib	45
4.3.2 Niraparib	46
4.4 Kombination aus NIPP und PARP-Inhibitoren	47
5. Zusammenfassung	49
6. Abbildungsverzeichnis	51
7. Tabellenverzeichnis	52
8. Literaturverzeichnis	53
9. Erklärung zum Eigenanteil	69
10. Danksagung	70

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APPJ	Atmospheric Pressure Plasma Jet
β -NAD	β Nicotinamid-Adenin-Nukleotid
BRCA1	Breast Cancer 1
BRCA2	Breast Cancer 2
CAP	Cold atmospheric Plasma
DBD	Dielectric Barrier Discharge
HGSC	High grade serous carcinoma
HRR	homologe Rekombinationsreparatur
IL8	Interleukin 8
MW	Mittelwert
NIPP	nicht invasives physikalisches Plasma
Nira	Niraparib
NS	non serous
NTPP	Nicht thermisches physikalisches Plasma
OC	Ovarialkarzinom
Ola	Olaparib
OVCAR3	Ovarialkarzinomzelllinie
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RONs	reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies
Ruca	Rucaparib.

SD	(engl. standard deviation) Standardabweichung
SK-OV-3	Ovarialkarzinomzelllinie
slm	Standardliter pro Minute
TTP	Tissue-Tolerable Plasma
x g	Zentrifugalkraft

1. Einleitung

1.1 Ovarialkarzinom

Im Jahr 2023 sind in Deutschland mehr als 230000 Menschen an Krebs verstorben. Damit sind Krebserkrankungen für fast ein Viertel der Todesfälle in Deutschland verantwortlich (Statistisches Bundesamt, September 2024). In Deutschland erkranken jährlich mehr als 7000 Frauen am Ovarialkarzinom (OC). Die jährliche Mortalität liegt bei 5400 Patientinnen. Das OC ist damit die dritthäufigste Malignität in der Gynäkologie (Buttmann-Schweiger und Kraywinkel, 2019; Nash et al. 2020). Die Erkrankung kann in jedem Alter auftreten, allerdings steigt die Inzidenz mit fortgeschrittenem Alter. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 69 Jahren (Buttmann-Schweiger und Kraywinkel, 2019). Zu den Risikofaktoren zählen das fortgeschrittene Alter, eine familiäre Häufung von Brustkrebs oder OC (bzw. das Vorliegen einer BRCA1 und BRCA2 Mutation), aber auch Übergewicht und Kinderlosigkeit (Buttmann-Schweiger und Kraywinkel, 2019; Doubeni und Doubeni und Myers, 2016). Als protektiv werden Faktoren wie die Einnahme von Ovulationshemmer oder mehrere Geburten genannt, da diese die Eisprünge unterdrücken (Buttmann-Schweiger und Kraywinkel, 2019). Es gibt verschiedene histologische Subtypen des OC. Die häufigsten Subtypen sind das seröse, das endometriumoide, das klarzellige und das muzinöse OC. Diese Unterscheidung ist klinisch wichtig, weil die unterschiedlichen Subtypen verschiedene Eigenschaften haben (McCluggage, 2011; Meinhold-Heerlein, 2011). Konkret unterscheidet man in die histologischen Subtypen Typ I ("low grade") und Typ II ("high grade"). Die Typ I Tumore werden häufig im FIGO (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique) Stadium I entdeckt und sind gut differenziert. Sie entwickeln sich häufig aus benignen Tumoren (Zystadenom) und haben eine relativ gute Prognose. Unter Typ I Subtypen fasst man endometriumoide Low-Grade und muzinöse Tumore zusammen. Der Typ II wird häufig erst in späterem FIGO Stadium diagnostiziert. Hier liegen keine benignen Tumorerkrankungen im Vorfeld vor. Die Progression dieses Tumors ist schnell und geht mit einer schlechten Prognose einher (Meinhold-Heerlein, 2011). Das OC ist eine überdurchschnittlich aggressive Erkrankung, welche in Industrieländern die häufigste Todesursache bei Frauen mit einer gynäkologischen Krebsdiagnose stellt. Damit ist es im Allgemeinen die fünfthäufigste Todesursache bei Frauen (Arora et al., 2023). Diese

schlechte Prognose hat verschiedene Gründe. Einerseits hat sich derzeit noch kein Screeningverfahren bewähren können. Sowohl regelmäßige sonographische Untersuchungen, als auch die Bestimmung von Tumormarkern konnten die Mortalität nicht senken. Zwar gibt es das Antigen 125 (CA125), es gilt allerdings als unspezifisch. Der Nachweis von CA125 korreliert nicht mit der Mortalität (Buttmann-Schweiger und Kraywinkel 2019; Arora et al., Stewart et al., 2019; Zhang, Siu et al., 2022). Aufgrund des fehlenden Screeningverfahrens und den unspezifischen bzw. fehlenden Symptomen, wird das OC in 75% der Fälle erst in fortgeschrittenem Stadium erkannt (Doubeni und Doubeni und Myers, 2016; Stewart et al., 2019). Das OC umfasst verschiedene, sehr heterogene Subtypen, was die Behandlung ebenfalls erschwert (Kossai et al., 2018). Ein weiterer, prognostisch ungünstiger, Faktor ist, dass es, trotz initial gutem therapeutischem Ansprechen, häufig zu Rezidiven kommt. Mit jedem Rezidiv nimmt die Wirksamkeit der zielgerichteten Therapie ab (Gupta et al., 2019).

1.2 Therapieoptionen

Die Wahl der Therapie ist abhängig von Stadium und histologischem Subtyp der Erkrankung. Die komplette operative Tumorentfernung ist prognostisch hoch relevant (Ruckhäberle und Fehm, 2022). Es gibt verschiedene operative Verfahren wie die primäre Debulking-Operation welche der Standard ist. Alternativ kann auch vorher eine erste Chemotherapie verabreicht werden. Das Gesamtüberleben war bei beiden Verfahren ähnlich. Nur die komplette Resektion des Primärtumors konnte die Prognose verbessern (Vergote et al., 2011). Die These, dass eine Operation einen signifikanten Vorteil auf das Überleben der Patientinnen hat, wird von vielen Quellen in der Literatur getragen, allerdings gibt es mittlerweile auch Quellen, die keinen signifikanten Vorteil in der Operation im Vergleich zur Chemotherapie sehen (Chern und Curtin, 2016). Ab einem FIGO Stadium I C wird die Chemotherapie mit Platinderivaten empfohlen. Hier hat sich in den letzten Jahren die Kombination aus Carboplatin und Paclitaxel etabliert (Parmar et al., 2003; Ruckhäberle und Fehm, 2022). Häufig wird die Kombination aus Carboplatin und Paclitaxel noch um den Antikörper Bevacizumab ergänzt. In Studien konnte belegt werden, dass das Hinzufügen von Bevacizumab das Gesamtüberleben bei

platinsensitiven rezidivierenden OC gegenüber der Standard-Chemotherapie verbessern konnte (Aghajanian et al., 2012; Coleman et al., 2017). Diese Medikamente zeigen bei 60 - 80% der Patientinnen initial ein gutes Ansprechen, entwickeln aber im Verlauf sehr häufig Resistenzen gegenüber Platin, was die Wirksamkeit der Therapie reduziert (van Zyl et al., 2018). In der Literatur ist die Resistenz einiger, in dieser Arbeit untersuchten, Skov3 Zellen gegenüber Cisplatin mittlerweile gut belegt (Wang und Smithrud, 2011; Hou et al., 2017; Kalinina et al. 2018). Es gibt verschiedene Erklärungsansätze für diese Resistenz. So konnte nachgewiesen werden, dass es einige Gene gibt, die während der Entwicklung einer Resistenz von Skov3 Zellen gegenüber Cisplatin vermehrt exprimiert wurden. Diese Gene kodieren für wichtige antioxidative Enzyme (z. B. SOD2, CAT oder GPX1) (Duan et al., 2003; Kalinina et al., 2018). Das Gen welches für die NOX5-Isoform der NADPH-Oxidase kodiert wurde hingegen in resistenten Zellen weniger stark exprimiert. Also spielt die zelluläre Redoxhomöostase eine signifikante Rolle in der Cisplatinresistenz (Kainina et al., 2018). Des Weiteren wurde eine Umstrukturierung der Mitochondrien in resistenten Zellen beschrieben, welche mit enzymatischen Veränderungen einhergeht. Deshalb scheint die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Funktionalität für therapeutische Ansätze von Bedeutung zu sein (Zampieri und Grasso et al., 2020). Bei OVCAR3 Zellen gibt es in der Literatur Quellen, welche hier ebenfalls eine Platinresistenz feststellen (Bernhardt et al., 1992; Mad-Adam et al., 2016, Musa et al., 2016). Dabei zeigten sich morphologische Unterschiede zwischen platinresistenten OVCAR3 Zellen im Vergleich zu platinsensitiven Zellen. Dabei war die Expression von E-Cadherin bei den resistenten Zellen verringert, während die Expression von Fibronectin und Vimentin erhöht war (Brozovic, 2017). Insgesamt sind die OVCAR3 Zellen allerdings sensitiver als Skov3 Zellen (Bernhardt et al., 1992). Es ist noch nicht abschließend geklärt, was die Ursachen dafür sind. Allerdings gibt es verschiedene Erklärungsansätze. Die OVCAR3 Zellen gehören zu den „High Grade serous Carcinoma“ (HGSC) welche sehr häufig eine p53 Mutation aufweisen. Da diese Zellen Veränderungen der homologen Rekombination aufweisen, könnte dies die Sensitivität beeinflussen (Xu und Fidler, 2000). In der aktuellen Literatur finden sich auch Belege für eine Platinsensitivität in OVCAR3 Zellen. Eine Studie konnte eine Sensitivität von OVCAR3 Zellen gegenüber Carboplatin und Rucaparib nachweisen. Diese wurde durch den Verlust der homologen Rekombinationsreparatur (HRR) erklärt (Bradbury et al., 2020). Bei ungefähr der Hälfte

der Patientinnen mit fortgeschrittenem oder rezidivierendem OC kommt es, trotz Therapie, zu einem Rezidiv (Chambers et al. 2021). Die Gründe für die beschriebene Platinresistenz sind vielfältig und komplex. Die Mechanismen reichen von Multidrugresistenzen, über DNA-Reparatur-Mechanismen der Tumorzellen oder den Zellstoffwechsel bis zu oxidativem Stress. Auch Autophagie, abnormale Signalwege und die Immunität begünstigen die Resistenzen (Yang et al., 2022).

1.3 PARP-Inhibitoren

Eine sehr vielversprechende Therapie ist die Gruppe der Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP)-Inhibitoren (Ruckhäberle und Fehm, 2022). Aus diesem Grund sind in der jüngeren Vergangenheit die ersten Produkte zugelassen worden. Ein prominentes Beispiel ist Olaparib, welches im Jahr 2019 in Deutschland zugelassen wurde. In den nächsten Jahren ist noch mit weiteren Zulassungen zu rechnen. (Utzt, 2020) In den USA sind alle hier verwendeten PARP-Inhibitoren Olaparib, Niraparib und Rucaparib bereits seit mehreren Jahren zugelassen (Hughes, 2017). Diese haben zuletzt insbesondere in der Therapie des serösen high-grade OC erfolgsversprechende Ergebnisse geliefert. Sie hemmen das Enzym PARP. Dieses Enzym ist maßgeblich an der Reparatur der DNA-Einzelstränge beteiligt. Bei Tumorzellen ist die homologe Rekombination beschädigt und eine Reparatur der Doppelstränge nicht möglich. Hier sorgt PARP dafür, dass die Tumorzellen eine schnelle Zellteilung vornehmen können und sich der Tumor so ausbreitet. PARP-Inhibitoren verhindern das und leiten so die Apoptose der Tumorzellen ein (Ruckhäberle und Fehm, 2022). Die Inhibition passiert über einen Eingriff in das PARP-1-Protein bei einem Einzelstrangbruch einer DNA-Läsion. PARP-1 bindet dazu beschädigte DNA an Einzelstrangbrüche und sorgt so für allosterische Veränderungen (Lord und Ashworth, 2017). Es wird der katalytische Zyklus unterbrochen, was im Verlauf dazu führt, dass die Replikationsgabel fortschreitet und Doppelstrangbrüche hervorruft. Hierbei werden unter anderem die BRCA-1 und BRCA-2 Gene von den PARP-Inhibitoren angegriffen. Diese beiden Gene sind besonders häufig die Träger von tumorigenen Mutationen und werden unter anderem mit Brustkrebs, Prostatakrebs, Bauchspeicheldrüsenkrebs und dem OC in Verbindung gebracht (Lord und Ashworth, 2008; Zhu et al., 2020). Wie bereits beschrieben, haben Trägerinnen der erblichen

Mutationen auf dem BRCA1 und BRCA2 Gen ein wesentlich höheres Risiko an diversen Tumorleiden zu erkranken. BRCA1 und BRCA2 sind maßgeblich an der Reparatur der DNA-Doppelstrangbrüche beteiligt. Der beschriebene Prozess wird als homologe Rekombinationsreparatur (HRR) bezeichnet. Wenn dieser klassische Weg der DNA-Reparatur durch Mutationen gestört wird, kommt es zu alternativen Methoden, die eine zerstörte DNA zur Folge haben. Alle, aktuell zugelassenen PARP-Inhibitoren, reagieren mit der Bindungsstelle des PARP-Enzym Cofaktors β Nikotionamid-Adenin-Nukleotid (β -NAD) in der katalytischen Domäne von PARP-1 oder PARP-2. Dabei unterscheiden sie sich allerdings in ihrer Wirkung auf zytotoxische Potenz und in der Fähigkeit des „PARP-1 trappings“. Es zeigte sich aber das einige PARP-Inhibitoren, darunter auch die in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren (Niraparib, Olaparib und Rucaparib), an PARP1 des katalytischen Zentrums angreifen und dort ihre Wirkung entfalten können (Lord und Ashworth, 2017). Leider zeigen sich auch bei der zielgerichteten Therapie mit PARP-Inhibitoren, bei fortgeschrittenem Tumor, vermehrt Resistenzen (Dias et al., 2021; Lord und Ashworth, 2017). Es wurden verschiedene Wirkmechanismen beschrieben, die eine Resistenz zur Folge hatten. Dazu gehören Resistenzen gegenüber den Wirkstoffen, die Wiederherstellung der HRR und die Wiederherstellung der Stabilität der Replikationsgabel dienen (Dias et al. 2021). Der häufigste Grund für eine PARP-Inhibitoren Resistenz ist die Wiederherstellung von BRCA1 und BRCA2, welche häufig von PARP-Inhibitoren angegriffen werden. Dies geschieht durch sekundäre Mutationen. Solche Mutationen treten häufiger bei platinresistenten OC-Zellen auf (Jiang et al., 2019). Eine Platin- und PARP-Inhibitor-sensitive OC-Zelllinie, welche auch BRCA2 mutiert war, konnte in vitro BRCA2 wiederherstellen. Dies wurde durch sekundäre Mutationen erreicht. Es konnte gezeigt werden, dass eine Cisplatinresistenz und eine PARP-Inhibitorresistenz häufig gemeinsam auftreten. Bei Tumorzellen, welche aus Aszites bei platinresistentem, rezidivierendem OC entnommen wurden, zeigten sich sekundäre BRCA2 Mutationen und eine BRCA2-Kompetenz. Durch die Depletion von BRCA2 konnten die Tumorzellen wieder für eine Therapie sensibilisiert werden (Jiang et al., 2019; Sakai et al., 2009). PARP1 ist ein Enzym, welches bei DNA-Schäden freigesetzt wird und eine wichtige Rolle in der Reparatur spielt. Da die Hemmung von PARP1 nicht gleichbedeutend mit einer Deletion ist, benötigen PARP-Inhibitoren eine kleine Menge des Enzym um wirken zu können. Nur wenn eine gewisse Menge PARP1 vorhanden ist, können PARP-Inhibitoren

wirken. Dies liegt daran, dass das Substrat sowohl für das Trapping, als auch für die zytotoxische Wirkung der PARP-Inhibitoren benötigt wird. Entsprechend führt die Deletion von PARP1 zur einer PARP-Inhibitorresistenz (Jiang et al., 2019; Makvandi et al., 2018).

1.4 Nicht invasives physikalisches Plasma

Physikalisches Plasma ist ein hochreaktives, ionisiertes Gas. Es setzt sich aus elektrisch neutralen Teilchen (Moleküle, Atome), elektrisch geladenen Teilchen (Ionen), freien Elektronen, Photonen, Radikalen und elektromagnetischer Strahlung zusammen. Plasma wird neben fest, flüssig und gasförmig häufig als der vierte Aggregatzustand bezeichnet und entsteht durch die teilweise Ionisierung eines Gases (Lendeckel et al., 2015). Plasma entsteht durch Energiezufuhr, welche durch thermische, elektrische oder chemische Prozesse zur Verfügung gestellt wird. Relevant ist vor allem ein Prozess, der Elektrostöße, Kollisionen, Strahlungswechselwirkungen und den Ladungsaustausch umfasst. Zur Erzeugung von physikalischem Plasma in der Medizin ist die Elektronenstoßionisierung besonders gut geeignet, da sie am robustesten ist (Woedtke et al., 2019). Weil angeregte Teilchen unter Emission von Photonen in ihren Grundzustand zurückkehren, zeigt Plasma ein helles Leuchten. Plasma emittiert auch UV-Strahlung sowie sichtbares Licht und Wärmestrahlung in Form von elektromagnetischen Wellen (Jantschek, 2022). Man unterscheidet in thermisches und nicht thermisches Plasma. Das thermische Plasma besteht aus Elektronen und schweren Teilchen (Neutrale, Ionen) in der gleichen Temperatur (Hoffmann et al., 2013). Plasma tritt in der Natur beispielsweise als Blitz in einem Gewitter auf (Lendeckel et al., 2015). Dem gegenüber steht das „Nicht Invasive Physikalische Plasma“ (NIPP), welches nicht thermisch ist. NIPP wird als nicht thermisch bezeichnet, weil die unterschiedlichen Bestandteile verschiedene Temperaturen haben. Die Schweren Teilchen (Atome, Moleküle) haben Raumtemperatur, was dazu führt das die Temperatur nicht über 40°C steigt. Die niedrige Temperatur ist auch eine Voraussetzung für die klinische Anwendung, da andernfalls viele unerwünschte Nebenwirkungen zu erwarten wären. Zur Herstellung von Plasma werden verschiedene Gase und Gasgemische, wie zum Beispiel Argon, Helium, Stickstoff oder Luft verwendet (Hoffmann et al., 2013; Woedtke und Weltmann, 2016).

1.5 Quellen der Plasmagewinnung

Während das thermische Plasma in der Natur vorkommt gibt es verschiedene Herstellungswege für NIPP. Dazu zählen die Plasmanadel und der Plasmastift, sowie Dielectric Barrier Discharge (DBD) und Atmospheric Pressure Plasma Jet (APPJ) (Hoffmann et al., 2013). In dieser Arbeit wurde der „KinPen“ verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass die Plasmanadel bei in vivo-Versuchen an Mäusen eine blutgerinnende und wundheilende Wirkung hatte (García-Alcantara et al., 2013). Die DBD kommt in verschiedenen Bereichen zum Einsatz. Es wird unter anderem bei der Angiogenese, der Bakterieninaktivierung und der Sterilisation von Gewebe verwendet (Hoffmann et al., 2013). Die DBD besteht aus einer Hochspannungselektrode und einer geerdeten Elektrode. Es ist eine dielektrische, nicht thermische Entladungsform mit einem breiten Druckbereich. Es wird immer mindestens eine Elektrode von dieser dielektrischen Schicht bedeckt. Das Dielektrikum kann die Ladung gleichmäßig über die gesamte Fläche verteilen. Da es hier einen Gasspalt gibt, tritt der sogenannte Entladungsmodus auf. Dabei läuft das Gas zwischen den beiden Elektroden hin und her und erzeugt, aufgrund von Ionisierung, Spannungen. Diesen Gasspalt macht man sich bei plasmachemischen Reaktionen zunutze (Jantschek, 2022; Pietsch, 2001). Der APPJ wird unter anderem in der bakteriellen Sterilisation und der Inaktivierung von Mikroorganismen eingesetzt (Hoffmann et al., 2013; Schutze et al., 1998). Er ist eine weitere Option, um NIPP herzustellen. Auch er besteht aus zwei Elektroden, zwischen denen ein Gas in hoher Geschwindigkeit strömt. In diesem Fall ist die äußere Elektrode geerdet während an die zentrale Elektrode eine Hochgeschwindigkeitsleistung von 50-100W angelegt wird. Dadurch entsteht die Entladung. In der Folge gelangt die erzeugte reaktive Spezies mit hoher Geschwindigkeit zu dem zu behandelnden Bereich (Hoffmann et al., 2013). Der „Kinpen Med“ war die, in dieser Arbeit verwendete, Plasmaquelle. Auch hier wird eine hochfrequente Wechselspannung an ein Gas angelegt. Der Elektronenfluss ist heiß und sehr schnell. Durch die hohe Geschwindigkeit werden Atome des Trägergases (in dieser Arbeit Argon) ionisiert. Argon Ionen sind schwerer als die schnellen Elektronen und können daher weniger stark beschleunigt werden. Des Weiteren wird die Energie der Elektronen nur ineffizient auf die Ionen übertragen, was zur Folge hat, dass diese nicht

erhitzen. Aus diesem Grund bleibt das Gesamtplasma, trotz erhitzter Elektronen, kalt. Noch ein weiterer Mechanismus trägt zur Kühlung des Plasmas bei. Durch den Fluss des Speisegases Argon entsteht ein Kanal mit leicht entzündlichem Gas an der Außenseite der Strahldüse. Das hier erzeugte Plasma reagiert mit der Umgebungsluft und bildet neutrale, ionische und radikalische Sauerstoffspezies (Bekeschus et al., 2016). Bei einem durchschnittlichen Durchfluss von 3-5 Standardliter pro Minute (slm) emittiert der Jet einen 9-13mm langen NIPP Effluenten. Auch die praktische Arbeit mit dem „Kinpen Med“ gestaltet sich relativ leicht, da man ihn, während einer Behandlung, wie einen Stift halten kann (Reuter et al., 2018).

1.6 NIPP in der medizinischen Anwendung

Aufgrund der oben beschriebenen Eigenschaften, insbesondere der niedrigen Temperatur, hat NIPP sich in verschiedenen medizinischen Bereichen etabliert. Schon jetzt wird NIPP in der Zahnheilkunde verwendet und hilft dort unter anderem bei der Bekämpfung von oralen Bakterien und Krankheitserregern. In der Zahnreinigung wird NIPP ebenfalls bereits verwendet. Des Weiteren wurde NIPP eine sehr effektiv sterilisierende Wirkung nachgewiesen, welche man sich bei der Sterilisation von chirurgischem Besteck zunutze macht. Auch in der Luftreinigungstechnologie und der Nahrungsmittelindustrie wird NIPP verwendet (Hoffmann et al., 2013; Kramer et al., 2015). Aktuell wird NIPP vor allem zur Wundheilung und zur Behandlung von infektiösen Hauterkrankungen im Bereich der Dermatologie verwendet (Weltmann und Woedtke, 2017). In dermatologischen Studien konnte nachgewiesen werden, dass NIPP sowohl auf Hautekzeme als auch bei Juckreiz zufriedenstellende Ergebnisse erreicht. Dabei konnte NIPP sich sowohl gegen herkömmliche Therapieansätze gegen Juckreiz als auch gegen Placebo bei der Behandlung von Ekzemen durchsetzen (Bernhardt et al., 2019; Heinlin et al., 2013; Mertens et al. 2008). In den letzten Jahren konnte NIPP eine signifikant krebshemmende Wirkung nachgewiesen werden. In diesem Kontext spricht man von „Plasma-Onkologie“ (Weltmann et al., 2010). Hierbei werden die Krebszellen nicht nur durch die Einleitung der Apoptose, sondern auch durch Nekrose von NIPP angegriffen. Es zeigen sich hierbei deutliche Unterscheidungen in Abhängigkeit der Behandlungsdosis. Plasmazellen sind in der Lage die Apoptosewege wieder einzuleiten.

In Tumorzellen ist die Apoptose häufig gestört, was dazu führt das Chemotherapeutika nicht wirken und sich therapielimitierende Chemoresistenzen zeigen. Plasma bietet also neben einer direkt inhibierenden Wirkung, auch die Möglichkeit der indirekten Tumorbekämpfung, indem Tumorzellen wieder für Chemotherapeutika sensibilisiert werden (Fridman et al., 2007). Einer der großen Vorteile von NIPP ist, dass es Tumorzellen selektiv inhibiert, ohne dabei die physiologischen Zellen zu zerstören (Kaushik et al., 2015). Dass nur die Tumorzellen von NIPP angegriffen werden, liegt daran, dass sie sensitiver für reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RONS) sind als gesunde Zellen (Kim und Chung, 2016). Das Melanom ist eine der Malignitäten, welche sich, aufgrund der kutanen Lokalisation, besonders gut für die NIPP Behandlung anbietet. In Tierversuchen konnte hier bereits eine signifikante Verlängerung des Überlebens gezeigt werden (Yan et al., 2017). Weitere Beispiele für eine Krebshemmung durch NIPP sind das Glioblastom (Tanaka et al., 2011), das Pankreaskarzinom (Pertecke et al., 2012), der Prostatakrebs (Hirst et al., 2015), der Lungenkrebs (Kim et al., 2011), die Leukämie (Bekeschus et al., 2017), der Dickdarmkrebs (Plewa et al., 2014) und das OC (Utsumi et al., 2013). Die Behandlung mit NIPP hat nach aktuellem Stand der Forschung keine gesundheitlichen Risiken, es wurde keine Genotoxizität nachgewiesen. Aufgrund der guten Ergebnisse und der fehlenden Risiken durch die Behandlung wird NIPP vermutlich in der Onkologie und bei anderen Krankheitsbildern in der Zukunft an Wichtigkeit zunehmen (Jantschek, 2022).

In der Literatur finden sich unterschiedliche Bezeichnungen der Plasmen. Neben dem hier verwendeten Begriff „Nicht invasives physikalisches Plasma“ (NIPP), gibt es Bezeichnungen wie „Cold Atmospheric Plasma“ (CAP), „Nicht thermisches physikalisches Plasma“ (NTPP) und „Tissue-Tolerable Plasma“ (TTP) (Jantschek, 2022).

1.7 Zielsetzung

Noch immer ist die Prognose des OC schlecht. Das hat vielfältige Gründe, wie das Fehlen von effektiven Screeningverfahren oder die häufigen Resistenzen gegenüber den Chemotherapeutika und PARP-Inhibitoren. Aus diesem Grund wird vermehrt nach anderen Behandlungswegen oder Optionen, die Resistenzen zu verhindern, geforscht.

Eine dieser potentiellen Alternativen ist NIPP. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob NIPP eine Alternative oder Ergänzung zur aktuellen Behandlung des OC ist. Aufgrund von vielversprechenden antionkogenen Wirkungen von NIPP scheint diese Annahme berechtigt. Es gibt Daten, welche zeigen, dass NIPP in der Lage ist, Chemotherapieresistenzen wieder aufzuheben und Tumore so therapiesensibel zu machen. Sollte sich zeigen, dass NIPP in der Lage ist das OC effektiv zu inhibieren, dann könnte das die Therapie des OC revolutionieren. Ebenfalls untersucht wurden verschiedene PARP-Inhibitoren. Diese Medikamente haben in den letzten Jahren in vielen Studien gute Ergebnisse gezeigt und sind mittlerweile in der Therapie des OC etabliert.

Als Hypothese wurde postuliert, dass die Kombination aus NIPP und PARP-Inhibitoren eine stärkere tumorinhibierende Wirkung auf Ovarialtumorzellen hat als eine singuläre Behandlung. Die Wirkung der singulären Behandlung mit entweder NIPP oder PARP-Inhibitoren wurde als grundlegende Überlegung angenommen. Diese Wirkung konnte in der Literatur bereits vielfach nachgewiesen werden z.B. (Hoffmann et al., 2013; Kramer et al., 2015), (Weltmann und Woedtke, 2017) oder (Ruckhäberle und Fehm, 2022).

Ziel dieser Arbeit war es, zu prüfen, ob die Kombination aus PARP-Inhibitoren und NIPP das Outcome verbessern kann. Dazu wurden die Zelllinien OVCAR3 und Skov3 mit PARP-Inhibitoren, NIPP und einer Kombination aus beidem behandelt. Auf diese Weise wurden diese verschiedenen Wirkmechanismen auf die Tumorzellen untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tab. 1: Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät/Verbrauchsmaterial	Hersteller
15ml Röhrchen	Corning Science Mexico (Reynosa, Mexiko)
50ml Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Absaugvorrichtung Integra Vacusafe	Integra Biosciences (Zizers, Schweiz)
CASY Model TT – Cell counter and Analyzer	OLS Omini Life Science (Bremen, Deutschland)
Gewebekulturflasche 75 cm ²	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Gewebekulturflasche 25cm ²	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Glaspasteurpipette	VWR International (Darmstadt, Deutschland)
Inkubator Heracell 240	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Inkubator MCO-170 AICD-PE	PHCbi (AZ Etten-Leur, Niederlande)
Lab Thermometer IP65 LT-101	TFA Dostmann (Wertheim, Deutschland)
Mikroskop AE31E	Motic (Wetzlar, Deutschland)
pH-Meter FiveEasy TM FE20	Mettler-Toledo (Schwerzenbach, Schweiz)
PHcbi Freezer -80°C	PHC Europe B.V. (Breda, Niederlande)
Pipettensatz, 0,5-1000 µl	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Pipettierhilfe accu-jet [®] pro	Brand (Wertheim, Deutschland)
Plasmajet kINPen [®] MED	neoplas med (Greifswald, Deutschland)
Präzisionswaage Kern EMB	KERN & Sohn (Bahlingen-Frommern, Deutschland)
Reagiergefäß 0,5ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Reagiergefäß 1,5ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Reagiergefäß 2,0ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Serologische Pipette 5ml, 10ml, 25ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Sterilbank HERA safe	Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland)
Sterilbank safe 2020	Thermo Fischer Scientific (Massachusetts, USA)
Thermometer	Amarell (Kreuzwerthheim, Deutschland)

Vortex Mixer RS-VA10	Phoenix Instrument (Garbsen, Deutschland)
Wasserbad	Memmert (Büchenbach, Deutschland)
Zellkulturplatte CELL + 6 well	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Zellkulturplatte CELL + 24 well	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Zentrifuge 5804R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

2.1.2 Chemikalien und kommerzielle Lösungen

Tab. 2: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Isopropanol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Niraparib	SelleckChem (Houston, USA)
Olaparib	SelleckChem (Houston, USA)
Rucaparib	SelleckChem (Houston, USA)

Tab. 3: Kommerzielle Lösungen

Kommerzielle Lösung	Hersteller
CASYblue	OLS Omini Life Science (Bremen, Deutschland)
CASYclean	OLS Omini Life Science (Bremen, Deutschland)
CASYton	OLS Omini Life Science (Bremen, Deutschland)

2.1.3 Zelllinien

Tab. 4: Zelllinien

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

2.1.4 Zellkultur: Medien und Zusätze

Tab. 5: Zellkultur: Medien und Zusätze

Produkt	Hersteller
DMEM/F12	PAN Biotech (Aidenbach, Deutschland)
DMSO	Appllichem (Darmstadt, Deutschland)
DPBS	PAN Biotech (Aidenbach, Deutschland)
Fetales Bovines Serum FBS	PAN Biotech (Aidenbach, Deutschland)
Gentamycin	PAN Biotech (Aidenbach, Deutschland)
RPMI 1640	PAN Biotech (Aidenbach, Deutschland)
Trypsin 10x	PAN Biotech (Aidenbach, Deutschland)
Trypsin 1x	5ml 10x-Trypsin, 45ml DPBS

Tab. 6: Zelllinie

Zelllinie	Medium und Zusätze
OVCAR-3	RPMI 1640, 10% FBS, 0,12% Gentamycin, 0,1% Insulin
SK-OV-3	DMEM/F12, 25ml FBS, 620µl Gentamycin

2.1.5 Software und genutzte Programme

Tab. 7: Software und genutzte Programme

Software	Hersteller
EndNote	Alfasoft GmbH (Frankfurt a.M., Deutschland)
FLIR Tools®Mobile	Teledyne FLIR LLC (Wilsonville, OR, USA)
Microsoft Excel 2019	Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA)
Microsoft Powerpoint 2019	Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA)
Microsoft Word 2019	Microsoft Coporation (Redmond, WA, USA)
GraphPad PRISM	GraphPad Software (San Diego, CA, USA)
Samsung Galaxy A53 5G	Samsung Electronics Co. Ltd. (Suwon, Südkorea)

2.2 Methoden

2.2.1 Zelllinien

Für die Versuche standen die Zelllinien OVCAR-3 sowie SK-OV-3 (beide CLS Cell Lines Service, Eppelheim, Deutschland) zur Verfügung.

2.2.2 Zellbiologische Methoden: Kryokonservierung und Auftauen der Zellen

Um eine dauerhafte Haltbarkeit von Zellen zu gewährleisten, wurden diese möglichst schonend eingefroren und dann in flüssigem Stickstoff gelagert. Die adhärenen Zellen wurden mittels 2ml Trypsin und darauffolgender 5-minütiger Inkubation bei 37°C vom Flaschenboden gelöst. Danach wurden 4ml frisches Zellmedium hinzugegeben. Mit dessen Hilfe wurden die Zellen vom Flaschenboden gelöst. Die nun entstandene Suspensionslösung wurde dann vollständig in ein Zentrifugenröhrchen (15ml) umgefüllt. Dieses wurde, mit entsprechendem Gegengewicht, bei 21°C, 300 x g für 3min zentrifugiert, um Medium und Zellbestandteile voneinander zu trennen. Das entstandene Zellsediment wurde nun in 2ml kaltgestelltem Einfriermedium resuspendiert. Dieses setzte sich aus dem Kulturmedium und 10% DMSO zusammen. Danach wurde die Suspension in je 1ml pro Kryovial aufgeteilt. Diese wurden in, mit Isopropanol aufgefüllte, Behälter gefüllt und bei -80°C für 24h tiefgefroren. Die langfristige Lagerung der Zellen erfolgt bei -140°C bis -160°C im Tank mit flüssigem Stickstoff.

Bevor man mit dem Auftauen der Zellen beginnen konnte, musste sichergestellt werden, dass das Wasserbad auf 37°C vorgeheizt war. Für jede Kryokonservierung wurde 10ml zelllinienspezifisches Medium in 15ml Röhrchen gegeben und ebenfalls auf 37°C vorgeheizt. Die Kryokonserven wurden aus dem Flüssigstickstofftank geholt und für 30s im Wasserbad erwärmt. Anschließend wurde der komplette Inhalt durch Pipettieren mit dem aufgewärmten Medium aufgetaut. Als der gesamte Inhalt aufgetaut war, wurde er vollständig ins das Röhrchen übertragen und entsprechend der Zelllinien zentrifugiert. Der Inhalt wurde in eine 75cm² Zellkulturflasche gegeben und mit frischem Medium aufgefüllt.

Die spätere Inkubation erfolgte dann bei 37°C in einem Inkubator, 5% Sauerstoff und gesättigter Luftfeuchtigkeit.

2.2.3 Kultivierung und Normalpassage der Zellen

Um Kontaminationen zu vermeiden fand die Kultivierung unter sterilen Bedingungen statt. Das Passagieren von Zellen erfolgte ab einer Konfluenz von 80 - 90%. Die Konfluenz wurde zuvor lichtmikroskopisch abgeschätzt. Zunächst wurde das Zellmedium abgesaugt und in den 75cm² großen Zellkulturflaschen mit 10ml PBS gereinigt. Dieser Vorgang diente dazu, nicht adhärente Zellen zu entfernen. Adhärente Zellen hingegen wurden mit Hilfe von 2ml 1x Trypsin und darauffolgender 5-minütiger Inkubation bei 37°C vom Flaschenboden gelöst. Danach wurden 4ml frisches Zellmedium in die Flasche hinzugegeben. Mit dessen Hilfe wurden die Zellen vom Flaschenboden abgelöst. Die nun entstandene Suspensionslösung wurde jetzt vollständig in ein Zentrifugenröhrchen (15ml) umgefüllt. Dieses wurde, mit entsprechendem Gegengewicht, bei 21°C, 300 x g für 3min zentrifugiert um Medium und Zellbestandteile voneinander zu trennen. Das Zellmedium wurde abgesaugt, während die Zellen im Zentrifugenröhrchen zurückblieben. Das übriggebliebene Zellsediment wurde mit 1ml Medium resuspendiert bis die homogene Verteilung der Zellbestandteile gewährleistet war. Im nächsten Schritt wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:2, 1:5 oder 1:10 verdünnt und in T75 Flaschen umgesetzt. Diese waren zuvor bereits mit 10ml frischem Medium vorbereitet worden. Welche Konzentration gewählt wurde, hing von den Zelllinien, dem Bedarf der folgenden Tage und des erwarteten Wachstums ab. Die fertigen T75 Flaschen wurden nun im Inkubator verstaut und hier bei 37°C gelagert.

2.2.4 Aussaat und Behandlung der Zellen

Zur Aussaat wurden 24-Well-Zellkulturplatten verwendet. Es wurden Wachstumskinetiken angefertigt bei denen die Messung über 72h im Abstand von 24h stattfand. Jede Zelllinie hat unterschiedliche Wachstumsraten, weshalb zu Beginn für jede Zelllinie ein Wert pro Well bestimmt wurde, mit welchem ein exponentielles Wachstum in der vorgesehenen Zeit möglich war. Nun wurden in die einzelnen Wells der 24-Well-Zellkulturplatte 100µl

Zellsuspension gegeben. Diese wurden dann mit NIPP behandelt. Zur Behandlung mit NIPP wurde der „Kinpen Med“ (neoplas med Greifswald, Deutschland) verwendet. Je nach Fragestellung variierte die Behandlungszeit zwischen 5s und 120s. Bei anderen Fragestellungen wurden die 100µl Zellsuspension mit den PARP-Inhibitoren Niraparib, Olaparib oder Rucaparib behandelt. In diesem Fall fanden Ernte und Aussaat wie oben beschrieben statt, allerdings wurde mit der Behandlung für 24h gewartet, damit der, durch die Aussaat entstandene, Zellstress auf ein Minimum reduziert wurde. So wurden Verzerrungen der Zellsterblichkeit verringert. Die PARP-Inhibitoren wurden bei -78°C gelagert und lagen im aufgetauten Zustand flüssig vor. Zuvor wurde bereits die benötigte Konzentration des PARP-Inhibitors bestimmt und mit DMSO so verdünnt, dass die richtige Konzentration vorlag. Die benötigte Menge des PARP-Inhibitors wurde nun, in 1ml Zellmedium verdünnt, auf die Zellen gegeben. In diesen Fällen wurde auch die Kontrolle mit DMSO behandelt, um differenzieren zu können, was der Grund für das Absterben der Zellen gewesen ist. Dadurch wurden Messfehler minimiert. Sollte die Kombination aus NIPP und PARP-Inhibitoren überprüft werden, so wurden die Zellen in einem Well den beiden, oben beschriebenen Behandlungen, ausgesetzt. Im Anschluss daran wurden die Wells mit je 900µl Zellmedium aufgefüllt und so eine Menge von 1ml pro Well erreicht. Die 24-Well-Zellkulturplatte wurde bei 37°C gelagert. Nach der Behandlung wurde die Ernte im Abstand von 24h und nach 72h durchgeführt. Nach 72h war der Vorgang beendet.

2.2.5 Bestimmung der Zellzahl

Um Kontamination zu vermeiden, fand die Ernte unter sterilen Bedingungen statt. Zu Beginn der Ernte wurden die, bei 37°C gelagerten, 75cm² großen Zellkulturflaschen lichtmikroskopisch untersucht. Bei einer Konfluenz von 80 - 90% konnte eine Aussaat durchgeführt werden. Das Zellkulturmedium wurde abgesaugt und die Flasche mit 10ml PBS gereinigt. Dieser Vorgang diente der Entfernung von nicht adhären Zellen. Wenn sichergestellt war, dass das PBS den gesamten Zellboden bedeckt hatte, wurde dieses wieder abgesaugt. Adhären Zellen hingegen wurden mit Hilfe von 2ml 1x Trypsin und darauffolgender 5-minütiger Inkubation bei 37°C vom Flaschenboden gelöst. Danach wurden 4ml frisches Zellmedium in die Flasche hinzugegeben. Mit dessen Hilfe wurden die Zellen endgültig vom Flaschenboden abgelöst. Die nun entstandene

Suspensionslösung wurde jetzt vollständig in ein Zentrifugenröhrchen (15ml) umgefüllt. Dieses wurde, mit entsprechendem Gegengewicht, bei 21°C, 300 x g für 3min zentrifugiert um Medium und Zentrifugenröhrchen voneinander zu trennen. Das Zellmedium wurde abgesaugt, während die Zellen im zurückblieben. Das übriggebliebene Zellsediment wurde mit 1ml Medium resuspendiert bis die Zellbestandteile homogen verteilt waren. Anschließend wurden 50µl des Zellsediment-Medium Gemisches in kleine Reaktionsgefäße abgefüllt, welche bei der Zählung der Zellzahl verwendet wurden. Die restlichen Zellen wurden wieder bei 37°C im Inkubator gelagert. In der Folge wurden die 50µl Zellsuspension in 10ml CASYton Lösung so vermischt, dass sie homogen verteilt waren. Dazu wurde das Gemisch vorsichtig dreimal geschüttelt. Mithilfe des CASY Cell counter and analyzer (OLS Omini Life Science, Bremen, Deutschland) wurde die Zellzahl bestimmt. Das Gerät wurde zuvor für die entsprechenden Zelllinien kalibriert. Die Messung bezieht sich in diesem Fall ausschließlich auf vitale Zellen. Anhand der vorhandenen Zellzahl wurde ein Mischverhältnis berechnet, welches gewährleistete, dass bei der Aussaat immer 3×10^4 Zellen in jeder Probe enthalten waren. Diese Zahl hatte sich bei vorhergehenden Versuchen als die optimale Zellzahl für die Zelllinien Skov-3 und OVCAR erwiesen. Zur endgültigen Aussaat wurden die, zwischenzeitlich im Inkubator gelagerten, Zellen verwendet.

2.3 pH Bestimmung nach NIPP Behandlung

Die Bestimmung des pH-Wertes fand unter sterilen Bedingungen an der Zellbank statt, um mögliche Verunreinigungen und Verfälschungen der Ergebnisse zu reduzieren. Zur Bestimmung des pH-Wertes wurde zunächst der pH-Meter kalibriert. Es wurden die Werte 4, 7 und 10 eingestellt. Auf diese Weise war das Gerät auf saure, pH neutrale und basische Werte eingestellt. Nach abgeschlossener Kalibrierung wurden jeweils 5ml der Medien Skov-3 bzw. OVCAR in Zentrifugenröhrchen gegeben. Diese waren, abgesehen von der Kontrolle, zuvor bereits für 5s, 30s und 60s mit NIPP behandelt worden. Zur Behandlung mit NIPP wurde der „Kinpen Med“ (neoplas med Greifswald, Deutschland) verwendet. Anschließend wurde der pH-Meter in das Medium getaucht und zeigte nach kurzer Zeit den entsprechenden pH-Wert. Nach jedem Eintauchen wurde der pH-Meter mit destilliertem Wasser gereinigt um das Kontaminationsrisiko zu minimieren. Dieser

Versuch wurde bei Raumtemperatur (21°C) und bei einer Temperatur von 37°C durchgeführt. Bei der Temperatur von 37°C wurde das Medium zunächst im Wasserbad auf eine entsprechende Temperatur erwärmt. Es wurden 6 unabhängige Proben betrachtet.

2.4 Temperaturbestimmung nach NIPP Behandlung

Bei der Temperaturbestimmung wurden 500µl des Skov-3 bzw. OVCAR Mediums in einzelne Wells einer 24-Well-Platte ausgesät. Zuerst wurde die Temperatur in unbehandeltem Zustand gemessen und so eine Kontrolle festgestellt. Danach folgte die Behandlung mit NIPP für 10s, 30s, 60s und 120s. Zur Behandlung mit NIPP wurde der „Kinpen Med“ (neoplas med, Greifswald, Deutschland) verwendet. Hierfür wurde die Temperatur wurde sowohl an der Oberfläche, als auch im eingetauchten Zustand gemessen. Die oberflächliche Messung wurde mithilfe der FLIR-App (Teledyne FLIR LLC Wilsonsville, USA) durchgeführt. Diese war mit einem Android Mobiltelefon (Samsung Electronics Co. Ltd. Suwon, Südkorea) verknüpft, auf dem die Temperatur angezeigt wurde und wobei die Möglichkeit bestand eine Infrarot-assistierte Aufnahme zu machen. Hierzu wurde das Gerät ruhig unmittelbar über das Medium gehalten und dann eine Aufnahme gemacht. Die FLIR-App (Teledyne FLIR LLC, Wilsonsville, USA) war in der Lage die Temperatur des Fotografierten zu messen. Auf diese Weise war eine oberflächliche Messung gewährleistet. Bei der eingetauchten Messung wurde ein herkömmliches Thermometer verwendet, welches in das Medium eingetaucht wurde. Wenn der Fühler vollständig unter der Oberfläche des Mediums lag, wurde die Temperatur gemessen. Es wurden insgesamt fünf unabhängige Proben betrachtet.

2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung fand mithilfe vom GraphPad (PRSIM GraphPad Software, San Diego, USA) statt. Alle angegebenen Werte sind als Mittelwerte (*MW*) ± Standardabweichung (*SD*) zu interpretieren, welche in Bezug auf die Kontrolle (=1,0) normiert wurden. Es wurden bei jedem Experiment mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt.

Zur Interpretation der Werte wurde der Student's t-Test genutzt. Die Signifikanzen wurden dabei wie folgt definiert: $p < 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***). Im Student's t-Test wurden in dieser Arbeit die Unterschiede zwischen den Mittelwerten zweier unabhängiger Gruppen untersucht. Dabei wurden die p -Werte bestimmt, um zu überprüfen, ob die Unterschiede der zu untersuchenden Gruppen, signifikant sind, oder nicht. Zur Bestimmung des Student's t-Tests wurde die folgende Formel verwendet: $\frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$. Dabei

steht jeweils \bar{X}_1 für den Mittelwert der untersuchten Kontrolle und \bar{X}_2 für den Mittelwert der untersuchten Behandlung. s_1^2 beziehungsweise s_2^2 beschreiben die Varianz einer Gruppe, n_1 und n_2 beschreiben die Größe einer Stichprobe. Es wurde die Student's t-Test Formel für unabhängige Stichproben verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung geeigneter Kultivierungsbedingungen

Zur Ermittlung geeigneter NIPP Behandlungszeiten sowie Konzentrationen der verschiedenen PARP-Inhibitoren wurden 3×10^4 Zellen ausgesät. Diese Zellzahl gewährleistete, dass den Zelllinien ein exponentielles Wachstum bei ausreichend Fläche zur Verfügung stand. Die Zellen wurden 72h inkubiert. Die Zählung fand mithilfe des CASY Cell Counter and Analyzer (OLS Omini Life Science, Bremen, Deutschland) zu den angegebenen Zeitpunkten statt. Als unbehandelte Kontrolle wurde den Zellen das Lösungsmittel DMSO hinzugegeben.

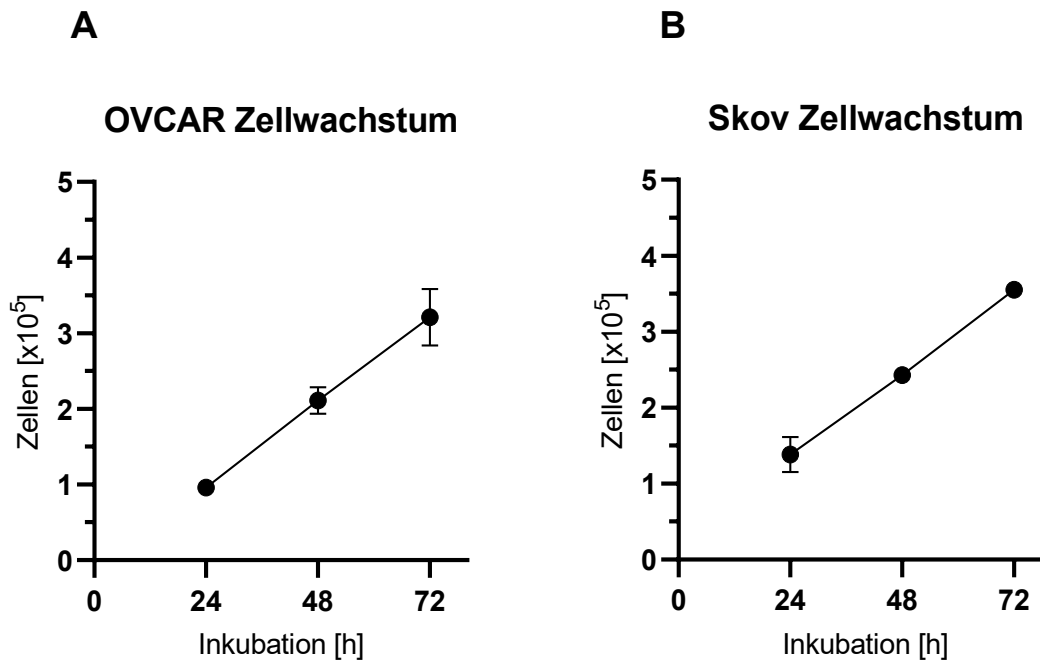


Abb. 1: Wachstumskinetik von OVCAR und Skov Zellen.

Die Zelllinien OVCAR (A) und Skov (B) wurden mit 3×10^4 Zellen ausgesät. Dargestellt sind Mittelwert \pm SD. Es wurden vier unabhängige Versuche durchgeführt. Die Zellen wurden über 72h inkubiert und zu den angegebenen Zeitpunkten wurde mithilfe des CASY Cell Counter and Analyzer die Anzahl lebender Zellen bestimmt.

Die Behandlung der OVCAR und Skov Zellen mit NIPP (**Abb. 2**) zeigte einen zeitabhängigen wachstumsinhibierenden Effekt. Zur Bestimmung der IC_{50} und der IC_{20} wurden bei den Zelllinien verschiedene Behandlungszeiten getestet. Als

Behandlungszeiten wurden 5s, 10s, 20s, 30s und 40s verwendet. Die IC_{50} beschreibt in der Pharmakologie die halbmaximale Wirkung. Es sind also, verglichen mit der Kontrolle, nur noch 50% der ursprünglichen Zellen vorhanden. Entsprechend sind bei der IC_{20} nur noch 80% der ursprünglichen Zellen vorhanden. Hier beträgt die Wirkung 20% des Maximums. Bei den OVCAR Zellen (**Abb. 2A**) zeigte sich eine hohe Sensitivität für NIPP ab einer Behandlungszeit von 20s (72h: $1,2 \times 10^5 \pm 4,3 \times 10^4$, $p = 0,004$). Hier zeigte sich eine signifikante wachstumsinhibierende Wirkung nach 72h. Eine Behandlungszeit von 5s (72h: $3,7 \times 10^5 \pm 1,5 \times 10^4$, $p = 0,688$) und 10s (72h: $2,5 \times 10^5 \pm 5,8 \times 10^4$, $p = 0,062$) konnte hingegen keine signifikant wachstumsinhibierende Wirkung nach 72h erzielen. Bei den längeren Behandlungszeiten war eine nahezu vollständige Hemmung des Zellwachstums zu beobachten. Es zeigten sich signifikante Unterschiede, wenn die Behandlungszeit 30s (72h: $9,1 \times 10^4 \pm 6,7 \times 10^3$, $p = 0,001$) oder 40s (72h: $7,4 \times 10^4 \pm 7,7 \times 10^3$, $p = 0,001$) betragen.

Skov Zellen (**Abb. 2B**) wiesen eine geringere Sensitivität für NIPP auf. Es zeigte sich, dass bei einer Behandlungszeit von 5s (72h: $3,4 \times 10^5 \pm 1,2 \times 10^4$, $p = 0,717$) keine wachstumsinhibierende Wirkung eintritt. Die Sensitivität war jedoch im Vergleich zu OVCAR Zellen geringer. Bei den Wachstumskinetiken mit einer Behandlungszeit von 20s (72h: $2,1 \times 10^5 \pm 2,5 \times 10^4$, $p = 0,012$), 30s (72h: $2,0 \times 10^5 \pm 2,9 \times 10^4$, $p = 0,007$) oder 40s (72h: $2,3 \times 10^5 \pm 2,7 \times 10^4$, $p = 0,020$) zeigte sich ein Wachstum, welches allerdings durch die Behandlung mit NIPP inhibiert wurde und nicht die gleichen Werte wie die Kontrolle erreichte. Ab einer Behandlungszeit von 20s ließen sich nur noch sehr geringe Unterschiede der verschiedenen Behandlungszeiten von 20s, 30s und 40s feststellen. Alle p -Werte wurden, um eine flüssigere Lesbarkeit zu gewährleisten, auf drei Nachkommastellen gerundet.

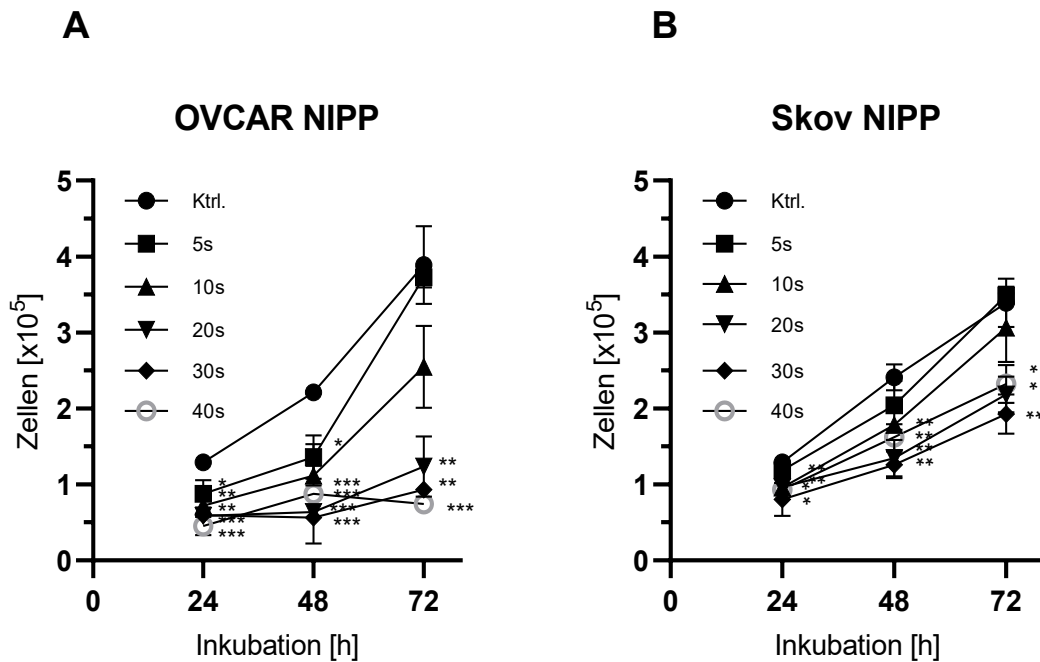


Abb. 2: Wachstumskinetik von OVCAR und Skov Zellen unter Einfluss von NIPP.

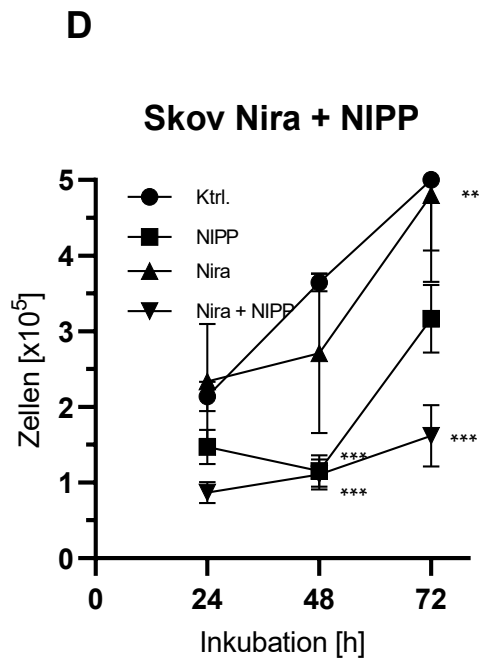
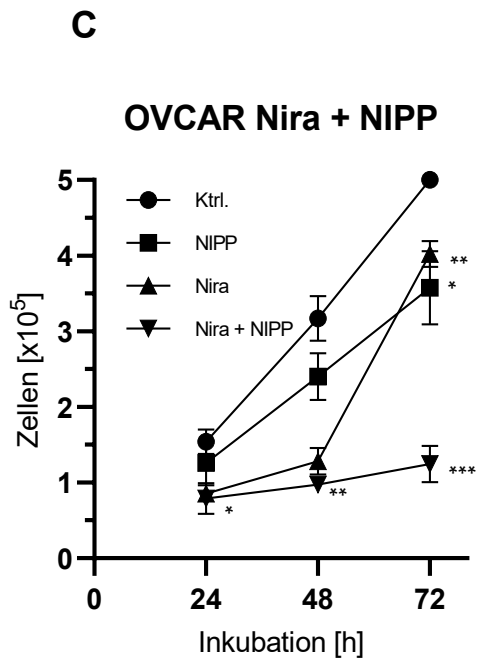
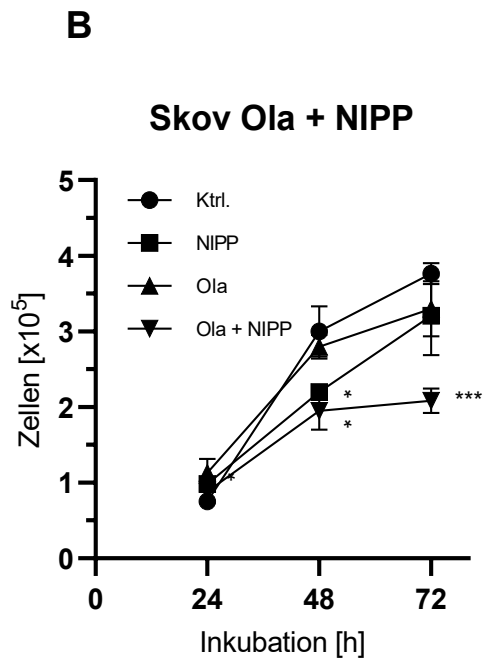
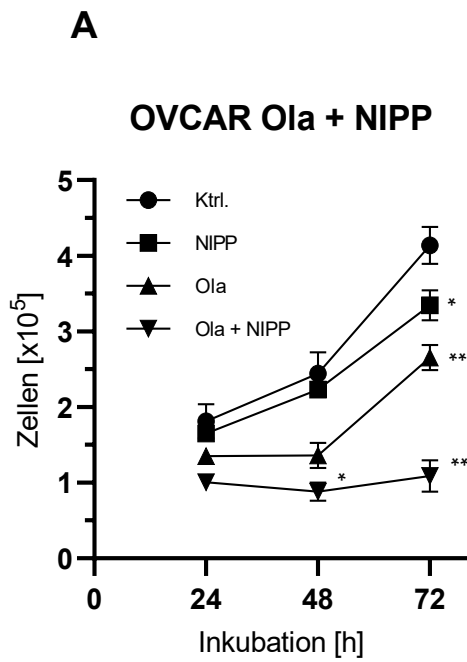
Die Zelllinien OVCAR (A) und Skov (B) wurden mit 3×10^4 Zellen ausgesät. Sie wurden unterschiedlich lange mit NIPP behandelt. Dargestellt sind Mittelwert \pm SD. Alle Versuche wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p < 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) sowie $p \leq 0,001$ (***). Um eine Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt. Die Zellen wurden über 72h inkubiert und zu den angegebenen Zeitpunkten wurde mithilfe des CASY Cell Counter and Analyzer die Anzahl lebender Zellen bestimmt.

Die Behandlung der OVCAR und Skov Zellen mit NIPP und PARP-Inhibitoren zeigte einen zeitabhängigen wachstumsinhibierenden Effekt. Als PARP-Inhibitoren wurden Olaparib (Ola), Niraparib (Nira) und Rucaparib (Ruca) eingesetzt. Die eingesetzten Endkonzentrationen für beide Zelllinien waren bereits in der Arbeitsgruppe etabliert.

Bei OVCAR Zellen (**Abb. 3**) wurde, unabhängig vom PARP-Inhibitor, für 10s (72h: $3,5 \times 10^5 \pm 5,3 \times 10^4$, $p = 0,034$) mit NIPP behandelt. Damit zeigte sich eine signifikante Wirkung. Bei OVCAR Zellen wurde eine Konzentration von $1,0 \mu\text{M}$ Ola eingesetzt (72h: $1,6 \times 10^5 \pm 1,9 \times 10^4$, $p = 0,013$). Wenn die Zellen mit der Kombination von Ola und NIPP behandelt wurden, war nach 72h eine nahezu vollständige Inhibition des Zellwachstums zu beobachten (72h: $1,0 \times 10^5 \pm 2,4 \times 10^4$, $p = 0,011$) (**Abb. 3A**). Nira wurde in einer Konzentration von $1,0 \mu\text{M}$ eingesetzt. Es zeigte sich sowohl bei der NIPP (72h: $3,5 \times 10^5 \pm 5,3 \times 10^4$, $p = 0,034$), als auch bei der Nira (72h: $4,0 \times 10^5 \pm 1,8 \times 10^4$, $p = 0,005$) Behandlung nach 72h ein signifikanter wachstumsinhibierender Effekt. Wenn man die beiden

Behandlungsmethoden kombinierte, wurde der wachstumsinhibierende Effekt nochmals deutlich verstärkt (72h: $1,2 \times 10^5 \pm 2,6 \times 10^4$, $p < 0,001$). Die gewählte Konzentration von Ruca betrug $0,5 \mu\text{M}$. Es zeigte sich ein wachstumsinhibierender Effekt bei der Behandlung mit NIPP (72h: $2,9 \times 10^5 \pm 4,9 \times 10^4$, $p = 0,099$) und dem PARP-Inhibitor (72h: $3,3 \times 10^5 \pm 3,7 \times 10^4$, $p = 0,183$), welche aber beide nicht statistisch signifikant waren. Als man den PARP-Inhibitor und NIPP kombinierte, zeigte sich aber bereits nach 48h (48h: $1,0 \times 10^5 \pm 2,5 \times 10^4$, $p = 0,026$) ein wachstumsinhibierender Effekt. Dieser wurde nach 72h (72h: $1,6 \times 10^5 \pm 2,1 \times 10^4$, $p = 0,001$) noch deutlicher.

Bei Skov Zellen (**Abb. 3**) zeigte sich ebenfalls ein wachstumsinhibierender Effekt. Dieser war allerdings weniger stark ausgeprägt. Bei der Behandlung mit $5,0 \mu\text{M}$ Ola (72h: $3,2 \times 10^5 \pm 4,0 \times 10^4$, $p = 0,167$) und für 5s mit NIPP (72h: $3,2 \times 10^5 \pm 5,6 \times 10^4$, $p = 0,217$) zeigten sich wachstumsinhibierende Effekte, welche statistisch nicht signifikant waren. Kombinierte man diese beiden Parameter, so konnte nach 48h nur ein minimaler Unterschied zwischen der Behandlung mit NIPP (48h: $2,1 \times 10^5 \pm 2,6 \times 10^3$, $p = 0,027$) und der Kombinationstherapie (48h: $1,9 \times 10^5 \pm 2,7 \times 10^4$, $p = 0,023$) nachgewiesen werden. Nach 72h wurde bei der Kombination näherungsweise ein IC_{50} erreicht (72h: $2,0 \times 10^5 \pm 1,7 \times 10^4$, $p < 0,001$). Bei der Behandlung mit $0,3 \mu\text{M}$ Nira (72h: $6,1 \times 10^5 \pm 8,0 \times 10^4$, $p = 0,002$) und für 20s mit NIPP (72h: $3,1 \times 10^5 \pm 4,8 \times 10^4$, $p = 0,022$), zeigte sich ein wachstumsinhibierender Effekt. Die singuläre Behandlung mit Nira (72h: $6,1 \times 10^5 \pm 8,0 \times 10^4$, $p = 0,002$) zeigte, im Vergleich zur Kontrolle, nur eine geringe Wirkung. Die singuläre Behandlung mit NIPP für 20s (72h: $3,1 \times 10^5 \pm 4,8 \times 10^4$, $p = 0,022$) zeigte bereits eine signifikante Wirkung. Bei der Kombination aus NIPP und Nira (72h: $1,6 \times 10^5 \pm 4,4 \times 10^4$, $p < 0,001$) war die Zellproliferation stark gehemmt und es konnte kaum Wachstum beobachtet werden. Bei der Behandlung der Skov Zellen mit $1,0 \mu\text{M}$ Ruca (72h: $4,0 \times 10^5 \pm 9,2 \times 10^3$, $p = 0,009$) und für 5s mit NIPP (72h: $3,3 \times 10^5 \pm 9,4 \times 10^4$, $p = 0,785$) konnte keine signifikante inhibitorische Wirkung nachgewiesen werden. Die Kinetik der Kontrolle und der NIPP-Behandlung verliefen nahezu identisch. Auch die Behandlung mit Ruca konnte nur minimale inhibitorische Wirkungen erzielen (72h: $4,0 \times 10^5 \pm 9,2 \times 10^3$, $p = 0,009$). Das gleiche galt auch für die Kombination beider Noxen (72h: $4,1 \times 10^5 \pm 3,1 \times 10^4$, $p = 0,051$). Diese zeigt eine nahezu identische Kinetik auf, wie die singuläre Ruca Behandlung. Alle p -Werte wurden, um eine flüssigere Lesbarkeit zu gewährleisten, auf drei Nachkommastellen gerundet.



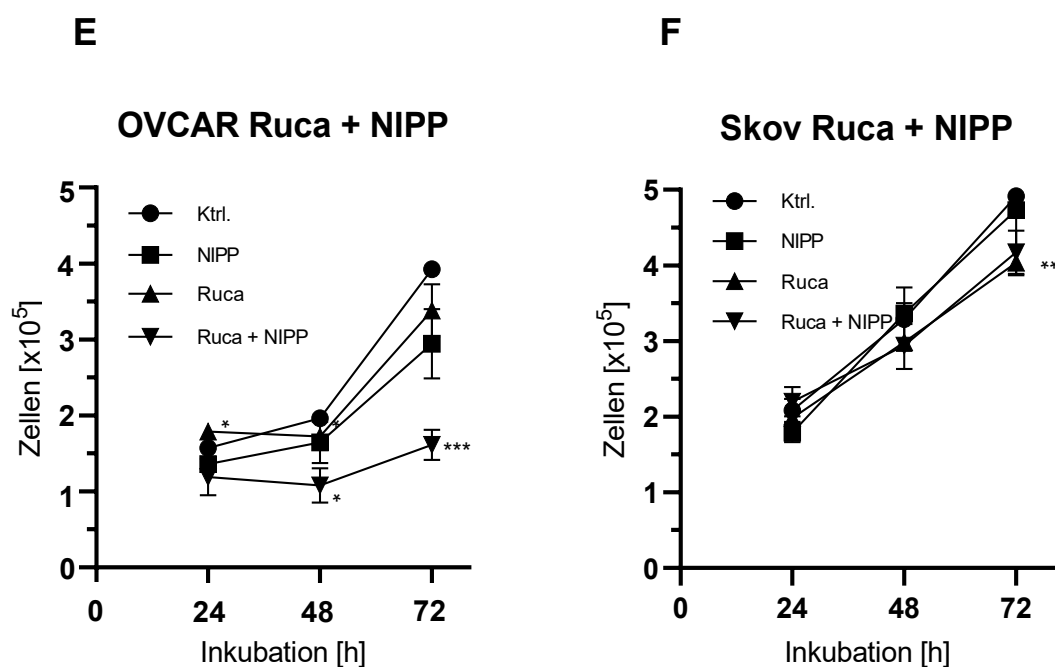


Abb. 3: Wachstumskinetik von OVCAR und Skov Zellen unter Einfluss von NIPP und PARP-Inhibitoren.

OVCAR (A, C, E) und Skov (B, D, F) Zellen wurden mit 3×10^4 Zellen ausgesät. Die Zellkulturmedien wurden mit unterschiedlichen PARP-Inhibitoren behandelt. Bei der Behandlung mit Ola (A+B) wurden bei den OVCAR Zellen $1,0 \mu\text{M}$ und bei den Skov Zellen $5,0 \mu\text{M}$ als Konzentration gewählt. Bei der Behandlung mit Niraparib (C+D) wurde in beiden Zelllinien $0,3 \mu\text{M}$ als Konzentration gewählt. Bei der Behandlung mit Rucaparib (E+F) wurden bei den OVCAR Zellen $0,5 \mu\text{M}$ und bei Skov Zellen $1,0 \mu\text{M}$ als Konzentration gewählt. Alle Ansätze wurden auch mit NIPP behandelt. Die Behandlungszeit bei den OVCAR Zellen betrug 10s (A, C, E). Die Behandlungszeit der Skov Zellen betrug bei Olaparib und Rucaparib 5s (B, F) und bei Niraparib 20s (D). Dargestellt sind Mittelwert \pm SD. Alle Versuche wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p < 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) sowie $p \leq 0,001$ (***). Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt. Die Zellen wurden über 72h inkubiert und zu den angegebenen Zeitpunkten wurde mithilfe des CASY Cell Counter and Analyzer die Anzahl lebender Zellen bestimmt.

3.2 Abhängigkeit von pH und Temperatur von der NIPP Behandlung

Die Bestimmung von pH und Temperatur wurden durchgeführt, da dies potentielle Faktoren sind, die biomedizinische Effekte haben könnten. Es sollte ausgeschlossen werden, dass Änderungen dieser Parameter Einfluss auf die Ergebnisse haben. Hierfür wurden Zellkulturmedien von OVCAR und Skov Zellen verwendet. Es wurden 500ml des Mediums für einen Versuch eingesetzt und dieser in sechs unabhängigen Versuchen wiederholt. Das Zellkulturmedium, in welchem OVCAR Zellen kultiviert werden, besteht

aus 500ml RPMI-1640, 50ml FBS, 620µl Gentamycin und 600µl Insulin. Beim OVCAR-Zellkulturmedium zeigte sich, unbehandelt und bei Raumtemperatur, ein alkalischer pH-Wert von 8,33 im Mittel. War das Medium unbehandelt, aber erwärmt, lag ein alkalischer pH-Wert von 8,32 im Mittel vor. Das Zellkulturmedium wurde bei Temperaturen von 22°C und 37°C untersucht. Die Behandlungszeiten mit NIPP betragen 5s (22°C: $8,37 \pm 0,03$, $p = 0,698$; 37°C: $8,36 \pm 0,02$, $p = 0,198$), 30s (22°C: $8,46 \pm 0,04$, $p = 0,054$; 37°C: $8,41 \pm 0,03$, $p = 0,087$) und 60s (22°C: $8,52 \pm 0,04$, $p = 0,051$; 37°C: $8,45 \pm 0,03$, $p = 0,098$). Außerdem wurde eine unbehandelte Kontrolle untersucht. Es konnten weder in Bezug auf die beiden Temperaturen noch bei unterschiedlichen Behandlungszeiten signifikante Unterschiede nachgewiesen werden. Alle Werte lagen im pH Bereich zwischen 8,27 und 8,58 (**Abb. 4A**). Das Skov Zellkulturmedium besteht aus 500ml DMEM, 50ml FBS und 620µl Gentamycin. Bei diesem Zellkulturmedium zeigte sich, unbehandelt und bei Raumtemperatur, ein alkalischer pH-Wert von 8,24 im Mittel. War das Medium unbehandelt, aber erwärmt, lag ein alkalischer pH-Wert von 8,11 im Mittel vor. Wie bei der Durchführung zuvor wurde der pH bei 22°C und 37°C sowie nach 5s (22°C: $8,16 \pm 0,02$, $p = 0,520$; 37°C: $8,13 \pm 0,02$, $p = 0,385$), 30s (22°C: $8,20 \pm 0,02$, $p = 1$; 37°C: $8,17 \pm 0,029$, $p = 0,923$) und 60s (22°C: $8,24 \pm 0,03$, $p = 0,240$; 37°C: $8,21 \pm 0,04$, $p = 0,246$) NIPP Behandlung bestimmt. Es konnten weder bei den beiden unterschiedlichen Temperaturen noch in Abhängigkeit der Behandlungszeit signifikante Unterschiede nachgewiesen werden. Alle Werte lagen im pH Bereich zwischen 8,09 und 8,28 (**Abb. 4B**). Alle p -Werte wurden, um eine flüssigere Lesbarkeit zu gewährleisten, auf drei Nachkommastellen gerundet.

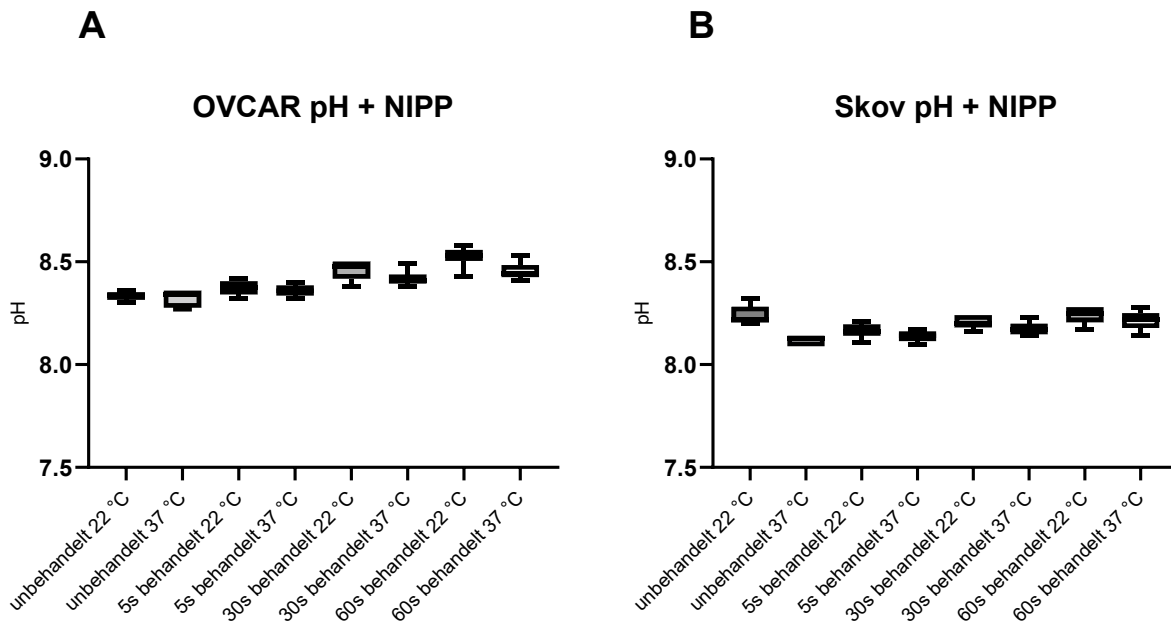


Abb. 4: pH-Wert Änderungen in Abhängigkeit von Temperatur und NIPP Behandlungszeit.

Die Zellkulturmedien von OVCAR (**A**) und Skov (**B**) Zellen wurden bei Raumtemperatur und nach Erwärmung auf 37°C mit NIPP behandelt. Es wurden jeweils 500µl Zellkulturmedium verwendet. Es wurde anhand eines pH-Meters der pH-Wert bestimmt. Alle Versuche wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p < 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) sowie $p \leq 0,001$ (***). Es wurden sechs unabhängige Versuche betrachtet.

3.3 Bestimmung der Temperatur in Abhängigkeit der NIPP Behandlungszeiten

Es sollte überprüft werden, ob die Behandlung mit NIPP einen Einfluss auf die Temperatur des Zellkulturmediums hat. Es wurden Zellkulturmedien der OVCAR und Skov Zellen verwendet. Die Temperatur wurde mithilfe eines Thermometers und mit Temperatur Fühlern mithilfe einer Infrarot-Kamera gemessen. Es wurden jeweils 500ml des Mediums für einen Versuch verwendet. Es wurden fünf unabhängige Versuche durchgeführt.

Die verschiedenen Behandlungszeiten mit NIPP betragen 10s, 30s, 60s und 120s. Außerdem wurde eine unbehandelte Kontrolle untersucht. Die Ergebnisse des Temperaturfühlers der OVCAR Zellen (**Abb. 5A**) zeigten bei der Kontrolle eine Temperatur im Bereich der Raumtemperatur (22.1°C). Bei der Behandlung mit NIPP über eine Länge von 10s sank die Temperatur auf 19,6°C (Eingetaucht 10s: $19,62 \pm 0,04$, $p < 0,001$). Wurde die Behandlung auf 30s verlängert, so sank die Temperatur auf 18,6°C (Eingetaucht 30s: $18,62 \pm 0,41$, $p < 0,001$) und bei einer weiteren Verlängerung der

Behandlung auf 60s sank die Temperatur auf 18,4°C im Mittel (Eingetaucht 60s: 18,44 ± 0,48, $p < 0,001$). Bei einer Verlängerung der Behandlung auf 120s stagnierte das Absinken der Temperatur (18,4°C) (Eingetaucht 120s: 18,4 ± 0,46, $p < 0,001$).

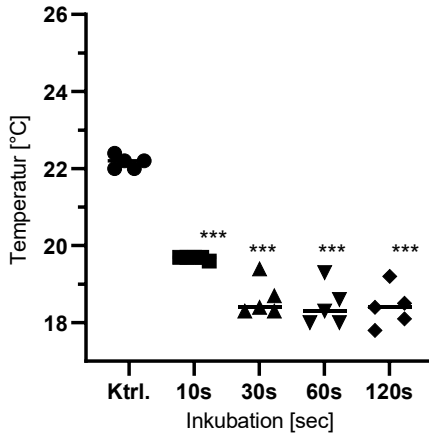
Bei der Infrarotmessung der Oberflächentemperatur von OVCAR Zellmedium (**Abb. 6A**) zeigte sich bei der Kontrolle eine Temperatur von 25,4°C. Wurde das Zellkulturmedium für 10s mit NIPP behandelt, so sank die Temperatur auf 21,2°C (Oberflächlich 10s: 21,24 ± 0,28, $p < 0,001$). Bei Behandlungen von 30s (Oberflächlich 30s: 19,7 ± 0,22, $p < 0,001$) und 60s (Oberflächlich 60s: 19,75 ± 0,29, $p < 0,001$) und 120s (Oberflächlich 120s: 19,54 ± 0,34, $p < 0,001$) konnte nochmals ein Absinken der Temperatur um etwa 1,5°C festgestellt werden. Alle Ergebnisse zeigen eine hohe Signifikanz auf.

Die verschiedenen Behandlungszeiten mit NIPP betragen 10s, 30s, 60s und 120s. Außerdem wurde eine unbehandelte Kontrolle untersucht. Die Ergebnisse des Temperaturfühlers der Skov Zellen (**Abb. 5B**) zeigten bei der Kontrolle eine Temperatur im Bereich der Raumtemperatur (21,8°C). Bei der Behandlung mit NIPP über eine Länge von 10s sank die Temperatur auf 19,5°C (Eingetaucht 10s: 19,56 ± 0,12, $p < 0,001$). Wurde die Behandlung auf 30s verlängert, so sank die Temperatur auf 18,5°C (Eingetaucht 30s: 18,54 ± 0,3, $p < 0,001$) und bei einer weiteren Verlängerung der Behandlung auf 60s sank die Temperatur auf 18,1°C (Eingetaucht 60s: 18,14 ± 0,34, $p < 0,001$). Bei einer Verlängerung der Behandlung auf 120s stieg die Temperatur leicht auf 18,2°C (Eingetaucht 10s: 18,26 ± 0,30, $p < 0,001$) an.

Bei der Infrarotmessung der Oberflächentemperatur von Skov Zellmedium (**Abb. 6B**) zeigte sich bei der Kontrolle eine Temperatur von 24,1°C. Behandelte man das Zellkulturmedium für 10s mit NIPP, so sank die Temperatur (Oberflächlich 10s: 21,18 ± 0,26, $p < 0,001$) auf 21,1°C. Bei Behandlungen von 30s (Oberflächlich 30s: 19,82 ± 0,11, $p < 0,001$) und 60s (Oberflächlich 60s: 19,78 ± 0,14, $p < 0,001$) konnte nochmals ein Absinken der Temperatur festgestellt werden. Bei einer Behandlung von 120s stieg die Temperatur auf 21,2°C (Oberflächlich 120s: 21,26 ± 0,97, $p < 0,001$). Bei der Behandlung mit NIPP über 120s ergab sich eine deutlich größere Streuung der Messwerte, als bei den anderen Behandlungszeiten. Alle Ergebnisse zeigen eine hohe Signifikanz auf. Alle p -Werte wurden, um eine flüssigere Lesbarkeit zu gewährleisten, auf drei Nachkommastellen gerundet.

A

OVCAR eingetaucht Temperatur nach NIPP



B

Skov eingetaucht Temperatur nach NIPP

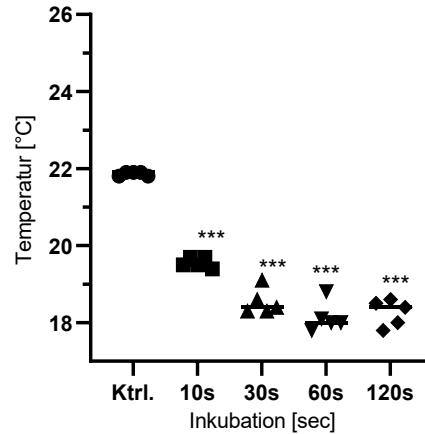


Abb. 5: Temperaturmessung des Zellkulturmediums in Abhängigkeit der NIPP Behandlungszeit.

Die Zellkulturmedien von OVCAR (A) und Skov (B) Zellen wurden unterschiedlich lange mit NIPP behandelt. Anschließend wurde die Temperatur unterhalb der Oberfläche mithilfe eines eingetauchten Thermofühlers bestimmt. Es wurden jeweils 500µl Zellkulturmedium verwendet. Alle Versuche wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p < 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) sowie $p \leq 0,001$ (***). Es wurden fünf unabhängige Proben untersucht.

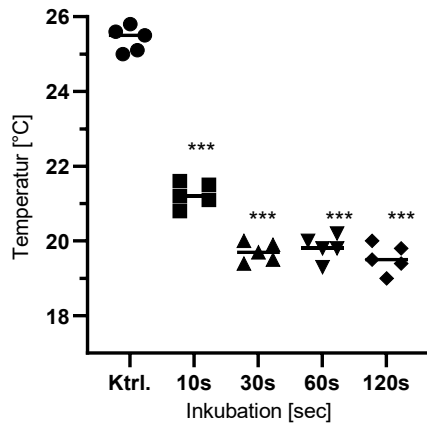
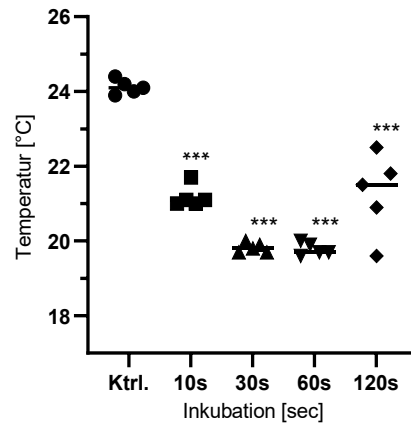
A**OVCAR oberflächlich Temperatur nach NIPP****B****Skov oberflächlich Temperatur nach NIPP**

Abb. 6: Temperaturmessung der Medienoberfläche in Abhängigkeit der NIPP Behandlungszeit.

Die Zellkulturmedien von OVCAR (A) und Skov (B) Zellen wurden unterschiedlich lange mit NIPP behandelt. Anschließend wurde die Temperatur der Medienoberfläche mithilfe einer Infrarotkamera bestimmt. Es wurden jeweils 500µl Zellkulturmedium verwendet. Es wurden fünf unabhängige Proben untersucht.

4. Diskussion

4.1 Das Ovarialkarzinom

Das Ovarialkarzinom (OC) ist die aggressivste Krebserkrankung in der Gynäkologie. Es ist eine der häufigsten Todesursachen bei Frauen. Zudem wird das OC in den meisten Fällen erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert. Dies bedingt die schlechte Prognose der Erkrankung (Arora et al., 2023). Durch die Behandlung mit Paclitaxel konnte die kurzfristige Prognose verbessert werden, allerdings wurde dadurch keine signifikante Verbesserung der Morbidität erreicht (Besic, 2017). Aus diesem Grund wird noch immer an verschiedenen therapeutischen Möglichkeiten geforscht, die die Prognose des OC verbessern könnten.

Die Therapie des OC hat sich in den letzten Jahren sehr gewandelt. Ein wichtiger prognostischer Faktor ist die Tumorfreiheit nach Primäroperation (Bülow et al., 2022). Eine weitere relevante therapeutische Säule ist die Kombinationsbehandlung aus Carboplatin und Paclitaxel. Während der Nutzen der Chemotherapie immer wieder diskutiert wird, konnte die Gruppe der PARP-Inhibitoren gute Ergebnisse vorweisen. Insbesondere beim high-grade OC sind die Ergebnisse vielversprechend (Ruckhäberle und Fehm, 2022).

Seit einigen Jahren steht NIPP immer mehr im Fokus der therapeutischen Forschung. Insbesondere in der Wundversorgung hat sich die antiseptische Wirkung als wertvoll gezeigt. Sie kann die Proliferation von Hautzellen anregen und in chronischen Wunden Mikroorganismen inaktivieren (Nasir et al. 2016). NIPP konnte in klinischen Studien bei der Behandlung von chronisch ulzerierenden Wunden an den Beinen Ergebnisse erzielen, die eine nahezu gleiche antibakterielle Wirkung hatten, wie die Behandlung mit Octenidin. Dabei hatte NIPP den Vorteil, dass deutlich weniger zytotoxische Nebenwirkungen auftraten (Ulrich et al., 2015). Des Weiteren verwendet man NIPP in der Luftreinigungstechnologie sowie in der Nahrungsmittelindustrie. Der antiseptische Effekt wird auch bei der Sterilisation von chirurgischem Besteck ausgenutzt (Kramer et al., 2015).

NIPP hat in jüngerer Vergangenheit auch in der Onkologie immer mehr an Bedeutung gewonnen. In Studien zeigte sich, dass Tumorzellen durch NIPP in ihrem Wachstum

inhibiert werden. NIPP ist in der Lage den Zellzyklus zu beeinflussen und die Apoptose zu indizieren. Dabei ist die Wirkung abhängig von der Dosis und der verwendeten Technik (Arndt et al., 2013). NIPP zeigte bei verschiedenen Tumoren eine inhibierende Wirkung. Dazu zählen zum Beispiel Mammakarzinome, Lungenkrebs, Melanome oder das Ovarialkarzinom (Lee et al., 2016).

Es konnte gezeigt werden, dass NIPP die Membranpermeabilität von Krebszellen erhöht (Haralambiev et al. 2020). Deshalb haben wir die Hypothese formuliert, dass NIPP die Wirksamkeit der bereits zugelassenen Medikamente gegen das Ovarialkarzinom erhöhen könnte. Hierzu wurde untersucht, ob NIPP alleine oder in Kombination mit den PARP-Inhibitoren Niraparib, Rucaparib oder Olaparib einen stärker inhibierenden Einfluss hatte. Auch die singuläre Wirkung der PARP-Inhibitoren wurde untersucht. Es wurde ebenfalls analysiert ob es eine Abhängigkeit zwischen dem pH-Wert und der NIPP-Behandlung gibt. Des Weiteren wurde die Abhängigkeit zwischen Temperatur und der NIPP Behandlung untersucht.

Die verwendeten OC Zelllinien OVCAR3 und Skov3 zeigten sich beide einer NIPP Behandlung gegenüber sensitiv. Bei OVCAR3 Zellen konnte ab einer Behandlungszeit von 10s eine signifikante wachstumsinhibierende Wirkung nachgewiesen werden. Bei den Skov3 Zellen konnte ebenfalls eine inhibierende Wirkung nachgewiesen werden. Hierfür bedurfte es allerdings einer NIPP Behandlung von mindestens 20s. Aber auch nach dieser längeren Behandlungszeit wurden noch Zellzahlen von 2×10^5 gezählt. Die wachstumsinhibierende Wirkung war also auch nach längerer Behandlungszeit weniger deutlich als bei OVCAR3. Es konnte also nachgewiesen werden, dass NIPP in der Lage ist, das Wachstum von verschiedenen Tumorzellen zu inhibieren, wenn auch nicht im gleichen Ausmaß. Auch in der Literatur finden sich zahlreiche Belege dafür, dass NIPP in der Lage ist, das Wachstum von Tumorzellen zu inhibieren (Dezest et al., 2017; Förster, Niu et al., 2023; Marzi et al., 2022; Yan et al. 2017). Daten konnten zeigen, dass, zusammen mit der intraoperativen Behandlung mit NIPP, eine Kombination mit lokalen Chemotherapeutika eine signifikante Verbesserung gegenüber der individuellen Therapiemaßnahmen erreicht (Ishaq et al., 2014; Stope, 2020). Man könnte sich diese Eigenschaften zunutze machen, um chemotherapieresistente Tumore zu behandeln

(Stope, 2020). Auch in dieser Arbeit wurde eine kombinierte Behandlung aus NIPP und den PARP-Inhibitoren Olaparib, Niraparib und Rucaparib getestet.

4.2 Temperatur und pH Veränderungen durch den Einfluss von NIPP

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die Behandlung des Zellkulturmediums mit NIPP die Temperatur, auf der Oberfläche oder eingetaucht, beeinflussen kann. Dazu wurden jeweils 500ml Medium für unterschiedliche Zeiträume mit NIPP behandelt. Es zeigte sich in beiden untersuchten Zelllinien (OVCAR3 und Skov3) eine deutliche Abkühlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Relevante Unterschiede zwischen den Medien konnten nicht gezeigt werden. Eine Erklärung für den Temperaturabfall ist die Verdunstungskälte oder Verdampfungsenthalpie. Diese Begriffe beschreiben die Wärmeabgabe einer Flüssigkeit an die Umgebung. Dies passiert, wenn eine Substanz ihren Aggregatzustand wechselt. Beim Übergang vom flüssigen in den gasförmigen Zustand, wird Arbeit entgegen der Anziehungskräfte der Teilchen verrichtet wodurch spezifische Verdampfungswärme aufgebracht werden muss (Pfeifer et al., 2004). In der klinischen Anwendung hat sich die Verdunstungskälte bewährt um Symptome wie Hyperthermie zu behandeln, da Verdunstung eine der schnellsten und effektivsten Methoden zur Abkühlung darstellt (Wassermann et al., 2023). Zur Behandlung der Medien mit NIPP wurde der „Kinpen Med“ verwendet. Bei dessen Gebrauch entsteht Gasstrom, welcher die Verdunstung verstärkt (Jantschek, 2022). Auch in diesem Versuchsaufbau änderte sich der Aggregatzustand des Mediums von flüssig zu gasförmig, was durch die Behandlung mit NIPP noch verstärkt wurde. Insgesamt gibt es bis jetzt kaum Daten, welche die Wirkung von NIPP auf die Temperatur des Zellkulturmediums beschreiben. Wir empfehlen daher weitere Forschungen zu diesem Thema.

Im Zuge dieser Arbeit wurde auch untersucht, ob die Behandlung des Zellkulturmediums mit NIPP Einfluss auf den pH-Wert hatte. Diese Fragestellung war wichtig, um auszuschließen, dass der pH-Wert Einfluss auf die Ergebnisse nimmt und diese verfälscht. Dieser Faktor schien eine Relevanz zu haben, weil schon in anderen Studien nachgewiesen wurde, dass der pH-Wert durchaus Einfluss auf Ovarialtumorzellen hat. So

wies eine Studie nach, dass die Photolumineszenz von Mercaptoessigsäure in nanoskopischen Teilstrukturen in Skov3 Zellen pH-abhängig ist. Bei einem steigenden pH-Wert steigerte sich auch die Teilchenbewegung. Das galt auch für die Fluoreszenz Intensität, welche bei höherem pH-Wert zunahm (Liu et al., 2007). Eine andere Studie untersuchte die Korrelation eines sauren pH-Wertes und der Interleukin-8 Expression (IL8). IL8 korreliert mit dem Krankheitsverlauf, der genaue Mechanismus ist allerdings noch nicht bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass bei Kultivierung von Skov3 Zellen in saurem Medium (pH: 6,6), die Expression von IL8 deutlich zunahm (Xu und Fidler, 2000). Es gibt also verschiedene Belege dafür, dass der pH-Wert Einfluss auf biomedizinische Prozesse des OC nimmt. Der Wirkmechanismus von NIPP ist noch nicht vollständig verstanden, weshalb verschiedene denkbare Wirkmuster beleuchtet werden. In der Literatur wurde beispielsweise die Fragestellung verfolgt, wie der subzelluläre Mechanismus der Inaktivierung von Hefezellen durch NIPP funktioniert. Einer der untersuchten Parameter war der pH-Wert. Es zeigte sich, dass der pH-Wert durch die Behandlung abnahm und so das Zellmembranpotential senkte. Gemeinsam mit reaktiven Sauerstoff Radikalen stellte der saure pH-Wert einen synergistischen antimikrobiellen Faktor dar (Xu et al., 2020; Xu et al., 2021). In einer anderen Studie ergab sich ein ähnliches Resultat. Man hat in vitro Tumorzellen aus der Aszitesflüssigkeit bei malignem OC entnommen. Diese Proben hat man auf unterschiedliche pH-Werte untersucht. Dazu wurde 10%iger maligner Aszites zu den Proben hinzugefügt. Es zeigte sich, dass die Tumorigenität bei einem alkalischeren pH-Wert höher war als bei einem sauren pH-Wert. Wurde der pH-Wert gesenkt, so reduzierten sich Adhäsion, Stoffwechselaktivität und die Migrationsfähigkeit der Tumorzellen. Der 10%ige maligne Aszites konnte allerdings die Wirkungen des sauren pH-Wertes inhibieren (Yang et al., 2022). Es scheint denkbar, dass die isoelektrischen Anziehungskräfte die Tumorigenität im basischen Milieu fördern. Die pH-Werte dieser Arbeit zeigten sowohl beim Medium von OVCAR3 (pH: 8,27-8,58) als auch von Skov3 (pH: 8,09-8,28) ausschließlich alkalische Werte. Es zeigte sich bei beiden Zelllinien kein Anstieg oder Abfall des pH-Wertes. Die minimal abweichenden Werte sind am ehesten auf Messfehler oder auf die leichten Abweichungen aufgrund pH-Messungenauigkeiten des pH-Meters zurückzuführen. Diese liegen laut Hersteller allerdings nur bei 0,01. Ein Unterschied des pH-Wertes in Abhängigkeit von der Temperatur konnte nicht gezeigt werden. Aufgrund der oben beschriebenen Daten (Yang

et al., 2022) scheint sich der alkalische pH-Wert besser für die Forschung von Ovarialtumorzellen zu eignen. Auf diese Weise wird scheinbar nicht inhibierend auf die Tumoreigenschaften eingewirkt und das natürliche Wachstum von Tumorzellen kann besser beurteilt werden. In der Literatur finden sich keine Belege, welche eine Änderung des pH-Wertes aufgrund von NIPP Behandlung beschreiben. Dies konnte auch in unseren Versuchen nicht festgestellt werden. In jedem Fall empfehlen wir, aufgrund der mangelnden Datenlage, weitere Forschungen zu dieser Fragestellung.

4.3 Unterschiede zwischen OVCAR3 und Skov3 Zellen

OVCAR3 Zellen weisen eine höhere Sensitivität gegenüber NIPP Behandlung auf als Skov3 Zellen. OVCAR3 Zellen gehört zum histologischen Subtyp der „High Grade serous Carcinoma“ (HGSC), welche 70% der Ovarialkarzinome ausmacht. HGSC weist in 96% der Fälle eine p53-Mutation auf. Durch somatische oder Keimbahnmutationen sind BRCA1 und BRCA 2 in 35% inaktiv. 50% der HGSC-Alterationen weisen eine Mutation der homologen Rekombination auf. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass diese Zellen eine höhere Sensitivität gegenüber platinhaltigen Substanzen vorweisen (Darb-Esfahani et al., 2014). Skov Zellen hingegen wurden als „non serous“ (NS) eingestuft (Hallas-Potts et al., 2019). Es wurde belegt, dass in verschiedenen Experimenten ein grundsätzlich unterschiedliches Verhalten zwischen HGSC (OVCAR3) und NS (Skov3) nachweisbar war. Es wurde u.a. der invertierte Transwell-Invasionstest verwendet. Hier konnte eine Invasion nur bei NS Zelllinien nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine schnellere Wanderung der NS Zelllinien im Vergleich zu den HGSC Zelllinien. Dies erscheint unerwartet, weil das HGSC klinisch die deutlich schlechtere Prognose hat und sich aggressiver präsentiert. Es ist aber sehr schwierig Zelllinien in vitro zu etablieren, weil viele genetische Mutationen, die es dazu braucht, nur in Tumoren im fortgeschrittenen Stadium verfügbar sind (Hallas-Potts et al., 2019). Die meisten Zelllinien haben das Potential zu metastasieren (Masters, 2000). Dazu ist es wichtig zu wissen, dass Skov3 Zellen ursprünglich aus Aszitesflüssigkeit gewonnen worden sind (Fogh et al., 1977; Hallas-Potts et al., 2019; Wilson et al., 1984), was mit einem fortgeschrittenen Krankheitsverlauf einhergeht. Deshalb geht das Verhalten von Skov3 Zellen mit dem eines fortgeschrittenen Krankheitsverlauf einher. Dies ist nicht endgültig experimentell

bewiesen, lässt sich aber aus der aktuellen Literatur herleiten (Fogh et al., 1977; Hallas-Potts et al., 2019; Wilson et al., 1984).

In der Literatur finden sich widersprüchliche Angaben zur Platinresistenz der OVCAR3 Zellen. Es gibt Quellen, die OVCAR3 Zellen als platinsensitiv bezeichnen (Wilson et al., 2013) und andere, die auch bei OVCAR3 Zellen eine Resistenz gegenüber Cisplatin sehen (Bernhardt et al., 1992; Mad-Adam et al., 2022). Es scheint allerdings als sicher, dass die Resistenz von Skov3 Zellen sehr viel stärker ist als die von OVCAR3 Zellen (Bernhardt et al., 1992). Auch in dieser Arbeit zeigen sich bei gleicher Behandlung deutliche Unterschiede zwischen OVCAR3 und Skov3. Hier wurden zwar in beiden Zelllinien signifikant inhibierende Wirkungen nachgewiesen, die Sensitivität war jedoch bei OVCAR3 Zellen deutlich höher.

Möglichweise ist der histologische Subtyp ein Grund dafür, dass OVCAR3 und Skov3 unterschiedlich sowohl auf die Behandlung mit PARP-Inhibitoren als auch die Behandlung durch NIPP reagiert haben. Die Tatsache, dass Skov3 Zellen aus Aszitesflüssigkeit bei einem fortgeschrittenen Krankheitsbild entnommen worden sind, ist eine weitere Erklärung für die besonders resistenten Eigenschaften (Fogh et al., 1977).

Die These, dass es Unterschiede zwischen HGSC- und NS-Zelllinien gibt, wird auch von den Ergebnissen einer weiteren Studie nachgewiesen. Dabei wurden in vivo Experimente zur Tumorigenität durchgeführt. Dazu wurde verglichen, wie unterschiedliche, jedoch überlappende Panels von Ovariakarzinomzellen über 6 Wochen Tumore bei Mäusen bildeten. Es zeigte sich, dass Skov3 sowie weitere NS-Zelllinien (wie z.B. A2780) bei intraperitonealer Injektion eine hohe Tumorigenität aufwiesen (Hernandez et al., 2016). OVCAR3 und andere HGSC-Zelllinien (wie z.B. PEO1 & PEO4) wiesen bei intraperitonealer Injektion hingegen eine niedrige Tumorigenität auf (Hallas-Potts et al., 2019).

Aufgrund der bekannten Resistenzen ist die Kombination von Chemotherapie und anderen Behandlungsmöglichkeiten Gegenstand aktueller Forschungen (Chen et al., 2015; Mad-Adam et al., 2022; Rosanò et al., 2010). So konnte in Untersuchungen gezeigt werden, dass (\pm)-Kusunonkinin in der Lage war in Tumorzellen die Zellproliferation zu inhibieren und die Apoptose einzuleiten. Dies sollte nun in Tierversuchen weiter überprüft

werden (Mad-Adam et al., 2022). Eine weitere Studie untersuchte die Auswirkung von MACC1 auf platinresistente Skov Zellen. Hier konnten ebenfalls vielversprechende Ergebnisse erzielt werden (Chen et al., 2015).

Ein sehr wirksames Chemotherapeutikum in der Behandlung des OC ist Cisplatin. 80% der Patientinnen zeigen zu Beginn ein gutes Ansprechen auf dieses Medikament. Ein großes Problem ist allerdings im Therapieverlauf häufig die Entwicklung einer Platinresistenz, welche die Prognose der Therapie deutlich reduziert. Die Gründe für die Cisplatinresistenz sind vielfältig und reichen von verschiedenen DNA-Reparatur-Mechanismen über oxidativen Stress bis zur Multidrugresistenz (Yang et al., 2022).

4.3.1 Olaparib

Eine der vielversprechenden Therapieoptionen ist die Kombination aus Chemotherapeutika und PARP-Inhibitoren. PARP-Inhibitoren hemmen die DNA-Reparaturmechanismen der Tumorzellen und wirken inhibierend auf diese (Gao et al., 2021; Kummar et al., 2012). Hier wurde die Wirkung von Carboplatin, Paclitaxel und Olaparib auf Ovarialtumorzellen untersucht. Es zeigte sich bei OVCAR3 Zellen eine signifikante Verbesserung in der Kombination aus Carboplatin, was sich mit anderen Forschungsergebnissen deckt (Gao et al., 2021; Oza et al., 2015). So konnte beispielsweise in einer anderen Studie gezeigt werden, dass sich die Kombination aus Olaparib mit dem neuartigen Traizen-Medikament CT913 positiv auf das Outcome auswirkt (Wichmann et al., 2020). In einem anderen Versuch wurde probiert, das Tumorwachstum von Skov3 Zellen in Mäusen mithilfe von Olaparib und Metformin zu inhibieren. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Skov3 Zellen. Sowohl die singuläre, als auch die kombinierte Behandlung war signifikant wachstumsinhibierend (Hijaz et al., 2016). In dieser Arbeit zeigte sich bereits bei einer Behandlung der OVCAR3 Zellen mit 1 μ M Olaparib die gleiche Wirkung, welche die Skov Zellen bei einer Behandlung mit 5 μ M zeigten. Insbesondere bei OVCAR3 Zellen wurde bei der Kombination auf PARP-Inhibitoren und NIPP Behandlung ein deutlich synergistischer Effekt erzielt.

4.3.2 Niraparib

Ein weiterer PARP-Inhibitor, welcher im Zuge dieser Arbeit untersucht worden ist, ist Niraparib. Auch Niraparib hat bereits gute Ergebnisse in der Erforschung der Ovarialtumorthherapie geliefert. So konnte nachgewiesen werden, dass die inhibierende Wirkung und die Aktivierung der Apoptose bei Skov3 Zellen bereits durch Cisplatin und Niraparib alleine ausgelöst werden konnte, die Kombination beider Substanzen aber signifikante Vorteile hatte (Bahar et al., 2021). Auch im klinischen Gebrauch zeigte Niraparib signifikant verbesserte Ergebnisse in der Erhaltungstherapie des OC. So wurden sowohl beim rezidivierenden, epithelialen OC als auch beim primären Peritonealkarzinom Erfolge nachgewiesen (Heo und Duggan, 2018). Aufgrund der guten Ergebnisse sind Olaparib und Niraparib bereits in der EU und den USA zum klinischen Gebrauch zugelassen (Heo und Duggan, 2018; Ortiz et al., 2022). In meinen Ergebnissen zeigte sich, dass die Behandlung mit $0.3\mu\text{M}$ Niraparib sowohl bei OVCAR3 als auch bei Skov3 Zellen eine signifikante Wirkung hatte. Bei beiden Zelllinien zeigten sich vergleichbare wachstumshemmende Effekte. In beiden Fällen profitierte die Behandlung deutlich von einer Kombination mit NIPP.

4.3.3 Rucaparib

Der dritte, in dieser Arbeit untersuchte, PARP-Inhibitor war Rucaparib. In der Literatur finden sich Belege, dass Rucaparib eine alternative Behandlungsmöglichkeit des Ovarialkarzinoms ist. Insbesondere Patientinnen mit platin sensitiven Tumoren scheinen von Rucaparib zu profitieren. Es wurden Patientinnen mit der BRCA1 und BRCA2 Mutation untersucht. Es ist allerdings denkbar, dass die Ergebnisse auch für Tumore ohne die BRCA-Mutationen relevant sind. Das sollte Gegenstand weiterer Forschungen sein (Krissteleit et al., 2022; Swisher et al., 2017). Eine andere Studie wies nach, dass es aufgrund von Defekten in den nichthomologen Endstücken der DNA zu einer Rucaparib-Resistenz kommt. Ein solcher Gendefekt wurde in 40% der untersuchten Ovarialzellen festgestellt und kann das Outcome einer Rucaparib Therapie stark einschränken (McCormick et al., 2017). In den Ergebnissen dieser Arbeit konnte ebenfalls keine ausreichende inhibierende Wirkung der Rucaparib Behandlung nachgewiesen werden. Wie mit oben genannten Studien (Krissteleit et al., 2022; Swisher et al., 2017) vereinbar,

hatte Rucaparib auf die sensitiveren OVCAR3 Zellen eine inhibierende Wirkung. Die Skov3 Zellen zeigten über den Zeitraum von 72h sowohl in Kombination mit NIPP als auch in singulärer Rucaparib Behandlung keine Inhibition. Dieses Ergebnis könnte zu den Ergebnissen der oben genannten Studie passen, welche eine Resistenz gegenüber Rucaparib aufgrund von Defekten im DNA Reparatursystem nachwies (McCormick et al., 2017).

4.4 Kombination aus NIPP und PARP-Inhibitoren

NIPP und PARP-Inhibitoren haben beide auch bei singulärer Behandlung eine tumorinhibierende Wirkung. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Kombination der beiden Therapien die Wirkung noch verbessern kann. So wurde in einer Studie nachgewiesen, dass die Kombination aus NIPP und Strahlentherapie aber auch aus NIPP und dem PARP-Inhibitor Olaparib in der Behandlung des Mammakarzinoms deutliche Verbesserungen des Outcomes erreichen konnte (Lafontaine et al., 2020). Diese Ergebnisse wurden durch weitere Daten bekräftigt, die zeigen konnten, dass NIPP auch bei Kombination mit dem gängigen Brustkrebsmedikament Tamoxifen positive tumorinhibierende Ergebnisse erzielte. In der gleichen Arbeit wurde die entzündungshemmende Wirkung von Sulfasalazin bei rheumatoider Arthritis untersucht. Diese stellte sich alleine als minimal heraus, konnte aber mit NIPP wesentlich bessere Ergebnisse erzielen (Braný et al., 2021). In einer weiteren Studie, welche sich mit der Behandlung des malignen Melanoms beschäftigte, konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Kombination aus NIPP und PARP-Inhibitoren den Krebs effektiver bekämpfte (Adhikari et al., 2019). Die antiproliferative Wirkung der Kombination aus NIPP und PARP-Inhibitoren liegt unter anderem daran, dass NIPP eine erhöhte Zellwandpermeabilität erzeugt und die Wand dadurch für niedermolekulare Wirkstoffe besser passierbar ist. Hierbei wird die Lipidordnung verändert und es kommt zu erhöhten Peroxidationswerten, welche die Permeabilität verbessern. Auf diese Weise steigt die intrazelluläre Konzentration des tumorinhibierenden Wirkstoffes (Braný et al., 2021). Die im NIPP enthaltenen reaktiven Spezies (ROS) welche durch partielle Reduktion von Sauerstoff zu Superoxid (O_2^-), zu Lipidperoxiden oder Ähnlichem entstehen, sorgt für eine Änderung der Zellwand. Dabei sorgt die Lipidperoxidation für eine Strukturveränderung

der Membran und begünstigt das Entstehen von weiteren ROS, welche die Zellwandstruktur beschädigen (Gaschler und Stockwell, 2017). Des Weiteren konnte Plasma auch in Kombination mit den Platinderivaten Cisplatin oder mit Paclitaxel Zellen des OC angreifen. Hier konnte durch die Plasmabehandlung der Platinresistenz der Tumorzellen entgegengewirkt werden (Lee et al., 2022). Auch in dieser Arbeit konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Zwar gab es Unterschiede in der benötigten Behandlungsdauer bzw. der benötigten Wirkstoffkonzentration bei den verschiedenen untersuchten Zellen, eine inhibierende Wirkung konnte jedoch sowohl bei OVCAR3 als auch bei Skov3 nachgewiesen werden. Es scheint, dass NIPP eine relevante Rolle in der Behandlung des OC spielen könnte.

In dieser Arbeit zeigt sich die tumorinhibierende Wirkung des NIPP, sowohl bei singulärer Behandlung als auch in Kombination aus NIPP und verschiedenen PARP-Inhibitoren, deutlich. Bei unterschiedlichen Zelllinien des OC konnten diese Effekte nachgewiesen werden und der Nutzen aus der Kombination beider Therapien belegt werden. Vergleichbare Ergebnisse lassen sich auch in der Literatur bestätigen. Da NIPP eine stark inhibierende Wirkung auf Tumorzellen hat und dabei mit wenigen Nebenwirkungen in Verbindung gebracht wird, könnte sich NIPP auch in der Klinik als vorteilhaft erweisen. Die hier gewonnenen Ergebnisse, legen nahe, dass NIPP in den nächsten Jahren eine wichtige Rolle in der Onkologie und insbesondere in der Therapie des OC spielen könnte.

5. Zusammenfassung

Das Ovarialkarzinom ist die dritthäufigste maligne Todesursache bei Frauen in Deutschland. Es geht mit einer schlechten Prognose einher, was unter anderem daran liegt, dass das OC meist erst in fortgeschrittenem Stadium erkannt wird. Die Therapie gestaltet sich schwierig, da es im Verlauf der Erkrankung häufig zu Therapieresistenzen kommt und sich vermehrt Rezidive bilden. Die Behandlung durch Nicht Invasives Physikalisches Plasma ist eine vielversprechende Methode in der Onkologie. NIPP hat sich nicht nur bei verschiedenen Behandlungen in der Dermatologie und Zahnmedizin etabliert, sondern ist auch in der Lage verschiedene Malignitäten, wie zum Beispiel Brustkrebs, Melanome oder das OC effektiv anzugreifen. Dabei ist NIPP in der Lage Tumorzellen direkt zu inhibieren, indem die Apoptose in Tumorzellen eingeleitet wird. Auch indirekt werden Tumore inhibiert, indem Resistenzen gegenüber anderen Therapieoptionen aufgehoben werden. NIPP hat außerdem ein sehr risikoarmes Nebenwirkungsprofil, weshalb die Behandlung recht unbedenklich ist. Die Wirkung von NIPP auf Temperatur und den pH-Wert wurde im Zuge dieser Arbeit untersucht. Die Temperatur wurde durch NIPP herabgesetzt, was auf Verdunstungskälte zurückzuführen ist. Beim pH-Wert konnten keine Veränderungen gezeigt werden. In dieser Arbeit wurde insbesondere die Wirkung von NIPP auf OVCAR3 und Skov3 Zellen des OC untersucht. Dazu wurden in-vitro Zellkulturen behandelt. OVCAR3 Zellen stellten sich gegenüber der NIPP Behandlung als sensitiver heraus und es zeigte sich bereits ab einer Behandlungszeit von 10s eine signifikant inhibierende Wirkung ($p = 0,034$). An Skov3 Zellen zeigte sich diese Wirkung nach frühestens 20s Behandlungszeit ($p = 0,021$). Allerdings wurde in jedem Falle eine antiproliferative Wirkung gezeigt. Eine, an Wichtigkeit zunehmende Komponente, in der Behandlung des OC sind die PARP-Inhibitoren. Diese greifen die DNA-Reparaturmechanismen der Tumorzellen an und begünstigen so deren Apoptose. Im Zuge dieser Arbeit wurden Olaparib, Niraparib und Rucaparib eingesetzt. Es wurde sowohl deren singuläre Wirkung, als auch die Kombination mit NIPP charakterisiert. Bei der Kombination von NIPP mit Olaparib und Niraparib konnte in beiden Zelllinien eine signifikant inhibierende Wirkung nachgewiesen werden (OVCAR: Ola & NIPP: $p = 0,010$; OVCAR: Nira & NIPP: $p < 0,001$; Skov3: Ola & NIPP: $p < 0,001$; Skov3: Nira & NIPP: $p < 0,001$). Beim PARP-Inhibitor Rucaparib zeigte

sich eine signifikante Inhibition nur bei OVCAR3 Zellen ($p = 0,001$). In den hier präsentierten Ergebnissen konnten die tumorinhibierende Wirkung von PARP-Inhibitoren und NIPP gezeigt werden. Insbesondere die Kombination der beiden Wirkmechanismen zeigte vielversprechende Ergebnisse, welche auch von der vorliegenden Literatur gestützt werden.

Die hier in-vitro gewonnenen Daten, legen nahe, dass NIPP auch in der Klinik eine relevante Option in der Behandlung des OC sein kann. Sowohl die präsentierten Daten, als auch erste Untersuchungen in der Literatur legen nahe, dass NIPP in der Therapie des OC in Zukunft eine wichtige Rolle einnehmen könnte.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Wachstumskinetik von OVCAR und Skov Zellen.	28
Abb. 2: Wachstumskinetik von OVCAR und Skov Zellen unter Einfluss von NIPP.	30
Abb. 3: Wachstumskinetik von OVCAR und Skov Zellen unter Einfluss von NIPP und PARP-Inhibitoren.....	33
Abb. 4: pH-Wert Änderungen in Abhängigkeit von Temperatur und NIPP Behandlungszeit.	35
Abb. 5: Temperaturmessung des Zellkulturmediums in Abhängigkeit der NIPP Behandlungszeit.	37
Abb. 6: Temperaturmessung der Medienoberfläche in Abhängigkeit der NIPP Behandlungszeit.....	38

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	19
Tabelle 2: Chemikalien.....	20
Tabelle 3: Kommerzielle Lösungen.....	20
Tabelle 4: Zelllinien.....	20
Tabelle 5: Zellkultur: Medien und Zusätze.....	21
Tabelle 6: Zelllinie.....	21
Tabelle 7: Software und genutzte Programme.....	21

8. Literaturverzeichnis

Adhikari M, Kaushik N, Ghimire B, Adhikari B, Baboota S, Al-Khedhairi AA, Wahab R, Lee S-J, Kaushik NK, Choi EH. Cold atmospheric plasma and silymarin nanoemulsion synergistically inhibits human melanoma tumorigenesis via targeting HGF/c-MET downstream pathway. *Cell Commun Signal* 2019; 17: 52

Aghajanian C, Blank SV, Goff BA, Judson PL, Teneriello MG, Husain A, Sovak MA, Yi J, Nycum LR. OCEANS: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab in patients with platinum-sensitive recurrent epithelial ovarian, primary peritoneal, or fallopian tube cancer. *J Clin Oncol* 2012; 30: 2039-2045

Arndt S, Wacker E, Li YF, Shimizu T, Thomas HM, Morfill GE, Karree S, Zimmermann JL, Bosserhoff A-K. Cold atmospheric plasma, a new strategy to induce senescence in melanoma cells. *Exp Dermatol* 2013; 22: 284-289

Arora T, Mullangi S, Lekkala MR. Ovarian Cancer. In Arora T, Mullangi S, Lekkala MR, eds., *Ovarian Cancer*. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK567760/> (Zugriffsdatum 24.04.2023)

Bahar E, Kim JY, Kim DC, Kim HS, Yoon H. Combination of Niraparib, Cisplatin and Twist Knockdown in Cisplatin-Resistant Ovarian Cancer Cells Potentially Enhances Synthetic Lethality through ER-Stress Mediated Mitochondrial Apoptosis Pathway. *Int J Mol Sci* 2021; 22: 17

Bekeschus S, Schmidt A, Weltmann K-D, Woedtke T von, Wende K, Hefny MM, Rödder K, Jablonowski H, Benedikt J. The plasma jet kINPen – A powerful tool for wound healing. Clin Plasma Med 2016; 4: 19-28

Bekeschus S, Wende K, Hefny MM, Rödder K, Jablonowski H, Schmidt A, Woedtke T von, Weltmann K-D, Benedikt J. Oxygen atoms are critical in rendering THP-1 leukaemia cells susceptible to cold physical plasma-induced apoptosis. Sci Rep 2017; 7: 2791

Bernhardt G, Müller R, Gust R, Reile H, Keller C, Spruß T, Schöneberger H. Dichloro-[1-(hydroxyphenyl)-2-phenylethylenediamine]platinum(II) complexes: testing on the human ovarian cancer cell lines NIH: OVCAR3 and SK OV 3. Arch Pharm (Weinheim) 1992; 325: 93-99

Bernhardt T, Semmler ML, Schäfer M, Bekeschus S, Emmert S, Boeckmann L. Plasma Medicine: Applications of Cold Atmospheric Pressure Plasma in Dermatology. Oxid Med Cell Longev 2019; 2019: 3873928

Besic I, 2017: Zelluläre und molekulare Wirkung von kaltem physikalischem Plasma auf Ovarialkarzinomzellen. Verfügbar unter: https://epub.ub.uni-greifswald.de/frontdoor/deliver/index/docId/2499/file/Doktorarbeit_Besic.Ilma_Endversion.pdf (Zugriffsdatum: 24.04.2023)

Bradbury A, O'Donnell R, Drew Y, Curtin NJ, Sharma Saha S. Characterisation of Ovarian Cancer Cell Line NIH-OVCAR3 and Implications of Genomic, Transcriptomic, Proteomic and Functional DNA Damage Response Biomarkers for Therapeutic Targeting. Cancers 2020; 12: 1-14

Braný D, Dvorská D, Strnádel J, Matáková T, Halašová E, Škovierová H. Effect of Cold Atmospheric Plasma on Epigenetic Changes, DNA Damage, and Possibilities for Its Use in Synergistic Cancer Therapy. *Int J of Mol Sci* 2021; 22: 12252

Brozovic A. The relationship between platinum drug resistance and epithelial–mesenchymal transition. *Arch Toxicol* 2017; 91: 605-619

Bülow C von, Prieske K, Jäger A, Schmalfeldt B. Aktuelle Aspekte zur operativen Therapie des primären Ovarialkarzinoms. *Die Gynäkologie* 2022; 55: 155-163

Buttmann-Schweiger N, Kraywinkel K. Epidemiologie von Eierstockkrebs in Deutschland. *Onkologe* 2019; 25: 92-98

Chambers LM, Yao M, Morton M, Gruner M, Chichura A, Horowitz M, Costales AB, Rose PG, Michener CM, Debernardo R. Patterns of recurrence in women with advanced and recurrent epithelial ovarian cancer treated with cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *Gynecol Oncol* 2021; 161: 389-395

Chen ZM, Shi HR, Li X, Deng YX, Zhang RT. Downregulation of MACC1 expression enhances cisplatin sensitivity in SKOV-3/DDP cells. *Genet Mol Res* 2015; 14: 17134-17144

Chern JY, Curtin JP. Appropriate Recommendations for Surgical Debulking in Stage IV Ovarian Cancer. *Curr Treat Options Oncol* 2016; 17: 1

Coleman RL, Brady MF, Herzog TJ, ..., Mannel RS. Bevacizumab and paclitaxel-carboplatin chemotherapy and secondary cytoreduction in recurrent, platinum-sensitive

ovarian cancer (NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group study GOG-0213): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2017; 18: 779-791

Darb-Esfahani S, Denkert C, Dietel M. Aktuelle Aspekte zur Tumorigenese und Ätiologie. *Onkologe* 2014; 20: 642-649

Dezest M, Chavatte L, Bourdens M, ..., Bulteau A-L. Mechanistic insights into the impact of Cold Atmospheric Pressure Plasma on human epithelial cell lines. *Sci Rep* 2017; 7: 41163

Dias MP, Moser SC, Ganesan S, Jonkers J. Understanding and overcoming resistance to PARP inhibitors in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2021; 18: 773-791

Doubeni CA, Doubeni AR, Myers AE. Diagnosis and Management of Ovarian Cancer. *Am Fam Physician* 2016; 93: 937-944

Duan Z, Duan Y, Lamendola DE, Yusuf RZ, Naeem R, Penson RT, Seiden MV. Overexpression of MAGE/GAGE genes in paclitaxel/doxorubicin-resistant human cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2778-2785

Fogh J, Wright WC, Loveless JD. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst* 1977; 58: 209-214

Förster S, Niu Y, Eggers B, Nokhbehshaim M, Kramer FJ, Bekeschus S, Mustea A, Stope MB. Modulation of the Tumor-Associated Immuno-Environment by Non-Invasive Physical Plasma. *Cancers* 2023; 15: 4

Fridman G, Shereshevsky A, Jost MM, Brooks AD, Fridman A, Gutsol A, Vasilets V, Friedman G. Floating Electrode Dielectric Barrier Discharge Plasma in Air Promoting Apoptotic Behavior in Melanoma Skin Cancer Cell Lines. *Plasma Chem Plasma Process* 2007; 27: 163–176

Gao J, Wang Z, Fu J, A J, Ohno Y, Xu C. Combination treatment with cisplatin, paclitaxel and olaparib has synergistic and dose reduction potential in ovarian cancer cells. *Exp Ther Med* 2021; 22: 935

García-Alcantara E, López-Callejas R, Morales-Ramírez PR, ..., Rojas-Olmedo IA. Accelerated mice skin acute wound healing in vivo by combined treatment of argon and helium plasma needle. *Arch Med Res* 2013; 44: 169-177

Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 482: 419-425

Gupta S, Nag S, Aggarwal S, Rauthan A, Warriar N. Maintenance therapy for recurrent epithelial ovarian cancer: current therapies and future perspectives - a review. *J Ovarian Res* 2019; 12: 103

Hallas-Potts A, Dawson JC, Herrington CS. Ovarian cancer cell lines derived from non-serous carcinomas migrate and invade more aggressively than those derived from high-grade serous carcinomas. *Sci Rep* 2019; 9: 5515

Haralambiev L, Nitsch A, Einkenkel R, Muzzio DO, Gelbrich N, Burchardt M, Zygmunt M, Ekkernkamp A, Stope MB, Gumbel D. The Effect of Cold Atmospheric Plasma on the

Membrane Permeability of Human Osteosarcoma Cells. *Anticancer Res* 2020; 40: 841-846

Heinlin J, Isbary G, Stolz W, Zeman F, Landthaler M, Morfill G, Shimizu T, Zimmermann JL, Karrer S. A randomized two-sided placebo-controlled study on the efficacy and safety of atmospheric non-thermal argon plasma for pruritus. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2013; 27: 324-331

Heo Y-A, Duggan ST. Niraparib: A Review in Ovarian Cancer. *Target Oncol* 2018; 13: 533-539

Hernandez L, Kim MK, Lyle LT, Bunch KP, House CD, Ning F, Noonan AM, Annunziata CM. Characterization of ovarian cancer cell lines as in vivo models for preclinical studies. *Gynecol Oncol* 2016; 142: 332-340

Hoffmann C, Berganza C, Zhang J. Cold Atmospheric Plasma: methods of production and application in dentistry and oncology. *Med Gas Res* 2013; 3: 21

Hijaz M, Chhina J, Mert I, Taylor M, Dar S, Al-Wahab Z, Ali-Fehmi R, Buekers T, Munkarah AR, Rattan R. Preclinical evaluation of olaparib and metformin combination in BRCA1 wildtype ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2016; 142: 323-331

Hirst A, Simms M, Mann V, Maitland N, O'connell D, Frame F. Low-temperature plasma treatment induces DNA damage leading to necrotic cell death in primary prostate epithelial cells. *Br J Cancer* 2015; 112: 1536-1545

Hou L, Hou X, Wang L, Li Z, Xin B, Chen J, Gao X, Mu H. PD98059 impairs the cisplatin-resistance of ovarian cancer cells by suppressing ERK pathway and epithelial mesenchymal transition process. *Cancer Biomark* 2017; 21: 187-194

Hughes DL. Patent review of manufacturing routes to recently approved PARP inhibitors: Olaparib, rucaparib, and niraparib. *Org Process Res Dev* 2017; 21: 1227-1244

Ishaq M, Evans MD, Ostrikov KK. Atmospheric pressure gas plasma-induced colorectal cancer cell death is mediated by Nox2-ASK1 apoptosis pathways and oxidative stress is mitigated by Srx-Nrf2 anti-oxidant system. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1843: 2827-2837

Jantschek DU, Zelluläre und molekulare Effekte nicht-invasiven physikalischen Plasmas auf hormonell regulierte Karzinomzellen. *Dissertationsschrift aus der medizinischen Fakultät der rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn* (2022)

Jiang X, Li X, Li W, Bai H, Zhang Z. PARP inhibitors in ovarian cancer: Sensitivity prediction and resistance mechanisms. *J Cell Mol Med* 2019; 23: 2303-2313

Kalinina EV, Andreev YA, Petrova AS, Lubova KI, Shtil AA, Chernov NN, Novichkova MD, Nurmuradov NK. Redox-Dependent Expression of Genes Encoding NADPH Oxidase 5 and the Key Antioxidant Enzymes during Formation of Drug Resistance of Tumor Cells to Cisplatin. *Bull Exp Biol Med* 2018; 165: 678-681 791

Kaushik N, Lee SJ, Choi TG, Baik KY, Uhm HS, Kim CH, Kaushik NK, Choi EH. Non-thermal plasma with 2-deoxy-D-glucose synergistically induces cell death by targeting glycolysis in blood cancer cells. *Sci Rep* 2015; 5: 8726

Kim JY, Ballato J, Foy P, Hawkins T, Wei Y, Li J, Kim S-O. Apoptosis of lung carcinoma cells induced by a flexible optical fiber-based cold microplasma. *Biosens Bioelectron* 2011; 28: 333-338

Kim SJ, Chung T. Cold atmospheric plasma jet-generated RONS and their selective effects on normal and carcinoma cells. *Sci Rep* 2016; 6: 1-14

Kossaï M, Leary A, Scoazec JY, Genestie C. Ovarian Cancer: A Heterogeneous Disease. *Pathobiology* 2018; 85: 41-49

Kramer A, Bekeschus S, Matthes R, Bender C, Stope MB, Napp M, Lademann O, Weltmann K-D, Schauer F. Cold Physical Plasmas in the Field of Hygiene—Relevance, Significance, and Future Applications. *Plasma Process Polym* 2015; 12: 1410-1422

Kristeleit R, Lisyanskaya A, Fedenko A, ..., Oza AM. Rucaparib versus standard-of-care chemotherapy in patients with relapsed ovarian cancer and a deleterious BRCA1 or BRCA2 mutation (ARIEL4): an international, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2022; 23: 465-478

Kummar S, Chen A, Parchment RE, Kinders RJ, Ji J, Tomaszewski JE, Doroshow JH. Advances in using PARP inhibitors to treat cancer. *BMC Med* 2012; 10: 25

Lafontaine J, Boisvert J-S, Glory A, Coulombe S, Wong P. Synergy between Non-Thermal Plasma with Radiation Therapy and Olaparib in a Panel of Breast Cancer Cell Lines. *Cancers* 2020; 12: 348

Lee YJ, Kim SW, Jung MH, Kim YS, Kim KS, Suh DS, Kim KH, Choi EH, Kim J, Kwon BS. Plasma-activated medium inhibits cancer stem cell-like properties and exhibits a synergistic effect in combination with cisplatin in ovarian cancer. *Free Rad Biol Med* 2022; 182: 276-288

Lee S, Lee H, Bae H, Choi EH, Kim SJ. Epigenetic silencing of miR-19a-3p by cold atmospheric plasma contributes to proliferation inhibition of the MCF-7 breast cancer cell. *Sci Rep* 2016; 6: 30005

Lendeckel D, Eymann C, Emicke P, ..., Scharf C. Proteomic Changes of Tissue-Tolerable Plasma Treated Airway Epithelial Cells and Their Relation to Wound Healing. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 506059

Liu Y-S, Sun Y, Vernier PT, Liang C-H, Chong SYC, Gundersen MA. pH-Sensitive Photoluminescence of CdSe/ZnSe/ZnS Quantum Dots in Human Ovarian Cancer Cells. *J Phys Chem C* 2007; 111: 2872-2878

Lord CJ, Ashworth A. Targeted therapy for cancer using PARP inhibitors. *Curr Opin Pharmacol* 2008; 8: 363-369

Lord CJ, Ashworth A. PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic. *Science* 2017; 355: 1152-1158

Mad-Adam N, Rattanaburee T, Tanawattanasuntorn T, Graidist P. Effects of trans-(±)-kusunokinin on chemosensitive and chemoresistant ovarian cancer cells. *Oncol Lett* 2022; 23: 59

Makvandi M, Pantel A, Schwartz L, ..., Lin LL. A PET imaging agent for evaluating PARP-1 expression in ovarian cancer. *J Clin Invest* 2018; 128: 2116-2126

Marzi J, Stope MB, Henes M, ..., Weiss M. Noninvasive Physical Plasma as Innovative and Tissue-Preserving Therapy for Women Positive for Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Cancers* 2022; 14: 1-16

Masters JR. Human cancer cell lines: fact and fantasy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1: 233-236

McCluggage WG. Morphological subtypes of ovarian carcinoma: a review with emphasis on new developments and pathogenesis. *Pathology* 2011; 43: 420-432

McCormick A, Donoghue P, Dixon M, O'Sullivan R, O'Donnell RL, Murray J, Kaufmann A, Curtin NJ, Edmondson RJ. Ovarian Cancers Harbor Defects in Nonhomologous End Joining Resulting in Resistance to Rucaparib. *Clin Cancer Res* 2017; 23: 2050-2060

Meinhold-Heerlein I, Zeppernick F, Strauss A, Maass N, Hauptmann S. Die Heterogenität des Ovarialkarzinoms. *Gynäkologe* 2011; 44: 708-716

Mertens N, Goppold A, Emmert S, Viöl W, eds., Dielectric barrier discharge plasma-A powerful tool for medical applications. 20th International Conference of the Society for Medical Innovation and Technology (SMIT), Vienna, Austria; 2008

Mohd Nasir N, Lee BK, Yap SS, Thong KL, Yap SL. Cold plasma inactivation of chronic wound bacteria. *Arch Biochem Biophys* 2016; 605: 76-85

Musa F, Alard A, David-West G, Curtin JP, Blank SV, Schneider RJ. Dual mTORC1/2 inhibition as a novel strategy for the resensitization and treatment of platinum-resistant ovarian cancer. *Mol Cancer Ther* 2016; 15: 1557-1567

Nash Z, Menon U. Ovarian cancer screening: Current status and future directions. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2020; 65: 32-45

Ortiz M, Wabel E, Mitchell K, Horibata S. Mechanisms of chemotherapy resistance in ovarian cancer. *Cancer Drug Resist* 2022; 5: 304-316

Oza AM, Cibula D, Benzaquen AO, ..., Friedlander M. Olaparib combined with chemotherapy for recurrent platinum-sensitive ovarian cancer: a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2015; 16: 87-97

Parmar MK, Ledermann JA, Colombo N, ..., Tropé C. Paclitaxel plus platinum-based chemotherapy versus conventional platinum-based chemotherapy in women with relapsed ovarian cancer: the ICON4/AGO-OVAR-2.2 trial. *Lancet* 2003; 361: 2099-2106

Partecke LI, Evert K, Haugk J, ..., Bernstorff W von. Tissue tolerable plasma (TTP) induces apoptosis in pancreatic cancer cells in vitro and in vivo. *BMC cancer* 2012; 12: 1-10

Pfeifer H, Schmiedel H, Stannarius R. Koexistenz und Übergänge bei Aggregatzuständen. In: Pfeifer H, Schmiedel H, Stannarius R, eds., *Kompaktkurs Physik mit virtuellen Experimenten und Übungsaufgaben*. Wiesbaden: Vieweg+Teubner Verlag, 2004: 155-162

Pietsch G. Peculiarities of dielectric barrier discharges. *Contrib. Plasma Phys* 2001; 41: 620-628

Plewa J-M, Yousfi M, Frongia C, Eichwald O, Ducommun B, Merbahi N, Lobojois V. Low-temperature plasma-induced antiproliferative effects on multi-cellular tumor spheroids. *New J Phys* 2014; 16: 043027

Reuter S, von Woedtke T, Weltmann K-D. The kINPen—a review on physics and chemistry of the atmospheric pressure plasma jet and its applications. *J Phys D Appl Phys* 2018; 51: 233001

Rosanò L, Cianfrocca R, Spinella F, Di Castro V, Natali PG, Bagnato A. Combination therapy of zibotentan with cisplatin and paclitaxel is an effective regimen for epithelial ovarian cancer. *Can J Physiol Pharmacol*. 2010; 88: 676-681

Ruckhäberle E, Fehm T. Systemische Therapie und zielgerichtete Erhaltungstherapie in der Primärsituation beim high- und low-grade Ovarialkarzinom. *Die Gynäkologie* 2022; 55: 164-75

Sakai W, Swisher EM, Jacquemont C, Chandramohan KV, Couch FJ, Langdon SP, Wurz K, Higgins J, Villegas E, Taniguchi T. Functional restoration of BRCA2 protein by secondary BRCA2 mutations in BRCA2-mutated ovarian carcinoma. *Cancer Res* 2009; 69: 6381-6386

Schutze A, Jeong JY, Babayan SE, Park J, Selwyn GS, Hicks RF. The atmospheric-pressure plasma jet: a review and comparison to other plasma sources. *IEEE Trans Plasma Sci* 1998; 26: 1685-1694

Statistisches Bundesamt Pressemitteilung Nr. 317 vom 30.09.2024. Verfügbar unter https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2024/08/PD24_317_23211.html (Zugriffsdatum: 18.01.2025)

Stewart C, Ralyea C, Lockwood S. Ovarian Cancer: An Integrated Review. *Semin Oncol Nurs* 2019; 35: 151-156

Stope MB. Plasma oncology-Physical plasma as innovative tumor therapy. *Journal of Cancer* 2020; 53: 56

Swisher EM, Lin KK, Oza AM, ..., McNeish IA. Rucaparib in relapsed, platinum-sensitive high-grade ovarian carcinoma (ARIEL2 Part 1): an international, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2017; 18: 75-87

Tanaka H, Mizuno M, Ishikawa K, Nakamura K, Kajiyama H, Kano H, Kikkawa F, Hori M. Plasma-activated medium selectively kills glioblastoma brain tumor cells by down-regulating a survival signaling molecule, AKT kinase. *Plasma Med* 2011; 1: 265-277

Ulrich C, Kluschke F, Patzelt A, ..., Lange-Asschenfeldt B. Clinical use of cold atmospheric pressure argon plasma in chronic leg ulcers: A pilot study. *J Wound Care* 2015; 24: 2-3, 196, 8-200

Utsumi F, Kajiyama H, Nakamura K, Tanaka H, Mizuno M, Ishikawa K, Kondo H, Kano H, Hori M, Kikkawa F. Effect of indirect nonequilibrium atmospheric pressure plasma on anti-proliferative activity against chronic chemo-resistant ovarian cancer cells in vitro and in vivo. *PloS One* 2013; 8: e81576

Utzt M-J. PARP-Inhibition statt Chemotherapie. InFo Hämatol Onkol 2020; 23: 64

Vergote I, Amant F, Kristensen G, Ehlen T, Reed NS, Casado A. Primary surgery or neoadjuvant chemotherapy followed by interval debulking surgery in advanced ovarian cancer. Eur J Cancer 2011; 47: 88-92

Wang X, Smithrud DB. Pt-rotaxanes as cytotoxic agents. Bioorg Med Chem Lett 2011; 21: 6880-6883

Wasserman DD, Creech JA, Healy M. Cooling Techniques For Hyperthermia. In: Wassermann DD, Creech JA, Healy M. eds., Cooling Techniques For Hyperthermia. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. Verfügbar unter <https://europepmc.org/article/NBK/nbk459311> (Zugriffsdatum 07.05.2023)

Weltmann KD, Kindel E, Woedtke T von, Hähnel M, Stieber M, Brandenburg R. Atmospheric-pressure plasma sources: Prospective tools for plasma medicine. Pure Appl Chem 2010; 82: 1223-1237

Weltmann KD, Woedtke T von. Plasma medicine—current state of research and medical application. Plasma Phys Control Fusion 2017; 59: 14031

Wichmann C, Klotz DM, Zeiler HJ, Hilger RA, Grützmann K, Krüger A, Aust D, Wimberger P, Kuhlmann JD. The effect of the triazene compound CT913 on ovarian cancer cells in vitro and its synergistic interaction with the PARP-inhibitor olaparib. Gynecol Oncol 2020; 159: 850-859

Wilson AJ, Liu AY, Roland J, ..., Khabele D. TR3 modulates platinum resistance in ovarian cancer. *Cancer Res* 2013; 73: 4758-4769

Wilson AP. Characterization of a cell line derived from the ascites of a patient with papillary serous cystadenocarcinoma of the ovary. *J Natl Cancer Inst* 1984; 72: 513-521

Woedtke T von, Schmidt A, Bekeschus S, Wende K, Weltmann K-D. Plasma Medicine: A Field of Applied Redox Biology. *In Vivo* 2019; 33: 1011-1026

Xu H, Ma R, Zhu Y, Du M, Zhang H, Jiao Z. A systematic study of the antimicrobial mechanisms of cold atmospheric-pressure plasma for water disinfection. *Sci Total Environ* 2020; 703: 134965

Xu H, Zhu Y, Du M, Wang Y, Ju S, Ma R, Jiao Z. Subcellular mechanism of microbial inactivation during water disinfection by cold atmospheric-pressure plasma. *Water Res* 2021; 188: 116513

Xu L, Fidler IJ. Acidic pH-induced Elevation in Interleukin 8 Expression by Human Ovarian Carcinoma Cells. *Cancer Research* 2000; 60: 4610-4616

Yan D, Sherman JH, Keidar M. Cold atmospheric plasma, a novel promising anti-cancer treatment modality. *Oncotarget* 2017; 8: 15977-15995

Yang L, Xie HJ, Li YY, Wang X, Liu XX, Mai J. Molecular mechanisms of platinum-based chemotherapy resistance in ovarian cancer (Review). *Oncol Rep* 2022; 47: 82

Yang Q, Bae G, Nadiradze G, Castagna A, ..., Trautwein C. Acidic ascites inhibits ovarian cancer cell proliferation and correlates with the metabolomic, lipidomic and inflammatory phenotype of human patients. *J Transl Med* 2022; 20: 581

Zampieri LX, Grasso D, Bouzin C, Brusa D, Rossignol R, Sonveaux P. Mitochondria Participate in Chemoresistance to Cisplatin in Human Ovarian Cancer Cells. *Mol Cancer Res* 2020; 18: 1379-1391

Zhang R, Siu MKY, Ngan HYS, Chan KKL. Molecular Biomarkers for the Early Detection of Ovarian Cancer. *Int J Mol Sci* 2022; 23: 19

Zhu H, Wei M, Xu J, ..., Shi S. PARP inhibitors in pancreatic cancer: molecular mechanisms and clinical applications. *Mol Cancer* 2020; 19: 49

Zyl B van, Tang D, Bowden NA. Biomarkers of platinum resistance in ovarian cancer: what can we use to improve treatment. *Endocr Relat Cancer* 2018; 25: 303-318

9. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Klinik für Gynäkologie und Gynäkologische Onkologie unter Betreuung von Prof. Dr. med. Dr. hc. Alexander Mustea durchgeführt.

Die Konzeption meiner Arbeit erfolgte in Zusammenarbeit mit meinem Betreuer, Leiter des gynäkologischen Forschungslabors, Priv.-Doz. Dr. Dr. Matthias Stope.

Sämtliche Versuche und Analysen wurden, nach Einarbeitung durch die Laborassistentin Rachana Subedi sowie den Leiter des Labors, Priv.-Doz. Dr. Dr. Matthias Stope, von mir eigenständig durchgeführt.

Das zur Auswertung verwendete Datenmaterial wurde eigenständig zusammengestellt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

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

10. Danksagung

Ich möchte mich bei allen Menschen, die mich in der Planung und Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben, bedanken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Alexander Mustea, Leiter der Klinik und Poliklinik für Gynäkologie und gynäkologische Onkologie, für die Möglichkeit die Promotion in seinem Institut im molekular-biologischem Labor absolvieren zu können. Auch für die menschliche und fachliche Unterstützung bedanke ich mich.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer und dem Leiter des Labors PD Dr. rer. nat. Dr. rer. med. habil. Matthias Stope. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Danke für die uneingeschränkte Hilfestellung bei der Durchführung und Planung meiner Arbeit. Das gilt sowohl für die Zeit im Labor, als auch für die regelmäßigen Verbesserungsvorschläge der schriftlichen Arbeit. Du warst zu jeder Zeit erreichbar und nahmst dich immer meiner Probleme an. Auch für viele schöne, persönliche Momente neben der Arbeit möchte ich mich bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich beim ganzen Team des Forschungslabor für die Geduld, tatkräftige Unterstützung und viele gemeinsame freundschaftliche Stunden bedanken. Insbesondere möchte ich hier Frau Kaspari und Frau Subedi hervorheben. Beide nahmen sich viel Zeit um mir bei meiner Arbeit zu helfen. Bei meinen Kommilitoninnen im Labor möchte ich mich für eure Kollegialität und Hilfsbereitschaft bedanken.

Für die Ermutigungen, konstruktive Kritik und den Rückhalt bedanke ich mich bei meiner Familie und meinen Freundinnen und Freunden. Ihr wart mir immer eine große Hilfe. Insbesondere möchte ich mich bei Milla bedanken, die über die gesamte Zeit an meiner Seite war. Durch ihre technische Expertise hatte sie einen erheblichen Anteil daran, dass diese Arbeit nicht an Layoutanforderungen scheiterte.