

Aus der Hals-, Nasen-, Ohrenklinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Effekte von kaltem atmosphärischem Plasma auf solide Tumore *in ovo*,
eine explorative Arbeit am HET-CAM Modell

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Philipp Kugler
aus Waiblingen

Mainz, 2022

Tag der Promotion: 27.03.2023

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	VIII
1 Einleitung und Ziele der Dissertation.....	1
2 Literaturdiskussion	3
2.1 Plasma	3
2.1.1 Einleitung und Grundlagen	3
2.1.2 Plasmaquellen und Technik.....	4
2.1.3 Interaktion von CAP mit biologischen Systemen	5
2.1.3.1 UV-Strahlung.....	6
2.1.3.2 Reaktive Spezies und oxidativer Stress	7
2.1.4 CAP in der klinischen Anwendung.....	9
2.1.5 CAP in der onkologischen Forschung.....	9
2.1.5.1 Theorien der Apoptoseinduktion durch CAP	10
2.1.5.2 Theorien zur Selektivität von CAP	12
2.1.5.3 Immunstimulation durch CAP	14
2.1.5.4 CAP und Angiogenese	16
2.1.5.5 Wirkung von CAP auf solide Tumore	17
2.2 Tumormodelle in der präklinischen Forschung.....	18
2.2.1 Einleitung.....	18
2.2.2 Tumormikromilieu und Angiogenese	19
2.2.3 Zellkultur und dreidimensionale Modelle <i>in vitro</i>	20
2.2.4 Modelle solider Tumore <i>in vivo</i>	22
2.3 Das HET-CAM-Modell.....	23
2.3.1 Embryonalentwicklung des Huhns.....	24
2.3.2 Die Chorion-Allantois-Membran (CAM)	26

2.3.3	Einsatz des HET-CAM-Modells in der onkologischen Forschung.....	28
2.4	CAP-Versuche am HET-CAM-Modell.....	30
3	Material und Methoden.....	32
3.1	Material	32
3.1.1	Plasmagerät miniFlatPlaSter®.....	32
3.1.2	Zelllinie HuH7	33
3.1.3	Hühnereier	34
3.1.4	Chemikalien, Antikörper und Lösungen	35
3.1.5	Geräte und Werkzeuge.....	36
3.1.6	Verbrauchsmaterialien	38
3.1.7	Software	39
3.2	Methoden	40
3.2.1	Zellkultur	40
3.2.1.1	Passagieren der Zellen	40
3.2.1.2	Kryokonservierung	41
3.2.1.3	Herstellung von 3D-Zellkulturen mit Matrigel®	41
3.2.2	Das Chorion-Allantois-Membran Modell	43
3.2.2.1	Inkubation.....	44
3.2.2.2	Eröffnung der Eischale	44
3.2.2.3	Besiedelung der CAM	45
3.2.3	Behandlung mit CAP	46
3.2.4	Präparations- und Einbetttechnik.....	47
3.2.5	Histologie.....	48
3.2.5.1	Paraffineinbettung	48
3.2.5.2	HE-Färbung.....	49
3.2.5.3	Immunhistochemische Färbungen	50
3.2.6	Mikroskopie und Auswertung der Schnitte.....	52
3.2.6.1	Hämatoxylin-Eosin (HE)	52

3.2.6.2	Aktivierte Caspase 3	53
3.2.6.3	α -Smooth Muscle Antigen (α -SMA).....	55
3.2.7	Quantitative <i>real-time</i> PCR	56
3.2.8	<i>In ovo</i> -Sonographie	57
3.2.9	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie.....	59
3.2.10	Statistische Auswertung	60
4	Ergebnisse	61
4.1	Ereigniszeitanalysen des CAM-Modells	63
4.1.1	Überleben	63
4.1.2	Eintrübung der CAM	64
4.2	Immunhistochemie	66
4.2.1	Apoptotische Zellen im gesamten Tumorschnitt	66
4.2.2	Apoptotische Zellen nach Gewebetiefe	68
4.2.3	Apoptotische Zellen nach Behandlungszeit	70
4.2.4	Vaskularisierung des Tumorgewebes.....	71
4.3	Quantifizierung der VEGF-Expression	73
4.4	Sonographische Untersuchung der Tumore.....	74
4.5	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	76
5	Diskussion	78
5.1	Verträglichkeit der CAP-Behandlung.....	78
5.2	Effekte von CAP auf Tumorzellen	79
5.2.1	Die Frage der Eindringtiefe	80
5.2.2	Die Frage der Dosis.....	81
5.3	Effekte von CAP auf TumorgefäÙe und Mikrozirkulation.....	83
5.3.1	GefäÙdichte und Angiogenese	84
5.3.2	GefäÙpermeabilität	85
5.3.3	Mikrozirkulation.....	89
5.4	Limitationen	91

6	Zusammenfassung.....	94
7	Literaturverzeichnis.....	96
	Danksagung.....	IX
	Tabellarischer Lebenslauf.....	XI

Abkürzungsverzeichnis

α -SMA	<i>α-Smooth-Muscle-Antigen</i>
ACTA2	<i>actin alpha 2</i>
AK	Antikörper
AFP	Alpha-Fetoprotein
Apaf-1	<i>apoptotic protease activating factor-1</i>
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	<i>Adenosin Triphosphat</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CAM	Chorion-Allantois-Membran
CAM-Assay	Chorion-Allantois-Membran-Assay
CAP	<i>Cold atmospheric Plasma</i>
μ CAP	<i>Micro CAP Device</i>
CDX	<i>cell line derived xenograft</i>
CRT	Calreticulin
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAMP	<i>Damage Associated Molecular Patterns</i>
DBD	<i>Dielectric Barrier Discharger</i>
DETiP	<i>depth of tissue penetration</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Desoxyribonucleinacid</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ECM	Extrazellulärmatrix (<i>extracellular matrix</i>)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
GEM	<i>genetically engineered mice</i>
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIF-1 α	<i>hypoxia-inducible factor-1a</i>
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
Hz	Hertz

ICD	<i>immunogenic cell death</i>
ICNIRP	<i>International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection</i>
mM	millimolar
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂	Stickstoffdioxid
NOD	<i>non-obese diabetic</i>
O ₃	Ozon
8-OHdG	8-Hydroxydesoxyguanosin
PAM	plasmaaktiviertes Medium
PAL	plasmaaktivierte Ringer-Laktat-Lösung
PBS	Phosphate buffered saline
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDX	<i>patient derived xenograft</i>
PI3K	<i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>
ppm	<i>parts per million</i>
P/S	Penicillin/Streptomycin
qPCR	quantitative <i>real-time</i> Polymerase Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RONs	<i>reactive oxygen and nitrogen species</i>
RNS	<i>reactive nitrogen species</i>
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SMD	<i>Surface Micro Discharge</i>
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TBS/Tween	<i>tris-buffered saline with Tween20</i>
TE	Trypsin-EDTA
TNF-R	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRITC	Tetramethylrhodamin Isothiocyanat
U/min	Umdrehungen pro Minute
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mechanismen der Apoptoseinduktion durch CAP	12
Abbildung 2: Embryo und extra-embryonalen Membranen im Hühnerei	26
Abbildung 3: Lichtmikroskopische Aufnahme der CAM.....	28
Abbildung 4: Plasmagerät miniFlatPlaSter®	33
Abbildung 5: Adhärente HuH7-Zellen in der Zellkultur	34
Abbildung 6: Zeitplan des CAM-Modells	43
Abbildung 7: Eröffnung der Eischale	45
Abbildung 8: Fotoserie zur CAP-Behandlung.....	47
Abbildung 9: Anordnung der ROI in den Schnitten mit akt. Caspase 3-Färbung.....	54
Abbildung 10: Apoptotische Zellen im Tumorgewebe	54
Abbildung 11: Kategorien zur Bewertung der Tumolvaskularisierung.....	55
Abbildung 12: Schematische Darstellung der in ovo-Sonographie.....	58
Abbildung 13: Überlebenszeitanalysen	64
Abbildung 14: CAM-Status and Tag 14 der Inkubation	65
Abbildung 15: Ereigniszeitanalysen der CAM-Trübung.....	66
Abbildung 16: Boxplot apoptotischer Zellen pro ROI.....	67
Abbildung 17: Apoptotische Zellen nach Gewebetiefe und Behandlungszeit.....	69
Abbildung 18: Einfluss der Behandlungszeit auf mediane Apoptosenzahl	71
Abbildung 19: Häufigkeitsanalyse der Tumolvaskularisierung nach Kategorien	72
Abbildung 20: Blutgefäßdichte im Tumorgewebe	73
Abbildung 21: Mittlere relative VEGF-A-Genexpression.....	74
Abbildung 22: Sonographische Untersuchung der Tumore.....	75
Abbildung 23: Tumore mit assoziierten Blutgefäßen in der CAM	76
Abbildung 24: Veränderung des segmentalen Blutflusses	77

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien, Antikörper und Lösungen	35
Tabelle 2: Geräte und Werkzeuge.....	36
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien.....	38
Tabelle 4: Software	39
Tabelle 5: Protokoll zur Paraffineinbettung.....	48
Tabelle 6: Protokoll zur Hämatoxylin-Eosin-Färbung	49
Tabelle 7: Protokoll der immunhistochemischen Färbungen.....	51
Tabelle 8: In der qPCR eingesetzte Primer	56
Tabelle 9: Übersicht aller Versuchsdurchgänge am CAM-Modell	61
Tabelle 10: Stichprobengrößen der Ereigniszeitenanalysen	63
Tabelle 11: Deskriptive Statistik der Apoptosen pro ROI.....	67
Tabelle 12: Stichprobengrößen (N ROI) je Behandlungsgruppe und Tiefe	68

1 Einleitung und Ziele der Dissertation

Kaltes atmosphärisches Plasma (CAP) als teilionisiertes Gas emittiert einen reaktiven Mix aus geladenen Teilchen, reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RONS) und elektromagnetischer Strahlung. Es lässt sich mit Plasmageräten gezielt lokal erzeugen und ermöglicht durch die Generierung bei Raumtemperatur und atmosphärischem Druck eine Anwendung an biologischen Systemen [1]. Hierdurch ergibt sich eine Vielzahl potenzieller Anwendungsmöglichkeiten von CAP in der Medizin. Unter anderem konnte eine antikanzeröse Wirkung von CAP nachgewiesen werden, welche auf die Funktion kalten Plasmas als konstante Quelle von RONS zurückgeführt wurde [1, 2]. Bei Exposition verschiedener Gewebe gegenüber CAP zeigte sich zudem eine potenziell selektive Wirkung gegenüber malignen Zellen [3]. Dies macht CAP zu einem vielversprechenden neuen Therapeutikum in der Onkologie, welches bei nur geringen Auswirkungen auf gesundes Gewebe gezielt gegen maligne Zellen eingesetzt werden kann.

Die Wirkung von CAP auf maligne Zellen unterschiedlichster Zelllinien wurde bereits in vielen *in vitro* Studien beschrieben. Auf Grund der fehlenden Dreidimensionalität einer Zellkultur lassen sich die beschriebenen Effekte jedoch nur eingeschränkt auf die CAP-Behandlung solider Tumore übertragen. Darüber hinaus können *in vitro* Versuche an Zelllinien nur unzureichend das komplexe Zellkonglomerat eines lebenden Organismus nachbilden. Zur Klärung, ob sich die bekannten Effekte von CAP in gleichem Maße auf die Behandlung von soliden Tumoren in einem komplexen Organismus übertragen lassen, soll diese Arbeit einen Beitrag leisten.

Als methodische Grundlage kam hierfür das HET-CAM-Modell (*Henn's-Egg-Test/Chorion-Allantois-Membrane-Assay*) zum Einsatz, welches das Wachstum eines soliden Tumors *in ovo*, dessen Versorgung über das Gefäßnetz der Chorionallantoismembran (CAM) und ferner dessen direkte Behandlung mit CAP ermöglichte. Anschließend wurde mittels immunhistochemischer Färbungen untersucht, welche Auswirkungen die Behandlung mit CAP auf das Tumorgewebe und die den Tumor versorgenden Blutgefäße hatte. Durch die Analyse von Überlebensraten und morphologischen Veränderungen des umliegenden CAM-Gewebes wurden außerdem Rückschlüsse auf die Verträglichkeit und etwaige Toxizität der CAP-Behandlung gezogen. Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit lag auf

der Untersuchung möglicher Effekt einer CAP-Behandlung auf die tumor-assoziierten Blutgefäße, da diese eine zentrale Rolle in der Tumorprogression und der Entwicklung neuen Therapiestrategien zur Behandlung solider Tumore einnehmen.

2 Literaturdiskussion

2.1 Plasma

2.1.1 Einleitung und Grundlagen

In der Physik kann Materie in vier unterschiedlichen Aggregatzuständen beschrieben werden. Neben dem festen, flüssigen und gasförmigen Zustand existiert Materie auch als Plasma. Um ein Gas in Plasma zu überführen, muss diesem immer weiter Energie zugeführt werden. In der Natur lässt sich dieser Zustand in Blitzen oder Nordlichtern beobachten. Auf atomarer Ebene kommt es im Plasmazustand zu starken Ladungsverschiebungen, teilweiser oder ganzer Ionisation von Teilchen und Loslösung von Elektronen aus den Atomen und Molekülen. Plasma wird daher häufig als ionisiertes Gas bezeichnet. Dies macht es nicht nur zu einem leitfähigen Medium, sondern erklärt auch dessen hohe Reaktivität. So emittieren Plasmen elektromagnetische Strahlung und enthalten reaktive Ionen, Elektronen, sowie Radikale [4, S. 4-6]. Diese Eigenschaften werden in der Plasmatechnologie genutzt. Heißes Plasma wird bereits seit langer Zeit in der Metallverarbeitung, etwa zum Schweißen, aber auch in der Medizin zum kauterisieren von Gewebe oder Sterilisieren von Instrumenten eingesetzt [5]. Durch die Entwicklung von kalten Plasmen, welche bei Raumtemperatur generiert werden können, ergaben sich jedoch viele neue Anwendungsbereiche. Heute werden kalte Plasmen in zahlreichen technischen und biomedizinischen Bereichen eingesetzt. Etwa in Energiesparlampen und Bildschirmen zur Erzeugung von Licht und bewegten Bildern, oder in der Bearbeitung und Reinigung von Oberflächen. Auch bei der Oberflächenmodifikation von Implantaten kommen kalte Plasmen zum Einsatz, wodurch die Adhäsion von Zellen an die Implantate moduliert werden kann [6]. Des Weiteren ist die Anwendung von Plasma zur Sterilisation und Desinfektion von Oberflächen und Geräten etabliert. Plasma bietet hier den Vorteil auch gegen multiresistente Mikroorganismen und infektiöses organisches Material wie Prionen wirksam zu sein [7]. Durch die Erzeugung von kaltem Plasma bei niederen Temperaturen und atmosphärischem Druck wurde letztendlich auch die Anwendung an biologischen Systemen ohne letale Folgen ermöglicht. Dies begründete die Plasmamedizin mit ihren breit gefächerten Anwendungsbereichen von der Behandlung chronischer Wunden [8], über die kosmetischen Aufhellung von Zähnen [9], bis hin zum experimentellen Einsatz in der Tumorthherapie [2].

2.1.2 Plasmaquellen und Technik

Plasmen können sich in ihren Eigenschaften sehr stark unterscheiden. Dies hängt zunächst davon ab, in welchem Gasgemisch sie entstehen. Je nachdem, ob ein Trägergas wie Argon verwendet wird, oder das Plasma direkt in der Raumluft entsteht, kann sich die Zusammensetzung der einzelnen reaktiven Komponenten stark verändern. Bei der Entstehung in Raumluft spielt zudem die enthaltene Feuchtigkeit eine wichtige Rolle und kann die Zusammensetzung der Wirkkomponenten modulieren [10].

Unterschieden wird zunächst, bei welchem Druck das Plasma entsteht. Hier kann zwischen Niedrig- und Hochdruckplasmen, sowie atmosphärischen Plasmen differenziert werden. Letztere entstehen bei normalem, atmosphärischem Druck, meist durch die Entladung von hohen Spannungen. Zudem kann zwischen heißem und kaltem Plasma differenziert werden. Diese unterscheiden sich in der relativen Temperatur von Elektronen, Ionen und Neutronen. In heißen Plasmen ist die Temperatur dieser Teilchen ungefähr gleich hoch, was eine sehr hohe Temperatur des gesamten Plasmas begründet. In kalten Plasmen erhitzen sich hingegen nur die kleineren Elektronen und befinden sich auf einem deutlich höheren Temperaturniveau als Ionen und ungeladene Teilchen. Da die Elektronen nur einem sehr geringen Teil der Masse des Plasmas entsprechen, verändert sich die Temperatur des gesamten Plasmas kaum, auch wenn sich die Elektronen sehr stark erhitzen [11].

Das für diese Arbeit relevante CAP kann im Wesentlichen auf drei technisch unterschiedliche Arten erzeugt werden. Allen Geräten ist hierbei gemein, dass ein gepulstes Hochvoltsignal zwischen zwei Elektroden über ein zwischenliegendes Medium entladen wird. Durch diese blitzartige Entladung kommt es in dem umliegenden Gasgemisch zur Entstehung von kaltem Plasma. Die Plasmaquellen unterscheiden sich hierbei in der Beziehung der zwei verwendeten Elektroden zueinander [12]:

Direkte Plasmaquellen benutzen die Haut, oder das zu behandelnde Gewebe als Gegenelektrode, so dass der generierte Strom durch den Körper fließt. Die am häufigsten verwendete Technologie hierfür sind die *Dielectric Barrier Discharger* (DBD). Hierbei entlädt sich die Spannung zwischen Gewebe und der im Gerät verbauten Elektrode, wodurch kaltes Plasma im Raum zwischen dem DBD-Gerät und

dem zu behandelten Gewebe entsteht. Neben der Wirkung durch das CAP selbst sind somit auch Effekte des durch das Gewebe fließenden Stroms zu erwarten [13].

Bei indirekte Plasmaquellen entsteht das Plasma zwischen zwei im Gerät verbauten Elektroden und wird anschließend durch einen Gasfluss in das Anwendungsgebiet transportiert. Als Trägergas kommen Edelgase wie Argon oder Helium zum Einsatz. Die verwendeten Geräte unterscheiden sich durch das verwendete Trägergas und die Größe des austretenden Plasmajets. Dieser reicht von feinen Helium-Plasmanadeln mit einem Durchmesser von unter 1 mm [14], bis hin zur Argon-Plasma-Fackel mit einem Plasmajet von 3,5 cm Durchmesser [15]. Die Länge des Plasmakegels kann ebenfalls durch die Veränderung des Gasflusses und der angelegten Spannung beeinflusst werden [16].

Hybrid-Plasmaquellen kombinieren die Technik von direkten Plasmaquellen, mit einer weiteren verbauten Gitterelektrode. So fließt genau wie bei indirekten Plasmen kein Strom durch das zu behandelnde Gewebe, es ist aber ebenfalls kein Gasfluss notwendig. Das gepulste Hochvoltsignal entlädt sich in Mikroentladungen über eine zwischen den Elektroden liegende Epoxidglasfaser- oder Teflonplatte und lässt an der Seite der geerdeten Gitterelektrode kaltes Plasma entstehen. Diese Technik wird *Surface Micro Discharge* (SMD) genannt [17]. Das kalte Plasma und die entstandenen reaktiven Teilchen gelangen anschließend durch Diffusion an die Oberfläche des zu behandelten Gewebes. Bei dem in den Versuchen verwendete Plasmagerät *miniFlatPlaSter*[®] handelt es sich um ein solches SMD-Gerät. Der genaue Geräteaufbau und die freigesetzten Wirkkomponenten sind im Materialteil dieser Arbeit unter Abschnitt 3.1.1 beschrieben.

2.1.3 Interaktion von CAP mit biologischen Systemen

Kalte atmosphärische Plasmen emittieren typischerweise 10^9 bis 10^{10} reaktive Komponenten pro cm^2 und Sekunde [11]. Die biologisch relevanten Wirkkomponenten von CAP sind hierbei vor allem die entstehenden RONS und UV-Strahlung [12]. Die Generierung dieser Komponenten läuft nach Metelmann et al. nach folgenden Grundvorgängen ab [4, S. 20]:

1. Ionisation von Atomen oder Molekülen eines selbst nicht unmittelbar wirksamen Gases (Verwendete Trägergase wie Argon oder Helium, Gasgemische wie

- Raumluft). Die Ionisation geschieht wie zuvor beschrieben durch die Zufuhr elektrischer Energie.
2. Wechselwirkung der ionisierten Atome, Moleküle und freien Elektronen mit anderen Atomen und Molekülen. Dies geschieht sowohl in der Plasmaphase als auch in angrenzenden Medien wie atmosphärischer Luft, Flüssigkeiten und Oberflächen. Durch diese Wechselwirkungen werden reaktive Spezies wie RONS generiert.
 3. Als zusätzliches Ergebnis der stattfindenden Ionisierungs- und Anregungsprozesse erfolgt die Emission elektromagnetischer Strahlung. Dies kann in Form von UV-, Infrarot-, oder sichtbarem Licht, sowie Wärmestrahlung und elektromagnetischen Feldern geschehen.

2.1.3.1 UV-Strahlung

Die Effekte von UV-Strahlung auf Gewebe sind stark abhängig von Wellenlänge und kumulativer Dosis. Eine geringe Dosis an UVB-Strahlung wird beispielsweise für eine optimale Vitamin D-Synthese in der menschlichen Haut benötigt [18]. Eine dauerhaft zu hohe UV-Exposition kann jedoch akute und chronische Hautreaktionen auslösen, die vom Sonnenbrand bis zu benignen und malignen chronischen Lichtschäden der Haut reichen [19]. Das Schädigungspotenzial von UV-Strahlung hängt dabei von dessen Wellenlänge und Energie ab. Durch die kürzeste Wellenlänge von 100–280 nm und im Vergleich höchste Energie kann UVC-Strahlung eine Vielzahl von strukturellen Veränderungen an Makromolekülen wie DNA und Proteinen verursachen und wird daher als stark kanzerogen eingestuft [19]. Die UVC-Strahlung der Sonne wird jedoch unter normalen Bedingungen fast komplett von der Ozonschicht der Atmosphäre absorbiert und erreicht nicht die Erdoberfläche. Die UV-Strahlung im Sonnenlicht besteht überwiegend aus UVA-Strahlung mit 320–400 nm Wellenlänge und UVB-Strahlung mit 280–320 nm Wellenlänge. Auf zellulärer Ebene verursacht UV-Strahlung sowohl direkte als auch indirekte Schäden. Direkte Schäden entstehen durch die Absorption der Strahlungsenergie von Makromolekülen vorwiegend durch Exposition gegenüber UVB-Strahlung. Hierbei können etwa in der DNA Strangbrüche und molekulare Veränderungen sowie Konformationsänderungen in Polypeptidketten ausgelöst werden [19]. Indirekte Zellschäden durch UV-Strahlung entstehen durch die Induktion von intrazellulären reaktiven Spezies typischerweise durch die Exposition gegenüber UVA-Strahlung [20], was zu oxidativen Schäden an Lipiden und der DNA

führen kann [19]. Für den klinischen Einsatz von CAP ist demnach wichtig, eine genaue Analyse des UV-Spektrums durchzuführen und den kurzwelligen und energiereichen UVC-Anteil möglichst gering zu halten. Zudem müssen bei Anwendungen an menschlicher Haut die Empfehlungen der *International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection* (ICNIRP) beachtet werden, welche einen Tagesgrenzwert von 30 J m^{-2} für Wellenlängen von 180 bis 400 nm vorgibt [21].

2.1.3.2 Reaktive Spezies und oxidativer Stress

Die biologischen Effekte von CAP an Zellen und Geweben sind größtenteils auf die von Plasma konstant emittierten reaktiven Spezies zurückzuführen. Die Auswirkungen auf biologische Systeme wird dabei zu einem erheblichen Teil über Veränderungen in der flüssigen Zellumgebung vermittelt [4, S. 21]. Zu den von CAP typischerweise freigesetzten reaktiven Komponenten zählen sauerstoffbasierte reaktive Spezies (ROS) wie Hydroxylradikale ($\text{HO}\cdot$), Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$), Hyperoxidanionen ($\text{O}_2\cdot^-$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Ozon (O_3) [22-25]. Außerdem werden stickstoffbasierte reaktive Spezies (RNS) emittiert, darunter Stickstoffmonoxid (NO), Stickstoffdioxid (NO_2), Ammoniak (NO_3), Distickstoffmonoxid (N_2O) und Distickstofftetroxid (N_2O_4) [22-26]. Diese reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies beeinflussen über die temporär und lokal erhöhte Konzentration von redoxaktiven Substanzen in der Zellumgebung die Balance des zellulären Redoxsystems [27].

Lange wurden RONS rein als schädliches Abfallprodukt des Zellmetabolismus gesehen, die in der Pathogenese vieler Erkrankungen eine Rolle spielen. So wurden sie beispielsweise im Alterungsprozess des Menschen als ein ausschlaggebender Faktor für Degeneration und Alterserkrankungen identifiziert [28]. Doch auch die wichtige Rolle reaktiver Spezies im Abwehrmechanismus des Immunsystems ist seit bald einem Jahrhundert bekannt. So wurde bereits 1933 der *respiratory burst* von phagozytierenden Leukozyten beschrieben [29]. Inzwischen ist gut untersucht, dass reaktive Spezies auch in einer Vielzahl von physiologischen Prozessen vorkommen. Sie sind demnach nicht nur Abfallprodukt des Zellmetabolismus, sondern erfüllen in der Zelle wichtige Funktionen und sind als Botenstoffe in Signalkaskaden aktiv, die in nahezu allen physiologischen Prozessen des menschlichen Organismus eine Rolle spielen. Hierzu gehören unter anderem die Blutgerinnung, Regulation des Gefäßtonus, Angiogenese, Entzündungsgeschehen und die Impulsweiterleitung in Nervenzellen

[12]. Die Effekte von RONS sind hierbei stark von deren Konzentration abhängig. Während geringe Konzentrationen von RONS meist förderlich oder sogar notwendig für das Funktionieren von Signalkaskaden sind, geraten Zellen bei zu hohen Konzentrationen in oxidativen Stress, welcher zum Zellzyklusarrest und letztlich zu Apoptose führen kann [12].

Das Konzept des oxidativen Stresses wurde Mitte der 1980er proklamiert. Oxidativer Stress ist demnach ein schädlicher Zustand, welcher sich negativ auf zelluläre Strukturen wie Membranen, Lipide, Proteine, Lipoproteine und DNA auswirken kann. Dieser Zustand entsteht durch ein Ungleichgewicht zwischen oxidativen und antioxidativen Spezies in der Zelle [27]. Ein intrazellulärer Überschuss an Hydroxylradikalen ($\text{HO}\cdot$) und Peroxynitrit (ONOO^-) kann beispielsweise zur Oxidation von Lipiden führen, was die Schädigung von Membranen und Lipoproteine bewirkt [30]. Auch Proteine wie etwa die Na^+/K^+ -ATPase können durch Oxidierung von Seitenkette beschädigt werden, was zu Konformationsänderungen und damit einhergehenden Funktionsverlust oder -beeinträchtigung führt [31]. Der am häufigsten beschriebene oxidative Schaden an der DNA ist die 8-Hydroxydesoxyguanosin (8-OHdG) Formation, welche zur Veränderung epigenetischer Information führen und in der Pathogenese von Karzinomen eine Rolle spielen könnte [32]. Außerdem wird 8-OHdG als Biomarker für oxidativen Stress gesehen, der in Geweben detektiert werden kann [33].

Um sich vor RONS zu schützen und oxidativen Stress zu vermeiden gibt es eine Vielzahl intrazellulärer Schutzmechanismen, welche über Redoxpaare wie Superoxiddismutase, Glutathion und Katalase vermittelt werden. Dieser intrazelluläre „Redoxpuffer“ sorgt für ein reduzierendes Milieu und kann so RONS und Radikale entgiften [31]. Ebenfalls können Reparaturmechanismen wie die Basenexzisionsreparatur (BER) bereits entstandenen Schäden bis zu einem gewissen Grad kompensieren. Wenn dies jedoch nicht mehr suffizient möglich ist, werden in der Zelle abhängig vom Ausmaß der Schäden und den Reparaturmöglichkeiten Prozesse aktiviert, die einen Arrest im Zellzyklus, Seneszenz, Apoptose oder auch Nekrose einleiten [31].

2.1.4 CAP in der klinischen Anwendung

Die Generierung von Plasma bei Raumtemperatur und atmosphärischem Druck ermöglichten es die physikalischen Eigenschaften von CAP und dessen Wirkung auf biologische Systeme für biomedizinische Anwendungen nutzbar zu machen. Hierdurch ergaben sich auch eine Vielzahl von potenziellen Anwendungen in der Klinik. Die bisher etablierten Einsatzverfahren zielen dabei meist auf die antimikrobielle Wirkung von CAP ab. Prokaryonten, Viren und Pilze scheinen empfindlicher gegenüber der von CAP emittierten UV-Strahlung und RONS zu reagieren als gesunde eukaryotische Zellen [12]. CAP wird daher in der Therapie von chronischen Wunden und Ulzera eingesetzt um die mikrobielle Besiedelung der Läsionen zu reduzieren [4, S. 57-86]. Die erste klinische Studie hierzu wurde 2010 von Isbary et al. in München durchgeführt und zeigte eine signifikante Reduktion der bakteriellen Besiedelung bei einer schmerz- und nebenwirkungsfreien Behandlung [8]. Inzwischen wurde in einer Vielzahl von Studien die Wirksamkeit von CAP an unterschiedlichen Wundtypen und Keimbesiedelungen untersucht [34]. Von großem Interesse ist hierbei die antimikrobielle Wirkung von CAP auch gegen multiresistente Keime wie *Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus* (MRSA) [35]. Neben dem primären Ziel mit der CAP-Behandlung eine neue Art der Wunddesinfektion zu entwickeln, zeigten sich im Verlauf zudem weitere, für die Wundheilung förderliche Effekte von CAP, wie eine verstärkte Durchblutung und eine Stimulation von Keratinozyten und Fibroblasten [36].

CAP gilt neben der Behandlung von chronischen Wunden und Ulzera als ein vielversprechendes neues Therapeutikum in vielen Bereichen der Medizin. Diskutiert und erprobt werden unter anderem der Einsatz in der Tumorchirurgie, Implantologie, sowie eine Vielzahl an Anwendungen aus hygienischer Indikation. Einen Überblick über die klinische Einsatzmöglichkeiten von CAP geben Metelmann et al. [4].

2.1.5 CAP in der onkologischen Forschung

Einer der vielversprechendsten zukünftigen Anwendungsbereiche von CAP liegt in der Therapie von Tumorerkrankungen. Kalte Plasmen zeigten sowohl *in vitro*, an einer Vielzahl von Zelllinien, als auch *in vivo* einen antikanzerösen Effekt [1, 2, 37]. Im Gegensatz zu etablierten Therapieansätzen von Tumoren wie der Radiotherapie

handelt es sich bei CAP jedoch um ein potenziell selektives Verfahren, welches maligne Zellen stärker schädigen könnte als unverändertes Gewebe [25]. Die Effekte von CAP an Tumorzellen werden auf die von Plasmen konstant emittierten reaktiven Spezies zurückgeführt. Hierbei wird eine Kombination von direkter Interaktion der RONS mit den Zellen, wie der Induktion von apoptotischen Signalwegen, und indirekter Interaktion, wie der Aktivierung einer Immunantwort und der Veränderung des Mikromilieus vermutet [38]. Die unterschiedlichen Theorien zur Induktion von Zelltod und der beobachteten Selektivität gegenüber Tumorzellen sollen im Folgenden vorgestellt werden.

2.1.5.1 Theorien der Apoptoseinduktion durch CAP

Die pro-apoptotische Wirkung von CAP wird hauptsächlich auf die steigende intrazelluläre Konzentration von RONS und dem damit einhergehenden oxidativen Stress nach einer CAP-Behandlung zurückgeführt. Erhöhte Konzentrationen intrazellulärer RONS nach einer CAP-Exposition konnten sowohl in physiologischen, als auch in malignen Zellen nachgewiesen werden [22]. Die meisten Publikationen gehen hierbei von einer Diffusion der RONS durch Aquaporine in der Zellmembran aus, da schon wenige Minuten nach einer CAP-Exposition erhöhte intrazelluläre RONS-Konzentrationen gemessen werden konnten [22, 39]. Die Rolle des intrazellulären RONS-Anstiegs als Auslöser der antikanzerösen Effekte konnte durch die ausbleibende Wirkung von CAP nach Vorbehandlung der Zellen mit Antioxidantien mehrfach bestätigt werden. Hierzu kamen Antioxidantien wie N-Acetylcystein [40, 41], D-Mannitol [42] oder Rotenon [22] zum Einsatz, welche die intrazelluläre RONS-Konzentration auf einem niedrigen Niveau hielten und damit eine CAP-Wirkung verhinderten.

Die RNS in Nähe der Zellmembran können meist von einer membrangebundenen Katalase zu unschädlichen Produkten umgesetzt werden. Diese Katalase wird in vielen malignen Zellen überexprimiert, welche so oxidative Schäden und RONS-bedingten Zelltod verhindern könnte. CAP scheint über die Generierung von Singulett-Sauerstoff im Extrazellularraum diese Katalase selektiv inaktivieren zu können [43]. Hierdurch könnte die intrazelluläre RONS-Konzentration weiter steigen. Auch die erhöhte Expression der membranständigen Nox2 (NADPH-Oxidase 2) nach einer

CAP-Exposition könnte durch die vermehrte Generierung intrazellulär Hyperoxide hierzu beizutragen [44].

Beim Anstieg der intrazellulären Konzentration reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies kommt es unter anderem zur Einleitung von Signalkaskaden, welche in Apoptose oder Zellzyklusarrest resultieren können. Die im Folgenden beschriebenen Wege der Apoptoseinduktion sind in Abbildung 1 dargestellt. Beobachtet wurde zunächst der auf den Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNF-R) basierende Apoptoseweg [40]. Der intrinsische oder mitochondriale Weg der Apoptose ist jedoch der meistbeschriebene Signalweg, welcher nach einer CAP-Behandlung zum Zelltod führt. Dieser kann durch Schäden an der DNA und den Mitochondrien ausgelöst werden. Am häufigsten wurden hierbei Doppelstrangbrüche beobachtet [26, 39]. Als ein wichtiger Marker für Doppelstrangbrüche der DNA gilt das phosphorylierte Histon γ -H2AX, welches nach einer Behandlung mit CAP erhöht gemessen werden konnte [23, 26, 45]. Die Phosphorylierung des H2AX-Histons zu γ -H2AX wird hierbei von der Serin-Proteinkinase ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) katalysiert, welche zuvor durch die DNA-Doppelstrangbrüche aktiviert wurde. Eine erhöhte Expression von ATM in malignen Zellen nach einer CAP-Exposition ist ebenfalls beschrieben worden [46]. Das aktivierte ATM kann zudem p53 phosphorylieren, was einen wichtigen Schritt im mitochondrialen Weg der Apoptose darstellt. Das aktivierte p53 löst die Expression von pro-apoptotischen Faktoren der Bcl-2 Familie wie Bax (*Bcl-2 associated X protein*), NOXA (*lat. ‚Schaden‘*) und Puma (*p53 upregulated modulator of apoptosis*) aus [25, 47]. Diese wiederum bedingen die Freisetzung von Cytochrom c und anderen mitochondrialen Intermembranproteinen in das Zytosol [25]. Im Zytosol bindet Cytochrom c an das Apaf-1-Protein (*apoptotic protease activating factor-1*) und bildet so das Apoptosom [25]. Das Apoptosom kann nun die Caspase 9 aktivieren, welche im Anschluss kaskadenartig eine Reihe weiterer Caspasen aktiviert. Diese Enzyme vermitteln schlussendlich eine Vielzahl apoptotischen Ereignissen wie die Fragmentierung der DNA [24] und der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials [42, 45]. Die zusätzliche Aktivierung von p21 durch das phosphorylierte p53 konnte in einigen malignen Zelllinien nach CAP-Exposition nachgewiesen werden [46, 48]. Das aktivierte p21 kann mehrere Arten des Zellzyklusarrest auslösen [47]. Am häufigsten beschrieben ist hierbei der Zellzyklusarrest am G2/M Checkpoint [49].

Molecular Mechanism

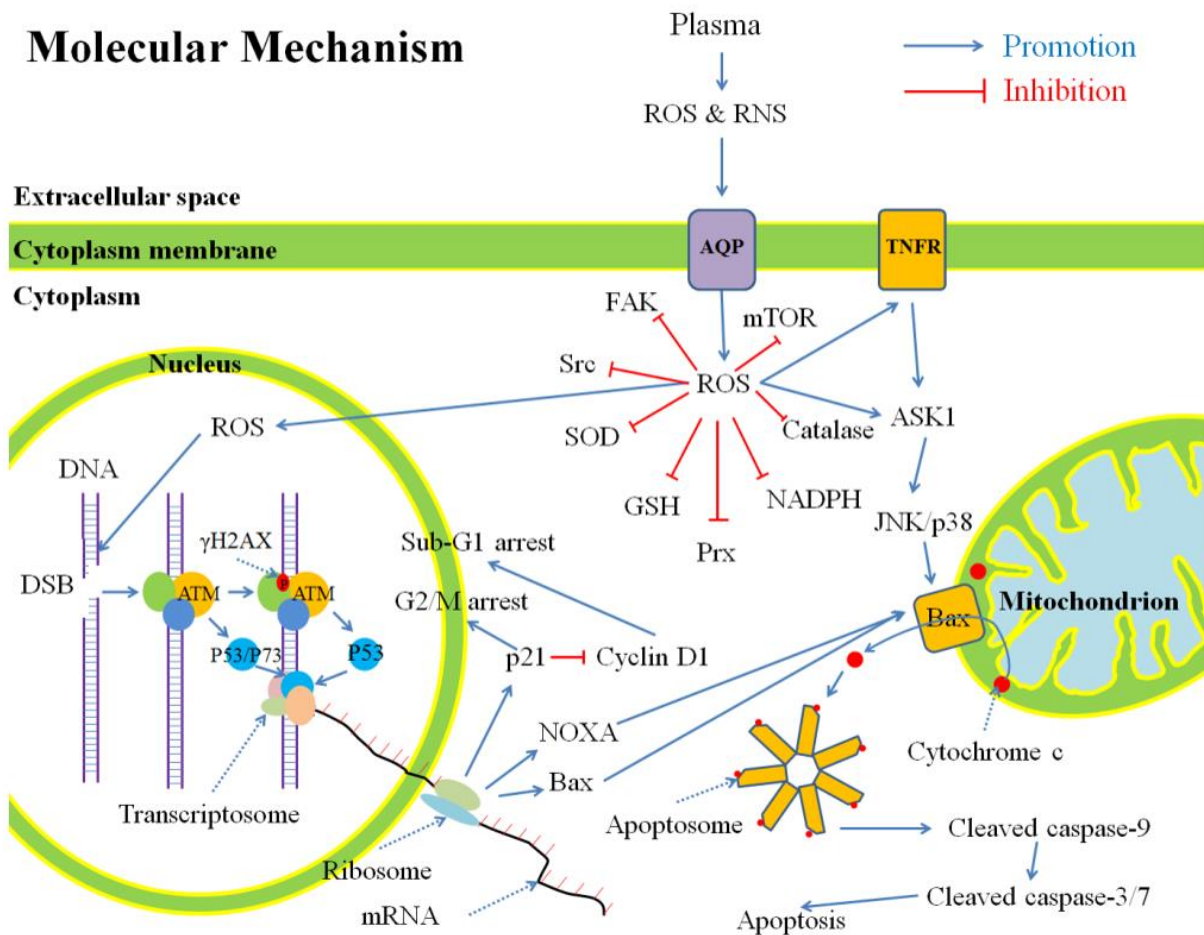


Abbildung 1: Mechanismen der Apoptoseinduktion durch CAP, Lizenz: Verändert nach Yan et al. [25], CC BY 3.0

2.1.5.2 Theorien zur Selektivität von CAP

Die potenzielle Selektivität der Effekte von CAP gegenüber malignen Zellen im Vergleich zu unveränderten Zellen hat das Interesse in der onkologischen Forschung weiter gesteigert. Zur Erklärung der selektiven Wirkung von CAP gibt es mehrere Theorien:

Zunächst wird angenommen, dass maligne Zellen bedingt durch ihren höheren Metabolismus eine bereits basal höhere Konzentration an intrazellulären RONS als unveränderte Zellen aufweisen. Dies macht maligne Zellen empfindlicher gegenüber steigenden Konzentrationen reaktiver Spezies und dem damit einhergehenden oxidativen Stress [38, 50]. So könnten Tumorzellen bei einer CAP-Exposition schneller eine schädliche intrazelluläre RONS-Konzentration erreichen, welche in Apoptose, Zellzyklusarrest und Nekrose enden kann. Signifikant höhere RONS-Konzentrationen

konnten in malignen Zellen im Vergleich zu homologen unveränderten Zellen mehrfach beschrieben werden [22, 40]. Hierbei fiel jedoch auf, dass der Anstieg der intrazellulären RONS-Konzentration bei einer CAP-Exposition in malignen Zellen sehr viel schneller verlief als in unveränderten Zellen. Dies begründete eine weitere Theorie zur Selektivität von CAP, welche auf einer höheren Dichte von Aquaporinen und die damit einhergehende schnellere Diffusion durch die Zellmembran in malignen Zellen beruht.

Aquaporine wurden zunächst als Kanäle in der Zellmembran identifiziert, welche selektiv Wasser oder Glycerol transportieren. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass gewisse Isoformen der Aquaporine auch geladene Moleküle wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in die Zelle transportieren können. Hieran sind vor allem die Aquaporine 1, 3 und 8 beteiligt [51]. Es wird nun angenommen, dass maligne Zellen eine höhere Expression von Aquaporinen in ihrer Zellmembran aufweisen als unveränderte Zellen [3, 52]. Dies könnte einen schnelleren intrazellulären Anstieg an RONS erklären. Die Aquaporintheorie konnte durch Versuche von Yan et al. [53] gestützt werden, die zeigten, dass bei einer Inhibition der Aquaporin 8-Expression mittels *small interfering RNA* (siRNA) oder einer Blockierung der Aquaporine mit Silbernitrat ($AgNO_3$) eine CAP-Wirkung ausblieb.

Eine weitere Theorie sieht die Ursache der verstärkten Diffusion durch die Zellmembran begründet in der Oxidation von Lipiden der Phospholipid-Bilayer. Demnach nimmt die Lipidordnung in Biomembranen stetig ab, wenn Lipide peroxidiert werden. Wenn eine große Zahl an Phospholipiden einer Membranregion oxidiert sind, könnten Poren in der Membran entstehen, durch die RONS ins Zellinnere diffundieren [54]. Hierbei spielt Cholesterol für die Stabilität und Ordnung der Lipide in der Membran eine wichtige Rolle. Cholesterol ist das häufigste Lipid in der Zellmembran und bestimmt dessen Stabilität und Fluidität [55]. Ein hoher Gehalt an Cholesterol in der Membran kann die Ordnung der Phospholipide und die damit die Stabilität der Membran erhöhen, wodurch die Bildung von Poren verhindert werden könnte [56]. Maligne Zellen weisen eine durchschnittlich geringere Konzentration von Cholesterol in ihren Membranen auf als unveränderte Zellen. In der Literatur wird für benigne Zellen ein molares Verhältnis von Cholesterol zu Phospholipiden von 0,6 bis 1,0 angegeben, während das Verhältnis bei malignen Zellen deutlich niedriger, bei 0,31 bis 0,46 bestimmt wurde [54, 55]. Durch die geringere Konzentration an Cholesterol wäre die Membran von Tumorzellen demnach empfindlicher gegenüber oxidativem Stress und schneller durch

extrazelluläre RONS geschädigt. Van der Paal et al. [57] konnten außerdem durch Computersimulationen zeigen, dass die Diffusion für RONS durch eine Membran mit geringen Cholesterolanteilen energetisch günstiger ist, als durch eine Biomembran mit hohen Cholesterolanteilen. Dies spricht erneut für einen protektiven Faktor des Cholesterols in der Zellmembran gegenüber reaktiven Spezies.

Keidar et al. [37] proklamieren zudem, dass Tumorgewebe empfindlicher gegenüber einer CAP-Exposition reagieren, da sich ein größerer Anteil an Zellen in der S-Phase (Synthese-Phase) des Zellzyklus befinden. Der Zellzyklus beschreibt die nacheinander ablaufenden Schritte der Zellproliferation. Startend in der G1-Phase (*Gap-1-Phase*), über die S-Phase zur G2-Phase (*Gap-2-Phase*). In der anschließenden M-Phase (Mitose-Phase) erfolgt die Aufteilung der Zellen in zwei Tochterzellen, welche nun wieder in die G1-Phase übergehen. Zwischen S- und G2-Phase sowie zwischen G2- und M-Phase befinden sich *Checkpoints*, an denen überprüft wird, ob die zuvor erfolgte Phase vollständig und fehlerfrei abgeschlossen wurde. Keidar et al. verglichen in ihrer Studie Wildtyp-Keratinocyten mit zwei Hautkrebszelllinien (Papillomzelllinie 308 und Karzinom-Zelllinie PAM212) und konnten zeigen, dass sich bei Wildtypzellen prozentual deutlich weniger Zellen (~10%) in der S-Phase befanden als bei veränderten Zelllinien (308: ~50%, PAM212: ~45%). Eine CAP-Behandlung der Zellen verzögerte das Fortschreiten im Zellzyklus und steigerte die Anzahl der veränderten Zellen am G2/M Checkpoint um das 2 bis 3-Fache, bei den Wildtypzellen nur um ~25%. Außerdem korrelierte dies mit einer zeitgleich erhöhten Expression von γ H2AX, einem Marker für oxidativen Stress, welcher durch DNA-Schäden in der S-Phase ansteigt [49]. Demnach könnte CAP durch oxidative Schäden an der DNA vor allem in Zellen der S-Phase einen Arrest im Zellzyklus und bei unzureichenden Reparaturmechanismen die Induktion von Apoptose bewirken.

2.1.5.3 Immunstimulation durch CAP

Die gezielte Aktivierung einer Immunantwort gegen Tumorzellen in Form einer Immuntherapie stellt eine wichtige Säule der modernen Tumorthherapie dar. In den allermeisten Fällen werden mutierte Zellen vom Immunsystem allerdings selbständig erkannt und eliminiert bevor sie sich zu einem Tumor formieren können. Durch bestimmte Mutationen können manche veränderte Zellen jedoch „unsichtbar“ für das

Immunsystem bleiben, oder eine Immunantwort sogar aktiv unterdrücken [58]. Das Ziel einer Immuntherapie ist demnach, diese Immunantwort zu reaktivieren, welche ein systemisches, spezifisches und langanhaltendes Mittel gegen die Tumorerkrankung darstellt. Auch in der Plasmaforschung wird eine mögliche Immunaktivierung durch CAP diskutiert. Hierbei gibt es aktuell zwei unterschiedlich Schwerpunkte, welche hinsichtlich der Aktivierung des Immunsystems diskutiert werden.

Die Arbeitsgruppe um Miller et al. [58] befasst sich mit der direkten Stimulation von Immunzellen durch CAP. Hierbei liegt der Schwerpunkt der Untersuchungen auf Makrophagen. Diese antigenpräsentierenden Zellen sind in nahezu allen Geweben des menschlichen Körpers präsent und beeinflussen essenziell den Verlauf von Entzündungsreaktionen. Beschrieben sind vor allem die *in vitro* verstärkte Migration und Zytokinfreisetzung von Makrophagen nach einer CAP-Exposition [59]. Diese resultierten in einer höheren Toxizität und erhöhter Freisetzung von TNF α gegenüber den Tumorzellen in einer Co-Kultur [60, 61]. *In vivo* konnte bisher allerdings nur die vermehrte Differenzierung von Hämozyten in den Lymphorganen von *Drosophila melanogaster* nach einer CAP-Exposition gezeigt werden [62].

Ein weiterer Schwerpunkt liegt auf der möglichen Induktion von immunogenem Zelltod (ICD) durch Plasma. Beim ICD kommunizieren die zugrunde gehenden Zellen durch *Damage Associated Molecular Patterns* (DAMPs) mit Zellen des Immunsystems und können so eine vermehrte Immunantwort auslösen [63]. Hierbei kann etwa die aktive Sekretion von ATP (Adenosin Triphosphat) als „*find me*-Signal“ fungieren und antigenpräsentierende Zellen wie Dendritische Zellen und Makrophagen mittels Chemotaxis anlocken. Die Präsentation von CRT (Calreticulin) auf der Zellmembran, welches in gesunden Zellen in der Membran des ER (Endoplasmatisches Retikulum) zu finden ist, vermittelt zudem ein „*eat me*-Signal“ für interagierende Immunzellen. Dieses regt die antigenpräsentierenden Zellen zur Phagozytose an [64]. Die phagozytierten Zellbestandteile werden anschließend als Antigene präsentiert und können T-Zellen in den lymphatischen Geweben stimulieren. Aktivierte T-Zellen vermitteln schlussendlich eine systemische Immunreaktion sowie eine lang anhaltende Immunität gegenüber den präsentierten Antigenen [65]. Vermutet wird nun, dass durch die Behandlung mit CAP dieser Mechanismus des ICD ausgelöst werden kann. *In vitro* konnte eine ATP-Sekretion und CRT-Präsentation bereits in mehreren Tumorzelllinien beschrieben werden [60], *in vivo*-Studien fehlen hierzu jedoch bislang.

Insgesamt betrachtet sind die Mechanismen einer möglichen Immunaktivierung durch Plasma noch nicht endgültig geklärt. Eine mögliche CAP-induzierte Immunreaktion wird für die Versuche in dieser Arbeit, durch die Verwendung von immundefizienten Hühnerembryonen als Modellorganismus, als vernachlässigbar angesehen.

2.1.5.4 CAP und Angiogenese

Für das Wachstum und die Progredienz solider Tumore ist ab einer Größe von wenigen Millimetern die Bildung neuer Blutgefäße von essenzieller Bedeutung. Da eine suffiziente Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen nur über eine Diffusionsstrecke von etwa 150-200 μm gewährleistet ist [66, 67], stellt eine ausreichende intratumorale Perfusion die Grundlage weiterer Proliferation und Expansion der Tumorzellen dar und verhindert letztlich deren Zelltod [67]. In soliden Tumoren fördert unter anderem der *vascular endothelial growth factor* (VEGF) die Neoangiogenese, welche als essenzieller Schritt im Tumorprogress und daher als ein *Hallmark of Cancer* angesehen wird [68]. VEGF ist ein angiogenes Protein, welches parakrin die Entwicklung und das Wachstum von Blutgefäßen stimuliert. Die VEGF-Expression wird über die Stabilisierung des *hypoxia-inducible factor-1a* (HIF-1 α) gesteuert. HIF-1 α kann durch Hypoxie, Wachstumsfaktoren und Onkogene aktiviert werden und wird in malignen Zellen häufig überexprimiert. Hier spielt der *phosphatidylinositol-3-kinase-AKT-Mechanismus* (PI3K/AKT) eine Rolle, welcher durch die Aktivierung von PI3K/AKT den HIF-1 α stabilisieren und so die VEGF-Expression fördern kann. Die Akt-VEGF-Signalkaskade scheint an der Regulation der Angiogenese in Pathologien wie Infarkten und Malignomen beteiligt zu sein [69-71]. Es wird zudem vermutet, dass oxidativer Stress, ausgelöst durch hohe Konzentrationen intrazellulärer RONS diesen Mechanismus relevant beeinflussen kann [72]. Jo et al. konnten so in einer Studie an klinischen Hepatozellulären Karzinomen (HCC) und einer HCC-Zelllinie (HLE) zeigen, dass erhöhte RONS-Level positiv mit einer erhöhten VEGF-Expression, AKT-Aktivierung und MVD (*microvascular density*) korrelierten [70]. Unter der Annahme, dass durch eine Behandlung mit CAP die Konzentration an RONS in den malignen Zellen gesteigert wird und diese in oxidativen Stress geraten, wäre eine Angiogenese-fördernde Wirkung von CAP in Tumoren demnach denkbar.

Direkte Auswirkungen von CAP auf die Angiogenese in Tumoren sind bisher jedoch nur wenig untersucht. Gegensätzlich zu der nach Jo et al. plausibel erscheinenden förderlichen Wirkung auf die Angiogenese konnte in mehreren malignen Zellenlinien eine verringerte VEGF-Expression nach einer CAP-Behandlung gemessen werden. Hierbei wurden murine Melanomzellen [73] und humanen Brustkrebszellen [74] *in vitro* kultiviert und mit CAP behandelt. Eine verminderte Expression von VEGF könnte die Tumorangio-genese verlangsamen und die weitere Proliferation der Tumorzellen hemmen. Auch durch die direkte Behandlung von HAEC Endothelzellen mit CAP konnte deren Migration und die Bildung von *tube formations*, welche Vorläufer von Kapillaren darstellen, *in vitro* gehemmt werden [75]. Haralambiev et al. konnten diese Ergebnisse in einer 2020 veröffentlichten Studie mit HDMEC Endothelzellen bestätigen [76]. Eine Behandlung mit CAP für 15 s verringerte hier das Zellwachstum, die metabolische Aktivität, die *tube formation* und Migration der Endothelzellen, während Apoptosen vermehrt beobachtet werden konnte. Um die Auswirkung von CAP auf die Angiogenese in Tumoren genauer verstehen zu können, sind jedoch weitere Studien notwendig.

2.1.5.5 Wirkung von CAP auf solide Tumore

Aktuell beziehen sich die meisten Erkenntnisse zur Wirkung von CAP an Tumorzellen auf 2-dimensionale *in vitro*-Versuche mit einer Vielzahl von Tumorzelllinien, wobei Glioblastom- und Melanomzelllinien am meisten untersucht wurden. Einen Überblick über die eingesetzten Zelllinien und deren Reaktion auf eine CAP-Exposition geben Braný et al. [34], sowie Dubuc et al. [1]. Untersuchungen mit *in vivo*-Modellen konnten ebenfalls eine signifikante Reduktion der TumorgroÙe und eine erhöhte Überlebensrate der Versuchstiere beschreiben. Hierbei kam in der überwiegenden Mehrheit der Studien ein subkutaner *Xenograft*-Mausmodell zum Einsatz [37, 77, 78]. Zwei Untersuchungen von CAP an Tumoren im HET-CAM-Modell sind ebenfalls beschrieben [41, 79].

Limitierend für den CAP-Einsatz an soliden Tumoren erscheint die geringe Eindringtiefe (*depth of tissue penetration, DETiP*) des Plasmas ins Gewebe. Partecke et al. [79] beobachteten in einer *in ovo*-Studie mit zwei Pankreaskarzinomlinien CAP-Effekte, die begrenzt auf die oberen Zellschichten der Tumore auftraten. Daraus wurde auf eine effektiven Eindringtiefe des Plasmas von maximal 60 µm geschlossen.

Untersuchungen zur Diffusion von reaktiven Spezies durch Gewebemodelle konnten hingegen zeigen, dass RONS mehrere Millimeter tief in Gewebe eindringen können [80-82].

Um reaktive Spezies aus CAP tiefer in Gewebe einzubringen und die geringe Eindringtiefe des Plasmas selbst zu umgehen, können plasmaaktivierte Lösungen wie plasmaaktiviertes Medium (PAM) oder plasmaaktivierte Ringer-Laktat-Lösung (PAL) eingesetzt werden. Die Lösungen werden hierbei zunächst mit CAP behandelt, um RONS in der Flüssigkeit zu generieren und akkumulieren. Anschließend kann die Lösung direkt in das Tumorgewebe injiziert [83], oder in eine Körperhöhle eingebracht werden [84]. Die Zusammensetzung der eingesetzten Lösung kann jedoch deren Wirkung stark beeinflussen. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass in den eingesetzten Medien vorhandenes fötales Kälberserum (FCS) RONS neutralisieren und die PAM-Wirkung hierdurch reduzieren kann [85].

Eine weitere Möglichkeit stellt der Einsatz von *Micro CAP Devices* (μ CAP) dar, welche einen Plasmajet mit einem Durchmesser von nur 70 μ m erzeugen. Die mit Helium als Trägergas betriebenen Geräte wurden entwickelt, um eine endoskopische Behandlung mit CAP zu ermöglichen. Im Mausmodell konnten hierdurch bereits CAP-Behandlungen direkt im Tumorgewebe durchgeführt werden [77]. Auch eine intrakranielle CAP-Therapie von Glioblastomen konnte im Mausmodell bereits erfolgreich vollzogen werden [14].

2.2 Tumormodelle in der präklinischen Forschung

2.2.1 Einleitung

Die Entwicklung und Testung neuer Tumorthérapien in der onkologischen Forschung ist stark abhängig von Tumormodellen. An diesen können Grundlagenforschung betrieben sowie Wirkungs- und Dosisanalysen durchgeführt werden, bevor diese klinisch eingesetzt werden. Um ein neues Tumorthérapeutikum in der Klinik zu etablieren, muss dieses zunächst einen jahrzehntelangen Prozess von Testungen und Evaluationen durchlaufen [86]. Begonnen wird hierbei meist mit der *in vitro* Zellkultur. An dieser können bei geringen Kosten und einfacher Handhabung grundlegende Mechanismen einer Therapie an den veränderten Zellen untersucht werden. Der nächste Schritt stellt die Untersuchung in einem *in vivo*-Modell dar. Tiermodelle bilden

das Wachstum eines Tumors und dessen Reaktion gegenüber einer Therapie deutlich realistischer ab als *in vitro* Modelle. Allerdings sind sie, durch die komplexeren Versuchsbedingungen, sehr aufwändig und kostenintensiv und unterliegen hohen ethischen wie bürokratischen Hürden. Die gängigsten *in vivo*-Tumormodelle sind Mausmodelle, in denen entweder ein Tumor als *Xenograft* (engl. „Fremdtransplantat“) eingepflanzt, oder durch Genmanipulation die spontane Tumorentstehung in den Mäusen begünstigt wird.

Trotz hoher Investitionen in die Entwicklung neuer Tumorthérapien schaffen nur ca. 5% der präklinisch erfolgreichen Therapeutika den Transfer in die Klinik. Die Gründe hierfür sind komplex, liegen jedoch unter anderem an der großen Diskrepanz zwischen den Modellsystemen und den klinischen Tumoren [87]. Ein wichtiger Faktor ist dabei die häufig fehlende Dreidimensionalität der Tumormodelle. Hier stellen dreidimensionale Tumormodelle *in vitro* (Abschnitt 2.2.3) und Modelle solider Tumore *in vivo* (Abschnitt 2.2.4) eine wichtige Strategie dar, um die Modellsysteme den klinisch solide wachsenden Tumoren besser anzupassen [88].

2.2.2 Tumormikromilieu und Angiogenese

Solide Tumore *in situ* wachsen dreidimensional infiltrativ oder verdrängend. Sie bestehen dabei aus den mutierten, eigentlichen Tumorzellen und dem Tumorstroma. Das Tumorstroma beinhaltet azelluläre Bestandteile wie die Extrazellulärmatrix (ECM), sowie alle rekrutierten, scheinbar unveränderten Zellen des Tumorgewebes wie Fibroblasten, Endothelzellen und Zellen des Immunsystems. Tumorzellen und Tumorstroma stehen in konstanter Interaktion und beeinflussen das Tumormikromilieu, welches maßgeblich die Eigenschaften eines soliden Tumors bestimmt [38, 68].

Nach der Tumorinitiation erfolgt ein klonales Wachstum der stabil neoplastisch veränderten Ursprungszelle. Hieraus kann sich zunächst ein avaskulärer Zellhaufen entwickeln, welcher per Diffusion versorgt wird. Da die Sauerstoffversorgung der Zellen per Diffusion nur 150-200 µm weit von einem Gefäß ausgehend in das Gewebe erfolgen kann, ist für weiteres Wachstum die Induktion der Tumorangiogenese unabdingbar [66, 67]. Hierfür sezernieren die Tumorzellen angiogene Wachstumsfaktoren wie VEGF, die parakrin auf umliegende Gefäße einwirken und die

Aussprossung neuer Kapillaren induzieren [67]. Das physiologisch fein abgestimmte parallele Wachstum von Geweben und Blutgefäßen gerät in Tumoren jedoch aus der Balance. Da die Tumorzellen meist schneller wachsen als die induzierten Blutgefäße, entstehen Gewebereiche, die nicht mehr suffizient per Diffusion versorgt werden. Zudem unterscheiden sich die neu gebildeten Gefäße in Tumoren häufig in Aufbau und Organisation von physiologischen Blutgefäßen [89, 90]. Eigenschaften wie Gefäßdurchmesser, Verzweigungsmuster und Gefäßdichte können stark variieren und hierdurch einen unregelmäßigen Blutfluss bedingen [89, 91, 92]. Bei gleichzeitig erhöhter Durchlässigkeit der Gefäße und der Abwesenheit von funktionalen Lymphgefäßen, kommt es im Tumorgewebe zu einem Anstieg des interstitiellen Drucks [93]. Dies verursacht eine verringerte Diffusion von Substanzen wie Chemotherapeutika in das Tumorgewebe und kann zudem zu einem schnelleren Abtransport jener aus dem Gewebe führen [91, 94, 95]. In den minderversorgten, hypoxischen Bereichen sammeln sich durch die schlechte Perfusion zudem Stoffwechselprodukte wie Laktat und Kohlensäure an und verursachen so ein Absinken des pH-Werts in der Extrazellulärflüssigkeit [96].

Auf das pathologische Tumormikromilieu mit Minderperfusion, Sauerstoff- und Nährstoffmangel, Azidose und erhöhten interstitiellem Druck reagieren die Tumorzellen mit Veränderungen in der Genexpression und der Biosynthese von Proteinen. Dies kann sowohl deren malignes Wachstum und Metastasierung als auch die Reaktion der Tumorzellen auf Therapeutika maßgeblich beeinflussen [96]. Die spezifischen Eigenschaften solider Tumore erfolgreich in Modellsystemen simulieren zu können, stellt einen wichtigen Schritt zur Übertragbarkeit von Erkenntnissen aus Tumormodellen auf klinische Tumore dar.

2.2.3 Zellkultur und dreidimensionale Modelle *in vitro*

Die *in vitro*-Kultur maligner Zelllinien hat sich als ein unverzichtbares Modell in der onkologischen Forschung erwiesen, um fundamentale biophysikalische und biomolekulare Mechanismen der kultivierten Zellen aufzudecken. Zum Einsatz kommen hier vor allem etablierte Zelllinien unterschiedlichster Tumorentitäten, welche ein unbegrenztes Wachstum garantieren. Die klassische und nach wie vor häufigste Art der Zellkultur stellt die adhärente 2-dimensionale (2D) Kultur auf Oberflächen wie Petrischalen oder Zellkulturflaschen mit einem Nährmedium dar. Hierbei wachsen die

Zellen einschichtig auf der Oberfläche und haben so einen gleichmäßigen Zugang zu den im Medium vorhandenen Nährstoffen, Sauerstoff und Wachstumsfaktoren. Dies bedingt ein sehr homogenes Wachstum bei einfacher Handhabung und guter Kosteneffizienz. Der Zustand an optimaler Nährstoffversorgung und nur zweidimensionalem Wachstum unterscheidet sich jedoch stark von einem *in vivo* wachsendem Tumorgewebe. Nicht abgebildet in 2D-Modellen sind beispielsweise Interaktionen mit der ECM und dem Tumormikromilieu, Konzentrationsgradienten an Nährstoffen und Sauerstoff im Gewebe und Einflüsse von Stromazellen [97]. Um Tumore besser *in vitro* simulieren zu können, wurden 3-dimensionale (3D) Modelle entwickelt. Diese bilden auch die Zell-Zell-Kontakte und Zell-ECM Kontakte ab und ermöglichen den Zellen so eine *in vivo*-ähnliche Morphologie, Differenzierung, Polarität, Proliferation und Genexpression [97]. Somit könnten 3D-Modelle die methodische Lücke zwischen der 2D-Zellkultur und aufwendigen Tierversuchen schließen.

In 3D-Kulturen wachsen die Zellen in einer ECM-ähnlichen Matrix, welche als Gerüst dient, oder werden in einer dynamischen Suspension kultiviert. Hierbei aggregieren die Zellen zu 3-dimensionalen Sphäroiden, in denen sie mit anderen Zellen und der ECM interagieren können. Über die unterschiedlichen Methoden zur Generierung von Sphäroiden geben Breslin et al. [98] einen Überblick. Tumorsphäroide ähneln in vielen Eigenschaften wie der Morphologie, Mikromilieu, Nahrungs- und Sauerstoffgradienten kleinen avaskulären Tumorknötchen, Mikrometastasen oder auch den avaskulären Bereichen großer Tumore. Durch die abnehmende Diffusion von Nährstoffen und Sauerstoff durch die Zellkonglomerate, befinden sich die aktivsten, proliferierenden Zellen meist an der Oberfläche eines Sphäroids. Im Zentrum hingegen überwiegen inaktive und nekrotische Zellen [88]. Damit können Sphäroide die Wirkung vieler Therapeutika, welche ebenfalls durch Diffusion zu den einzelnen Zellen gelangen, deutlich besser abbilden als 2D-Zellkulturen. Auch für die Untersuchung von CAP-Effekten könnten 3D *in vitro*-Tumormodelle einen wichtigen Schritt zwischen Zellkultur und Tierversuch darstellen, werden bislang allerdings selten hierfür eingesetzt [38].

2.2.4 Modelle solider Tumore *in vivo*

Die präklinisch am häufigsten eingesetzten *in vivo*-Modelle zur Simulation von soliden Tumoren sind Mausmodelle. Diese lassen sich nach dem Ursprung der malignen Zellen unterteilen in xenogene und syngene Modelle:

In xenogenen Modellen wird humanes Tumorgewebe in immundefiziente Mäuse implantiert. Die Züchtung von Mausstämmen mit einem nicht- oder nur geringgradig funktionalem Immunsystem ist hierbei Voraussetzung für eine erfolgreiche Tumorinokulation. Die am häufigsten verwendeten Mausstämme sind Nude- (T-Zell-defizient), SCID (*severe combined immunodeficiency*, T- und B- Zell-defizient) oder NOD/SCID-Mäuse (*non-obese diabetic*, T-, B-, NK-Zell-defizient) [99]. Implantiert werden können entweder Tumorzellen aus einer Zellkultur (*cell line derived xenografts*, CDX) oder Tumorgewebe, welches direkt einer Patientin oder einem Patienten entnommen wurde (*patient derived xenografts*, PDX). Die in CDX-Modellen verwendeten Tumorzelllinien sind jedoch häufig vergleichsweise undifferenziert und können sich immens von den klinischen Tumoren unterscheiden. Hierdurch eignen sich CDX-Modelle eher für die Untersuchung von generellen wachstumshemmenden Eigenschaften eines Therapeutikums [100]. Tumore in PDX-Modellen hingegen zeigen in frühen Passagen eine hohe histologische und molekulare Übereinstimmung mit den Ausgangstumoren. Da diese Eigenschaften die Wirkung eines Therapeutikums maßgeblich beeinflussen, können PDX-Modelle klinische Effekte suffizient simulieren und werden deshalb häufig in der translationalen Tumorforschung eingesetzt [101].

In syngenen Modellen entstehen die Tumore spontan in bestimmten Inzucht-Mausstämmen oder in genetisch veränderten Mäusen (*genetically engineered mice*, GEM). Die ersten GEM-Modelle wurden in den 1980ern entwickelt und bestanden aus transgenen Mäusen, in deren Erbgut Onkogene eingebracht wurden, woraufhin sie vermehrt Brustkrebstumore entwickelten [102]. Nachfolgend wurden durch die gezielte Ausschaltung von Tumorsuppressorgenen Modelle mit *Knockout*-Mäusen entwickelt [103]. Die Probleme dieser frühen Modelle liegen jedoch in der ubiquitären Ausprägung der induzierten Veränderungen: Die Onkogene in den transgenen Mäusen werden in allen Zellen des betroffenen Gewebes exprimiert. Auch die Tumorsuppressorgene in den *Knockout*-Mäusen sind in allen Zellen des Tiers inaktiviert. Dies unterscheidet die Modelle immens von den klinisch sporadisch auftretenden malignen Zellen in einem ansonsten gesunden Gewebe [104]. Heute

existieren daher eine Vielzahl an deutlich komplexer entwickelten GEM-Modellen, die eine somatische Inaktivierung von Tumorsuppressoren oder somatische Aktivierung von Onkogenen erlauben und hierdurch einen sporadisch entstehenden Tumor besser simulieren können [105]. Da GEM-Modelle eine *de novo* Tumorgenese darstellen, sind sie das aktuelle beste *in vivo*-Modell zur Untersuchung von zellulären und molekularen Prozessen, die zur Tumorinitiation, -progression und Metastasenbildung führen [104]. Ein weiterer Vorteil von syngenem Modellen ist das Vorhandensein eines suffizienten Immunsystems in den Mäusen. Hierdurch sind sie das Modell der Wahl zur Testung von Immuntherapeutika. Durch den murinen Ursprung der Malignome lassen sich die Ergebnisse aus syngenem Modellen jedoch nicht direkt auf den Menschen übertragen [100].

In vivo-Modelle sind ein essenzielles Mittel der onkologischen Forschung für die Entwicklung und Testung neuer Therapeutika, sowie für das Verständnis von molekularen und zellbiologischen Prozessen der Tumorgenese. Trotzdem muss sich jede Studie an Tieren einer strengen ethisch-moralischen Bewertung unterziehen und die Notwendigkeit des verursachten Leidens der Tiere kritisch hinterfragen. Schon 1959 forderten Russel und Burch die Umsetzung des 3R-Konzepts [106]: „*Replace*“ steht hierbei für die vermehrte Nutzung von Alternativmethoden an nicht fühlenden Versuchsubjekten. „*Reduce*“ fordert eine Reduzierung der Anzahl an Versuchstieren auf ein sinnvolles Minimum. „*Refine*“ beschreibt sowohl die Verbesserung von Versuchsabläufen, um Leiden und Schmerzen zu vermeiden, als auch die Verbesserung von Haltungsbedingungen. Dieses Konzept der Ersetzung, Reduzierung und Verbesserung von Tierversuchen wurde 2010 auch in den Richtlinien der Europäischen Union zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere aufgearbeitet [107].

2.3 Das HET-CAM-Modell

Hühnereier wurden bereits seit dem späten 19. Jahrhundert als Modellsysteme für wissenschaftliche Studien genutzt [108]. Hierbei wurden vor allem toxikologische und teratologische Fragenstellungen untersucht [109]. Auf der Suche nach Alternativmethoden zum ethisch bedenklichen *Draize Rabbit Eye Test* entwickelte Luepke 1985 den damals etablierten *Henn's Egg Test* (HET) weiter zum HET-CAM-Test für toxikologische Untersuchungen [110]. Hieran konnten neue Substanzen

getestet werden, indem sie auf die CAM aufgebracht und diese anschließend auf Irritationen wie Hyperämie oder Blutungen untersucht wurde. Die gut durchblutete, sowie einfach erreichbare CAM stellte sich zudem als eine Membran heraus, welches die optimalen Voraussetzung für eine Vielzahl von Untersuchungen bietet. Durch die teilweise Entfernung der Eierschale etablierte sich das HET-CAM-Modell schließlich als *in ovo*-Modellsystem für eine Vielzahl von Experimenten. Unter anderem zur Studie von Angiogenese, Toxikologie, Wundheilung, Biomaterialien und letztlich auch dem Wachstum und der Entwicklung von Tumoren wurde es bereits erfolgreich eingesetzt [111].

Das HET-CAM Modell kann als ein Bindeglied zwischen *in vitro* Versuchen an Zellkulturen und aufwendigen *in vivo*-Modellen gesehen werden. Es unterliegt in Deutschland und vielen anderen Ländern nur geringen bürokratischen Auflagen und benötigt für die Durchführung keine Zustimmung einer Ethikkommission, solange die Versuche vor dem Schlupf beendet werden [107, 111]. Zudem ist die CAM als extraembryonale Membran nicht innerviert und das Immunsystem des Hühnerembryos bis zum Tag 14 der Bebrütung nur unvollständig entwickelten, was die Versuche auf der CAM ethisch gut vertretbar macht. In Kombination mit den deutlich geringeren Kosten macht dies das HET-CAM-Modell zu einer ethisch und ökonomisch guten Alternative zu Versuchen im Mausmodell [112].

Der genaue Ablauf des HET-CAM-Modells ist im Methodenteil dieser Arbeit beschrieben (Abschnitt 3.2.2).

2.3.1 Embryonalentwicklung des Huhns

Die Embryonalentwicklung von Vögeln findet zum überwiegenden Großteil außerhalb des mütterlichen Körpers statt. Daher müssen bei der Eiablage alle für die Entwicklung relevanten Nährstoffe im Ei vorhanden sein. Dies bedingt sehr große Nährstoffreserven im Ei, während die Chromosomen in einer kleinen, dem Eidotter aufliegenden Zytoplasma-Ansammlung konzentriert sind [113]. Die frühe Entwicklung des Embryos beginnt bei Vögeln bereits während der Wanderung der Eizelle durch die Genitalorgane des Muttertiers, welche der Bildung des vollständigen Eis dient. Kurz nach der Befruchtung der Eizelle im *Infundibulum* des Ovidukts wird die zweite meiotische Teilung vollzogen. Nach Bildung des Albumins im *Magnum* und der Anlage

der Schalenmembranen im *Isthmus* des Ovidukts, erreicht die Eizelle nach ca. 3 bis 5 Stunden die Schalendrüse. Während hier die calciumreiche Schale um das Ei gebildet wird, vollzieht der Embryo eine Vielzahl an mitotische Teilung. Zum Zeitpunkt der Eiablage besteht der Embryo daher bereits aus 40 000 bis 60 000 Zellen und befindet sich im Blastoderm-Stadium, welches dem Stadium 10 nach Hamburger und Hamilton entspricht [114]. Ab dem Zeitpunkt der Eiablage bis zum Start einer Bebrütung arretiert der Embryo daraufhin in einer Diapause. Diese Unterbrechung in der Embryonalentwicklung kann in der Natur mehrere Wochen andauern und wird erst beim Erreichen einer Temperatur von über 28°C fortgesetzt [115]. Die Entwicklungsstadien 11- 26 nach Hamburger und Hamilton werden nun innerhalb von 21 Inkubationstagen vollzogen, wobei die optimale Bruttemperatur zwischen 37 und 39°C liegt. Die Stadien 11-22 lassen sich hierbei den Prozessen von der Entstehung der Keimblätter bis zur Körpergrundgestalt zuordnen, während die Stadien 23 bis 33 die Organogenese widerspiegeln. In den Stadien 34 bis 46 findet die Ausbildung arttypischer Merkmale, sowie weiteres Wachstum und Ausreifung statt [114]. Die genaue Entwicklung des Hühnerembryos nach 46 Stadien aufgeteilt, ist von Bellairs et al. ausführlich beschrieben worden [116].

Parallel zur Entwicklung des Embryos entstehen im Ei vier extraembryonale Membranen: Dottersack, Amnion, Chorion und Allantois. Zunächst beginnt die Bildung der Dottersackmembran, welche aus extra-embryonalen Anteilen der Blastoderm-Scheibe entspringt und ab Tag 5 der Bebrütung den Eidotter komplett umschließt. Die Membran lässt sich in eine gering vaskularisierte *Area vitellina* und eine stark durchblutete *Area vasculosa* unterteilen. Die Dottersackmembran und die darin liegenden Blutgefäße sind über den Dottersackstil mit dem Embryo verbunden und dienen hauptsächlich der Versorgung des Embryos durch die Absorption von Nährstoffen aus dem Eidotter. Sie sind jedoch im frühen Stadium auch am Gasaustausch und der Blutbildung beteiligt [117]. Ab Tag 19 der Bebrütung ist der Großteil des Eidotters absorbiert, woraufhin die verbleibenden Bestandteile in die Körperhöhle des Embryos internalisiert werden. Dies sichert die Ernährung des Kükens in den ersten Tagen nach dem Schlupf [118]. Amnion und Chorion entstehen gemeinsam ab dem Entwicklungsstadium 12 durch eine beidseits am Embryo stattfindende, ektodermalen Abfaltung mit einer darunter liegenden somatomesodermalen Schicht. Am Tag 3 der Bebrütung fusionieren die zwei seitlichen Abfaltungen und bilden so mit den inneren Anteilen das Amnion, während die äußeren

Anteile zum Chorion werden [117]. Die Zellen der Amnionmembran sezernieren nun Flüssigkeit, die den Embryo in der Amnionhöhle umgibt, die Chorionmembran legt sich der inneren Schalenmembran an. Die Allantoismembran entwickelt sich ab Stadium 18 aus einer entodermalen Knospe mit mesodermalen Anteilen im Hinterdarm und wächst unterhalb des Chorions in die Embryonalhöhle. Sie besteht aus einer inneren, entodermalen und einer äußeren, mesodermalen Schicht und bildet die Allantoishöhle, welche zunächst als Speicherort für Harn aus den embryonalen Nieren fungiert [118]. Ab Tag 6 der Inkubation fusioniert die Allantoismembran mit der Chorionmembran und bildet die Chorion-Allantois-Membran.

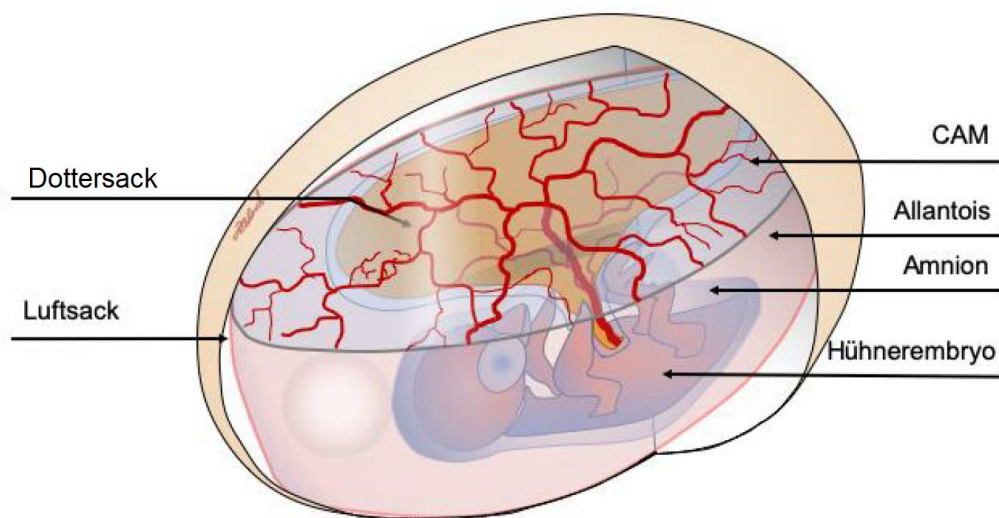


Abbildung 2: Embryo und extra-embryonalen Membranen im Hühnerei, schematische Darstellung.
Lizenz: Erstellt von Dr. med. Jonas Eckrich, mit freundlicher Genehmigung.

2.3.2 Die Chorion-Allantois-Membran (CAM)

Die CAM besteht aus den ektodermalen Bestandteilen des Chorions, sowie mesodermalen und entodermalen Bestandteilen aus der Allantois. Sie entsteht ab Tag 6 der Bebrütung und bedeckt an Tag 8 ca. 80% und an Tag 12 die komplette innere Schalenoberfläche [119]. Ausgehend von der mesodermalen Schicht entwickelt sich ein dichtes Gefäßnetz, welches aus jeweils zwei Allantoisvenen und Allantoisarterien abstammt. Durch das dichte Gefäßnetz und die Nähe zur Eischale fungiert die CAM als Organ des Gasaustauschs und wird daher als funktionales Äquivalent zur Plazenta von Säugetieren angesehen [119]. Der Embryo kann durch die Poren in der Eischale

Kohlenstoffdioxid eliminieren und Sauerstoff resorbieren [118]. Zudem kann über die CAM Calcium aus der Schale resorbiert und dem Embryo zur Verfügung gestellt werden. Dieser hat vor allem in den letzten 11 Entwicklungstagen auf Grund der Ossifikation des Knochengewebes einen stark erhöhten Bedarf an Calcium, welcher nicht mehr über den Eidotter gedeckt werden kann [118].

Histologisch lässt sich die CAM als eine dreischichtige, ca. 100 µm dicke Membran aus zwei Epithelien und einer dazwischenliegenden Bindegewebschicht identifizieren. Leeson et al. [120] beschreiben das Chorionepithel als ein zwei- oder mehrschichtigem Epithel auf einer dünnen Basalmembran, welches der Schalenmembran eng anliegt. Unregelmäßig bilden die Epithelzellen Mikrovilli aus. Im darunterliegenden mesodermalen Anteil befinden sich dichte Blutgefäße, welche als Chorion-Plexus bezeichnet werden. Diese sind umgeben von mesenchymalem Bindegewebe und migrieren in eine Position direkt unterhalb des Chorionepithels. Ab Tag 7 der Bebrütung durchbrechen einige Kapillaren das Chorionepithel und liegen fortan an der Oberfläche der CAM, in direktem Kontakt zur Schalenmembran. Durch diesen engen Kontakt der Blutgefäße mit der Eischale wird der Gasaustausch erleichtert. Das von der Schale abgewandte Allantoisepithel wird als ein einreihiges Epithel aus kuboidalen Zellen beschrieben. Es bildet ebenfalls unregelmäßig Mikrovilli aus und begrenzt die darunter liegende Allantois [120].

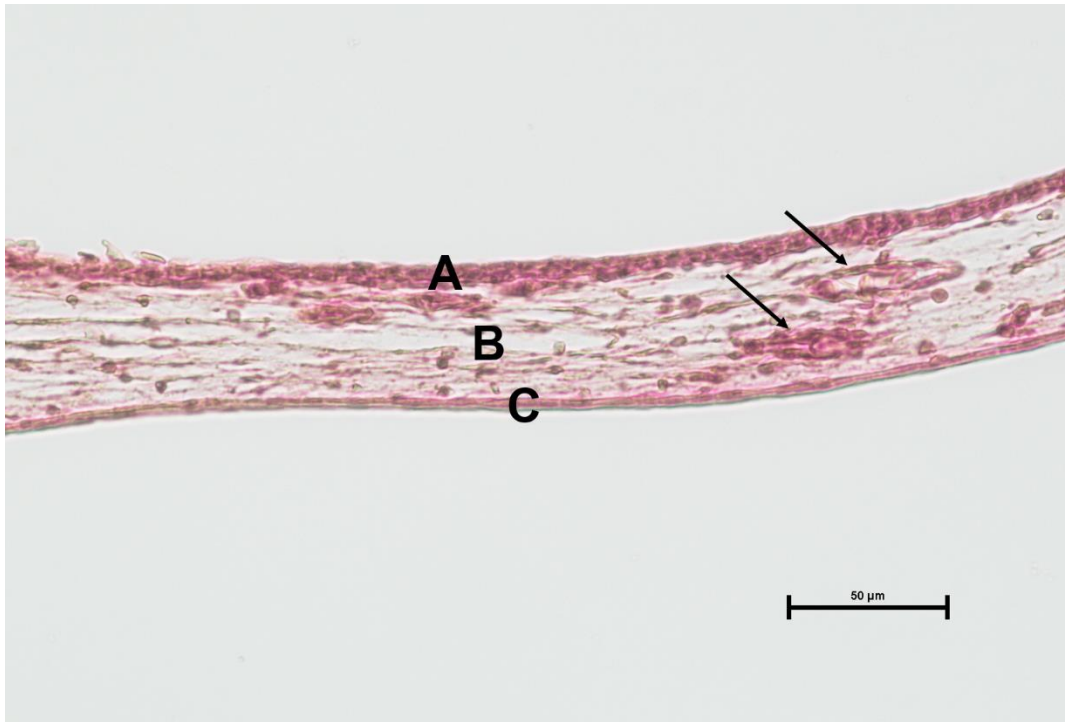


Abbildung 3: Lichtmikroskopische Aufnahme der CAM, 150x Vergrößerung, HE-Färbung. Zu erkennen ist das mehrschichtige Chorionepithel (A), mesenchymales Bindegewebe (B) mit Blutgefäßen (Pfeilmarkierung) und das einschichtige Allantoisepithel (C).

2.3.3 Einsatz des HET-CAM-Modells in der onkologischen Forschung

Bereits seit Anfang des 20. Jahrhunderts wurde die CAM für Studien von Tumorwachstum und Angiogenese genutzt. Als Erste transplantierten Rous und Murphy 1912 Hühnersarkome erfolgreich auf die CAM [121]. Ein Jahr später beschrieben sie die ebenfalls erfolgreiche Inokulation von Maus- und Rattenrumoren in die CAM, welche in ausgewachsenen Hühnern jedoch nicht wuchsen [122]. Die Gründe hierfür wurden damals spekuliert, lassen sich heute aber mit der natürlichen Immundefizienz der Hühnerembryonen in den ersten zwei Entwicklungswochen erklären.

Das spezifische Immunsystem in ausgewachsenen Hühnern wird durch B- und T-Zellen repräsentiert. Die B-Zellen reifen in der namensgebenden *Bursa Fabricii* der Vögel aus und steuern anschließend die Antikörper-vermittelte Immunität. Die T-Zellen reifen wie bei Säugetieren im Thymus aus und vermitteln die zelluläre Immunreaktion [123]. T-Zellen können im Hühnerembryo jedoch frühestens ab Tag 11 der Inkubation, B-Zellen frühestens ab Tag 12 beobachtet werden [124]. Eine unspezifische Entzündungsreaktion wurde teilweise ab Tag 15 beschrieben, als voll

immunkompetent gilt der Hühnerembryo schließlich ab Tag 18 der Bebrütung [125]. Das unvollständig ausgebildete Immunsystem der Hühnerembryonen erlaubt die Transplantation von Geweben unterschiedlicher Spezies auf die CAM, ohne eine Immunreaktion auszulösen [123].

Ribatti gibt in seinen Publikationen einen Überblick über die häufig eingesetzten Tumorzelllinien im CAM-Modell [123, 126]. Auch als PDX-Modell für direkt von einer Patientinnen oder einem Patienten stammendes Tumorgewebe wird das CAM-Modell vermehrt eingesetzt [127]. Nach dem Aufsetzen des PDX oder eines CDX auf die CAM, durchdringen die Tumorzellen das Chorionepithel und wachsen innerhalb von 2-5 Tagen in das gut durchblutete mesenchymale Bindegewebe der CAM ein [126]. Dort werden sie durch die Blutgefäße in der CAM versorgt und beginnen ein schnell progredientes Wachstum [123]. Die suffiziente Vaskularisierung stellt hier einen wichtigen Schritt für das weitere Wachstum der Tumore da. Knighton et al. konnten zeigen, dass Tumore ohne ausreichende Durchblutung in der CAM einen Durchmesser von ca. 1 mm nicht überschritten. Erst nach der Entwicklung von ausreichenden Blutgefäßen proliferierten die Zellen rapide und bildeten größere Tumore [128]. Auch im CAM-Modell wird die Neoangiogenese von den Tumorzellen durch die Exkretion von angiogenen Faktoren wie VEGF stimuliert, woraufhin Gefäßaussprossungen aus den umliegenden CAM-Gefäßen in das Tumorgewebe einwachsen [129]. Durch die exponierte Lage der CAM-Blutgefäße und der einfachen Beobachtungsmöglichkeit durch die *in vivo*-Mikroskopie der Tumore in der CAM, wurde das HET-CAM-Modell für viele Studien zur Angiogenese von Tumoren herangezogen. Einen Überblick hierzu geben Ribatti [123] und Deryugina [130].

Neben der Angiogenese ist die Metastasierung maligner Tumorzellen Gegenstand vieler Untersuchungen am HET-CAM-Modell. Hierzu wurde entweder ein Tumor auf der CAM etabliert und die spontane Metastasierung in andere Bereiche analysiert, oder die malignen Zellen wurden direkt in ein Gefäß injiziert. Von soliden Tumoren in der CAM ausgehend, konnte innerhalb weniger Tage eine Metastasierung in entfernte CAM-Bereiche, sowie Lunge, Leber und Gehirn der Embryonen nachgewiesen werden [123, 131]. Wurden die Zellen direkt intravasal injiziert und damit über den kompletten Kreislauf verteilt, überlebten mehr als 80% der malignen Zellen in den Kapillaren und migrierten innerhalb von 1-3 Tagen aus den Gefäßen [132]. Der für die Metastasierung wichtigen Prozess der Extravasation konnte durch die Zugänglichkeit von fluoreszenzmarkierten malignen Zellmetastasen in den CAM-Gefäßen genauer

untersucht werden. Hier wurde bereits sechs Stunden nach der Injektion der Zellen eine erhöhte mRNA-Expression von Metastasen-assoziierten Genen und VEGF gemessen [133]. Eine genaue Beschreibung der am HET-CAM-Modell durchgeführten Studien zur Metastasierung von malignen Tumorzellen finden sich in den Publikationen von Ribatti [123] und Deryugina [134].

Gesamt betrachtet eignet sich das HET-CAM-Modell durch das stark ausgeprägte Blutgefäßnetz der CAM und der natürlichen Immundefizienz des Hühnerembryos optimal als *in vivo*-Modell für eine Vielzahl an Tumorentitäten. Das Wachstum eines soliden Tumors ist durch die schnelle Vaskularisierung der Tumore innerhalb von 2-5 Tagen in kurzer Zeit möglich. Die zugängliche Lage der CAM erlaubt zudem stets eine *in vivo*-Beobachtung der Tumore. Auch für die Untersuchung von CAP-Effekten auf solide Tumore bietet das HET-CAM-Modell gute Voraussetzungen, da es im Gegensatz zu vielen Mausmodellen die direkte Applikation von CAP an soliden Tumoren auf der CAM ermöglicht.

2.4 CAP-Versuche am HET-CAM-Modell

Untersuchungen zu CAP-Effekten unter Verwendung des HET-CAM-Modells wurden bisher vorwiegend von Arbeitsgruppen der Universität Greifswald publiziert, welche mit dem Leibniz-Institut für Plasmaforschung und Technologie e.V. in Greifswald kooperieren. Hierbei kam das HET-CAM-Modell teils als klassisches Toxizität-Modell zur Studie der Verträglichkeit und Mutagenität von CAP zum Einsatz, sowie in einigen Publikationen zur Studie der Effekte einer CAP-Behandlung auf solide Tumore in der CAM.

Zur Untersuchung der CAP-Verträglichkeit wurde der kINPen 09 oder kINPen MED für Behandlungen der CAM eingesetzt. Diese indirekten Plasma-Jets werden mit Argon betrieben, der kINPen MED ist in Deutschland als Medizingeräte zur klinischen Anwendung in der Behandlung chronischer Wunden zugelassen [135]. Untersucht wurde die Mutagenität [136], das Irritationspotenzial [137] und das Auslösen von Entzündungsreaktionen durch CAP [138]. Während keinerlei Genotoxizität in Erythrozyten-Kernen nach einer CAP-Exposition festgestellt werden konnte, stieg die Ausfallrate der Hühnerembryonen bei einer zehnminütigen Behandlung auf bis zu 42% an [136]. Irritationen der CAM nach einer CAP-Behandlung konnten wiederholt in Form von Blutungen und Eintrübungen der Membran beobachtet werden [137]. Ebenfalls

wurde das Auslösen von Entzündungsreaktionen in Abhängigkeit von der Expositionsdauer beschrieben. Die Entzündungsreaktionen ließen sich hierbei mit Hydrocortison unterdrücken [138].

Partecke et al. [79] setzten in einer 2012 publizierten Studie zur CAP-Wirkung auf Tumore in der CAM je 2 Mio. humane Pankreaskarzinomzellen der Linie Colo-357 in 3D-Kulturen ein. Die 3D-Kulturen, bestehend aus Tumorzellen, 5 µl flüssigem Zellmedium und 10 µl Matrigel®, wurden an Tag 7 der Bebrütung auf die CAM aufgebracht und für 5 Tage inkubiert. An Tag 12 erfolgte eine CAP-Behandlung für 10 s oder 20 s mit dem Plasmajet kINPen 09, in den Kontrollgruppen erfolgte eine Exposition gegenüber reinem Argongas oder keine Behandlung. Anschließend wurde eine Ki-67 Färbung zur Anfärbung proliferierender Zellen und ein TUNEL-Assay zur Anfärbung apoptotischer Zellen in den Tumorgeweben durchgeführt. Hierbei ergaben sich über den gesamten Tumoranschnitt keine signifikanten Unterschiede, in den oberen 100 µm der Tumore waren jedoch signifikant erhöhte Apoptosezahlen, sowie eine signifikant verringerte Proliferationsrate zu beobachten. Diese Effekte wurden als begrenzt auf die oberen drei bis fünf Zellschichten der soliden Tumore beschrieben. Daraus schlussfolgerten die Autorinnen und Autoren auf eine maximale Eindringtiefe (*Depth of Tissue Penetration, DeTiP*) des CAP von 60 µm.

Liedtke et al. [41] konnten diese Ergebnisse 2018 mit soliden Tumoren aus murinen Pankreaskarzinomzellen der Linie PDA6606 und dem Plasmajet kINPen MED replizieren. Zusätzlich kultivierten sie als Kontrollgruppe primäre murine Fibroblasten in 3D-Kulturen auf der CAM und behandelten diese ebenfalls mit CAP. Hier zeigten sich im Vergleich zu den soliden Tumoren signifikant geringere CAP-induzierte Apoptosen. Dies bestätigte auch *in ovo* die selektive Wirkung von CAP auf maligne Zellen.

Die Versuche dieser Arbeit sollen an die Studien von Partecke et al. und Liedtke et al. anschließen und die Effekte von kaltem atmosphärischem Plasma auf solide Tumore *in ovo* weiter untersuchen. Neben den Fragen der Eindringtiefe und Dosisabhängigkeit der CAP-Behandlung sollen außerdem mögliche Effekte auf die tumor-assoziierten Blutgefäße und die Mikrozirkulation genauer untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Plasmagerät miniFlatPlaSter®

Das in den Versuchen verwendete Plasmagerät miniFlatPlaSter® beruht auf die zuvor beschriebene SMD-Technologie (siehe Abschnitt 2.1.2) und wurde vom Max-Planck-Institut für extraterrestrische Physik entwickelt. Es generiert Plasma in der umliegenden Raumluft, ohne die Verwendung eines Trägergases. Nach Li et al. [17] besteht die SMD Elektrode aus einem Edelstahl-Drahtgeflecht mit ca. 12 Maschen pro cm, einer Epoxidglasfaserplatte, mit einer Stärke von ca. 1 mm als dielektrische Barriere und einer Kupferfolie von ca. 0,2 mm Dicke. Die Kupferfolie wurde außerdem mit Kaptonklebeband umhüllt, um ungewollte seitliche Entladungen der Kupferfolie zu vermeiden. Das benötigte Hochvoltsignal für die Erzeugung des CAPs wird von der eingebauten Stromquelle bereitgestellt. Diese besteht aus Batterien, einem Zeitschalter, einem MOSFET (Metall-Oxid-Halbleiter-Feldeffekttransistor) und einem Transformator. Wird nun das Hochvoltsignal zwischen dem Drahtgeflecht und der Kupferfolie angelegt, entsteht durch Mikroentladungen über die Epoxidglasfaserplatte Plasma auf der Seite des Drahtgeflechts. Das Hochvoltsignal ist hierbei gepulst mit einer maximalen Spannung von 7 kV bei einer Frequenz von ca. 6.75 kHz. Durch die Elektrodengröße von 28 mm Durchmesser besteht eine Leistung von ca. 0.5 W/cm² [139].

Die vom miniFlatPlaSter® emittierten Hauptbestandteile wurden von Welz et al. charakterisiert [140, 141]. Hierbei handelt es sich um Durchschnittswerte einer einminütigen Behandlung. Geladene Teilchen (Elektronen, Ionen) wurden auf der Oberfläche der SMD Elektrode $\sim 10^{11}$ cm⁻³ freigesetzt. Die Werte für reaktive Spezies lagen bei ~ 25 ppm O₃, <1 ppm NO und <15 ppm NO₂. Photonen im UV- und sichtbaren Bereich wurde mit einer Energiedichte von <0.66 μ W cm⁻² freigesetzt. Im UV-Anteil handelte es sich um Strahlung im UVA und UVB-Bereich mit einer Wellenlänge zwischen 280 und 400 nm. Im UV-C Bereich lagen die Messwerte unter der messbaren Intensität [142]. Außerdem lag bei einer einminütigen Behandlung die UV-Dosis bei weniger als 36 μ J cm⁻², was ein Dosis weit unter den Grenzwerten der ICNIRP [21] für menschliche Haut entspricht. Auf der Drahtgeflecht-Elektrode konnte ein statisches

elektrisches Feld von $\sim 10^7 \text{ V m}^{-1}$ gemessen werden. Da der miniFlatPlaSter das Plasma indirekt produziert und die Probe nicht als Gegenelektrode verwendet, war der Stromfluss durch die Probe bei $< 50 \text{ nA cm}^{-2}$ sehr gering.

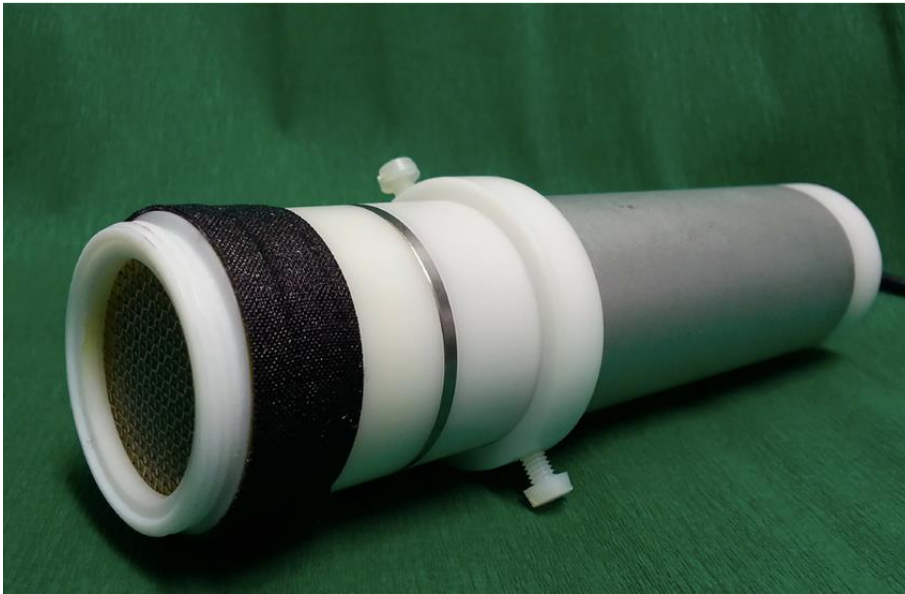


Abbildung 4: Plasmagerät miniFlatPlaSter®, von außen sichtbar ist lediglich das Edelstahl-Drahtgeflecht, welches als Gegenelektrode fungiert und durch dessen Maschen das CAP austritt.
Lizenz: Welz et al. [141], [CC BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

3.1.2 Zelllinie HuH7

Für die Versuche in dieser Arbeit wurde Zellen der HuH7-Linie verwendet. Diese Zelllinie wurde 1982 aus einem gut differenziertem hepatozellulärem Karzinom eines 57-jährigen, männlichen Patienten in Japan etabliert und in der *Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank* mit der Nummer JCRB0403 registriert [143]. Es ist bekannt, dass Zellen dieser Linie Serumproteine wie Alpha-Fetoprotein (AFP) und Albumin sezernieren [144]. Die HuH7-Zellen zeigen eine epitheliale Morphologie und weisen ein adhärentes Wachstum mit einer Verdoppelungszeit von 1,5 bis 2 Tagen auf. Kasai et al. zeigten in einer Genomanalyse den sehr komplexen und heterogenen Karyotyp der HuH7-Zellen auf, mit breitflächigem Verlust der Heterozygotie und Chromosomenveränderungen in über 50% der untersuchten Zellen [145]. Außerdem konnten Mutationen in der Gensequenz der Tumorsuppressorproteine p53 und RB (Retinoblastomprotein) nachgewiesen werden [146]. Die Inokulation eines *Xenografts*

aus HuH7-Zellen in Matrigel® und das daraus erfolgreiche Wachstum eines soliden Tumors in der CAM eines HET-CAM-Modells konnte bereits beschrieben werden [147]. Auch die RONS-vermittelte Induktion von Apoptose durch CAP in HuH7-Zellen einer konventionellen Zellkultur ist bereits untersucht worden [148].

Die AG Brieger im HNO-Labor der Universitätsmedizin Mainz hat die HuH7-Zelllinie von der AG Lynch-Syndrom unter der Leitung von [REDACTED] am Universitätsklinikum Frankfurt am Main erhalten und seitdem in Kultur. Ursprünglich wurde diese von der Firma RIKEN BioResource Center in Tsukuba-shi, Japan bezogen.

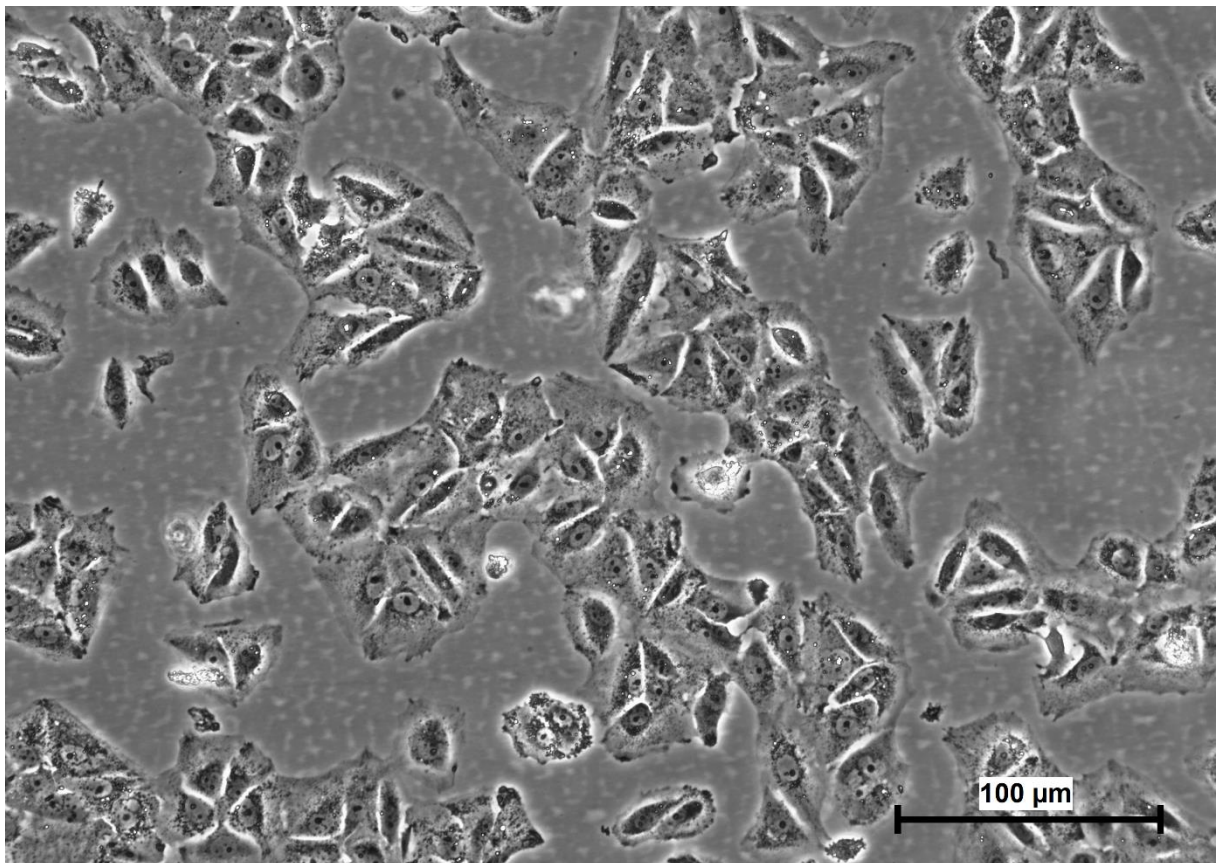


Abbildung 5: Adhärenz HuH7-Zellen in der Zellkultur, Lichtmikroskopische Aufnahme in 150x Vergrößerung.

3.1.3 Hühnereier

Die für die Versuche verwendeten Hühnereier wurde von der Firma LSL Rhein-Main in Dieburg, Deutschland bezogen. Die befruchteten Eier des White-Leghorn-Huhns

wurden meist einen Tag, frühestens jedoch zwei Tage vor Versuchsbeginn geliefert und bis zum Start der Bebrütung in einem kühlen, klimatisierten Raum gelagert. Um eine mögliche Kontamination zu verhindern, wurden die Eier ausschließlich mit Handschuhen berührt.

3.1.4 Chemikalien, Antikörper und Lösungen

Bezeichnung	Hersteller
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	Agilent, Santa Clara, CA (USA)
<i>Cleaved Caspase-3 (Asp175) Antibody</i>	Cell Signaling Technology, Cambridge, (UK)
Dimethylsulfoxid ROTIPURAN® (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/ F-12 Nutrient Mixture (Ham) (1x) [+] L-Glutamine	Gibco Life Technologies Limited, Paisley (UK)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Eisessig, Essigsäure 100 % ROTIPURAN®	Carl Roth, Karlsruhe
Eosin G-Lösung 0,5% wässrig	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol ROTIPURAN®	Carl Roth, Karlsruhe
Eukitt® <i>Quick-hardening mounting medium</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Fetales Kälberserum (FCS) VWR® Seradigm	VWR Seradigm, Radnor, PA (USA)
Formaldehyd 4 %	VWR International bvba, Leuven (Belgien)
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol (100 %, 90 %, 80 %, 70 %)	Aug. Hedinger GmbH & Co. KG, Stuttgart
Matrigel® <i>Basement Membrane Phenol Red Free</i>	Discovery Labware Inc./Corning, Bedford, MA (USA)
Methanol	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)

<i>Monoclonal Mouse Anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)</i>	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Carl Roth, Karlsruhe
Normalserum (<i>Goat-serum, normal</i>)	Agilent, Santa Clara, CA (USA)
Paraffin Roti®-Plast	Carl Roth, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin (Pen/Strep)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Rinderalbumin (BSA)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Streptavidin/HRP	Agilent Dako, Santa Clara, CA (USA)
TRITC-Dextran 70 kd	TdB Labs AB, Uppsala (Schweden)
Trypanblau Trypan Blue solution 0,4 %	Sigma-Aldrich, Dorset (UK)
Trypsin-EDTA Solution (TE)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Tween® 20	Carl Roth, Karlsruhe
VECTASHIELD® <i>Mounting Medium with DAPI</i>	VectorLaboratories Inc., Burlingame, CA (USA)
VE-Wasser	Hausanlage
Wasserstoffperoxid 30 %	Carl Roth, Karlsruhe
Xylol/ Xylene	AppliChem GmbH, Darmstadt
Zitronensäure Monohydrat	Carl Roth, Karlsruhe
<i>α-SMA Monoclonal Anti α-Smooth Muscle Actin Antibody</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)

3.1.5 Geräte und Werkzeuge

Bezeichnung	Hersteller
Autoklav tuttner Systemec	Systemec GmbH, Linden
Bebrüter Brutmaschine Modell 3000/d	Brutmaschinen-Janeschitz GmbH, Hammelburg
Brutschrank/CO ₂ Inkubator HERAcell 150i	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
CoolCell® <i>Cell Freezing Container</i>	biocision, Larkspur, CA (USA)
Dampfkocher	SilverCrest, Soest
Doppelspatel 18/10 Stahl	Bochem Instrumente GmbH, Weilburg

DURAN [®] , Laborflasche 1l	Duran Group GmbH, Wertheim/Main
Feinwaage, Kern ABT120-5DM	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr GmbH, Ochsenhausen
Gefrierschrank -80 °C Herafreeze [™]	Heraeus Holding GmbH, Hanau
<i>Heated Paraffin Embedding Module EG 1140H</i>	Leica Biosystems, Nussloch
Kolbenhubpipetten 1000µl, 200µl, 20µl	Eppendorf AG, Hamburg
Kühlschrank	Liebherr GmbH, Ochsenhausen
Mikroskop Nikon Eclipse TE2000-U	Nikon Corp. Chiyoda, (Japan)
Mikroskopieschere, geknöpft	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Mikroskopische Pinzette	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Mikroskopkamera Nikon DS-Fi3	Nikon Corp. Chiyoda, (Japan)
Mikrotom RM 2165	Leica Biosystems, Nussloch
Pipettierhilfe PIPETBOY	INTEGRA Bioscience Deutschland GmbH, Biebertal
Smartphone-Kamera, Oneplus 6T	One Plus Technology Co. Ltd., Shenzhen (China)
Smartphone-Kamera, Xiaomi Mi A1	Xiaomi Corporation, Beijing (China)
Stativ zur Photographie	Eigenanfertigung
Sterile Werkbank Herasafe [™]	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Stickstofftank Nitrogen-tank CRYO-4000	Chart Industries, Burnsville, MN (USA)
Ultraschallgerät Ultrasound LOGIQ E9	GE Healthcare, Little Chalfont (UK)
Vortex-Schüttler, VV3	VWR, Radnor, PA (USA)
Zählkammer „Neubauer-improved“	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Zentrifuge Multifuge 1L-R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Zentrifuge Universal 16 R	Hettich, Tuttlingen

3.1.6 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
6-Well-Platte cellstar®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Deckglas	IDL GmbH & Co KG, Nidderau
Desinfektionsmittel Terralin® liquid	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
Desinfektionsspray GermDecon Spray	Sereva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Eindeckkassette weiß, Rotilabo®	Carl Roth, Karlsruhe
Falcon-Röhrchen cellstar® 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Federskalpell (<i>disposable scalpel</i>) No.11	Feather safety razor Co., LTD., Osaka (Japan)
Filterpapier für Eindeckkassetten Tissue-TEK II	Vogel GmbH & Co. KG, Gießen
Kanüle 21G, BD Microlance® 3	Becton Dickinson S.A., Fraga (Spanien)
Kanüle 30G, BD Microlance® 3	Becton Dickinson S.A., Fraga (Spanien)
Kit für Mycoplasmen-PCR Venor® GeM Classic	Minerva biolabs GmbH, Berlin
Klebestreifen Tesafilm®	Tesa, Norderstedt
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Objektträger	Diagonal GmbH & Co. KG, Münster
Petrischalen cellstar® 145 cm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen für Kolbenhubpipetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Präzisionstücher, Kimtech Sience	Kimberly-Clark Europe, Reigate (UK)
Safe-Lock Tubes „Eppendorf Reagiergefäße“ 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Schwämme für Eindeckkassetten	Carl Roth, Karlsruhe

Serologische Pipetten cellstar® 10 ml, 25 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Silbernitrat-Kaliumnitrat-Ätzstäbchen	BANO Healthcare GmbH, St. Anton/Arlberg
Spritze 10 ml, BD Discardit® 2	Becton Dickinson S.A., Fraga (Spanien)
Spritze 1ml, Injekt-F Luer Solo	Braun Melsungen AG, Melsungen
Verschlussfolie Parafilm®	Bemis, Oshkosh, WI (USA)
Vliespflaster Micropore™	3M Deutschland GmbH, Neuss
Zellkulturflaschen cellstar®, 175 cm ² Bodenfläche	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

3.1.7 Software

Bezeichnung	Hersteller
Cap-Image 8.10.1	Zeintl Software, Heidelberg
cellSens Dimension 1.14	Olympus GmbH, Hamburg
EndNote X9.2	Clarivate Analytics, Philadelphia, PA (USA)
IBM® SPSS® Statistics Version 23.0.0.0	IBM, Armonk, NY (USA)
ImageJ Version 1.52o	Wayne Rasband, National Institutes of Health (USA)
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmond, WA (USA)
Microsoft Word	Microsoft Corporation, Redmond, WA (USA)
NIS-Elements Version 5.11.00	Nikon Corp. Chiyoda, (Japan)

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Die Arbeit an der Zellkultur erfolgte stets bei aseptischen Bedingungen unter einer Reinraumwerkbank. Zur Kultivierung der Zellen wurde ein Medium aus 93% DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), 2% P/S (Penicillin-Streptomycin) und 5% FCS verwendet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C und einem CO₂ Gehalt von 5% in Zellkulturflaschen mit einer Bodenfläche von 175 cm². Während der Kultivierungszeit der HuH7-Zelllinie wurde das Zellmedium alle 2-3 Tage ausgetauscht, um eine optimale Nährstoffversorgung der Zellen zu gewährleisten. Eine Kontrolle des Zellwachstum erfolgte regelmäßig lichtmikroskopisch. Des Weiteren wurde alle 3 Monate eine Überprüfung auf Mykoplasmen-Kontamination mittels PCR-Analyse des Zellüberstands durchgeführt.

3.2.1.1 Passagieren der Zellen

Bei einer lichtmikroskopisch geschätzten Bodendeckung von über 80% wurden die Zellen passagiert. Hierbei erfolgte die Aufteilung der Zellen in einer Kulturflasche auf 2 bis 3 neue Kulturflaschen. Das Medium in den Flaschen wurde hierzu abgegossen, wobei die am Boden adhärenen Zellen in der Zellkulturflasche verblieben. Durch anschließendes Spülen mit 3-5 ml PBS konnte das Medium vollständig entfernt werden. Bei der darauffolgenden Inkubation der Zellen mit 6 ml TE (Trypsin-EDTA) im Brutschrank bei 37° für 3 Minuten lösten sich diese vom Boden der Zellkulturflasche ab. Danach ließen sich die Zellen durch Klopfen an den Rand der Kulturflasche endgültig lösen und das Trypsin durch die Beigabe von 10 ml Medium inaktivieren. Die losen Zellen wurden im zugegebenen Medium suspendiert, in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und für 5 Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert. Der sich hierbei bildende Überstand wurde anschließend vorsichtig abgekippt, die Zellen im Pellet erneut in Medium suspendiert und in die neuen Maxi-Zellkulturflaschen aufgeteilt. Diese wurden schlussendlich auf ein Gesamtvolumen von 25 ml Medium pro Zellkulturflasche aufgefüllt und zur weiteren Kultur im Brutschrank platziert.

3.2.1.2 Kryokonservierung

Zum Erhalt der Zelllinie wurde ein Teil der Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Hierzu wurden diese zunächst wie beschreiben mit TE von der Zellkulturflasche gelöst und zentrifugiert. Nach Verwurf des Überstands wurde das Zellpellet in FCS mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgenommen. Das DMSO diente hierbei als Gefrierschutzmittel, welches die Kristallbildung und damit verbundene Zellschäden beim Gefrieren verhinderte. Die Zellsuspension wurde auf Kryoröhrchen aufgeteilt und in einem *Cool/Cell*[®]-Behälter über Nacht bei -80°C tiefgefroren. Der *Cool/Cell*[®]-Behälter gewährleistete eine schrittweise Abkühlung der Suspension um 1°C pro Minute. Letztlich wurden die Kryoröhrchen am nächsten Morgen zur dauerhaften Lagerung in den Stickstofftank überführt.

Um Zellen aus dem Stickstofflager in Kultur zu nehmen, wurden die Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Anschließend konnten die aufgetauten Zellen in 10 ml warmen Medium suspendiert und um das DMSO zu entfernen bei 1500 U/min für 5 min zentrifugiert werden. Die Zellen im Pellet konnten nun, wie zuvor beschrieben in eine Zellkulturflasche ausgebracht werden.

3.2.1.3 Herstellung von 3D-Zellkulturen mit Matrigel[®]

Für die Herstellung von 3D-Zellkulturen wurde Matrigel[®] eingesetzt. Hierbei handelt es sich um eine dickflüssige Mischung aus Extrazellulärproteinen, welche von murinen Engelbreth-Holm-Swarm Sarkom-Zellen sezerniert wird. Es stellt die komplexe extrazelluläre Zellumgebung der Basalmembran in Geweben nach und unterstützt durch die gelförmige, basalmembranartige Matrix die 3D-Zellkulturen [149]. Zum Einsatz kamen pro 3D-Kultur je 5 Mio. HuH7-Zellen. Zunächst erfolgte das Passagieren der Zellen aus 8-10 Maxi-Zellkulturflaschen in 25-30 Petrischalen mit einer Bodenfläche von 145 cm² nach dem oben beschriebenen Ablauf. Diese wurden weitere 3 Tage inkubiert, bis die Zellkulturen am Schalenboden 70% - 80% konfluent waren. Nach lichtmikroskopischer Kontrolle des Zellmusters wurde das Medium abpipettiert, mit 5 ml PBS gespült und 3 ml TE pro Petrischale aufgebracht. Durch eine 3-minütige Inkubation bei 37°C und Klopfen am Rand der Petrischalen konnten die Zellen vom Boden abgelöst werden. Das TE wurde hiernach mit 4 ml Medium pro

Petrischale abgestoppt und die Zellen in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Daraufhin wurden diese bei 1500 U/min für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand in den Röhrchen vorsichtig abgekippt und das Pellet erneut in 50 ml Medium suspendiert.

Zur Bestimmung der Zellzahl pro Falcon-Röhrchen erfolgte anschließend die Färbung mit Trypanblau und die Auszählung in einer Neubauer-Zählkammer. Hierfür wurden 20 µl der Zell-Suspension entnommen und in einer 48-well-Platte mit 20 µl Trypanblau gemischt. Aus dieser gefärbten Zellsuspension wurden 20 µl in eine Neubauer-Zählkammer eingebracht, worin im Anschluss die blau angefärbten Zellen lichtmikroskopisch ausgezählt werden konnten. Für die Berechnung der Zellzahl pro ml in der Suspension wurde folgende Formel verwendet:

$$\frac{\text{Anzahl gezählter Zellen}}{\text{Anzahl ausgezählter Quadranten}} \times 2 (\text{Verdünnung}) \times 10\,000 (\text{Kammerfaktor}) \\ = \text{Zellzahl/ml}$$

Hierbei wurden pro Probe mindestens 2 Quadranten der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Durch die Verdünnung der Zellsuspension mit dem gleichen Volumen Trypanblau musste ein Verdünnungsfaktor von 2 berücksichtigt werden. Der Kammerfaktor von 10 000 war vom Hersteller vorgegeben.

Im Anschluss wurde aus der Zellzahl pro ml die Gesamtzellzahl pro Falcon-Röhrchen errechnet und dieses erneut bei 1500 U/min für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand konnte nun, wie zuvor verworfen und das verbleibende Pellet in einem entsprechenden Volumen Medium suspendiert, so dass eine Zellsuspension mit 5 Mio. Zellen/ml entstand. Von dieser wurde schließlich je 1 ml in 1,5 ml Eppendorf-Reagiergefäße gegeben, welche bei 1500 U/min für 8 Minuten zentrifugiert wurden. Nach vorsichtigem abpipettieren des Überstands lag nun pro Eppendorf-Reagiergefäß ein Pellet aus je 5 Mio. Zellen vor.

Das Matrigel[®], mit einem Gesamtvolumen von 10 ml/Charge wurde zunächst auf Eis aufgetaut, um es in Röhrchen mit einem Volumen von 200 µl aufzuteilen und anschließend bei -18°C zu lagern. Diese Portionierung ermöglichte ein schnelles Auftauen bei Bedarf. Für die Erstellung der 3D-Kulturen wurden die Matrigel[®]-Röhrchen ca. 1 h auf Eis aufgetaut. Aus dem bei 0°C flüssigen Matrigel[®] konnten anschließend je 25 µl mit einer 100 µl fassenden Pipette aufgenommen und durch

vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mit einem Pellet aus 5 Mio. Zellen vermisch werden. Das Zell-Matrigel®-Gemisch konnte schließlich in eine 6-Wellplatte aufgebracht und für 20 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert werden. Nach der Inkubation konnte zu den nun festen und am Plattenboden adhären 3D-Kulturen 3 ml Medium pro Well hinzugegeben werden. Die 3D-Kulturen wurde daraufhin für weiter 12-24 h im Brutschrank gelagert und anschließend in das CAM-Modell eingebracht.

3.2.2 Das Chorion-Allantois-Membran Modell

Für das CAM-Modell wurden befruchtete Eier des White-Leghorn-Huhns für 11-14 Tage inkubiert. An Tag 3 & 5 erfolgte die schrittweise Eröffnung der Eischale zur freien Exposition der Chorion-Allantois-Membran. Diese wurde an Tag 7 der Bebrütung mit je einer 3D-Kultur aus 5 Mio. HuH7-Zellen in Matrigel® besiedelt. Von Tag 10-14 erfolgte in der Interventionsgruppe die Behandlung mit CAP. Mit der Kontrollgruppe wurde stets gleich verfahren, jedoch erfolgte keine Exposition gegenüber CAP, sondern lediglich eine Aufbewahrung im homologen Behandlungsbehältnis für die Dauer der korrespondierenden Behandlungszeit.

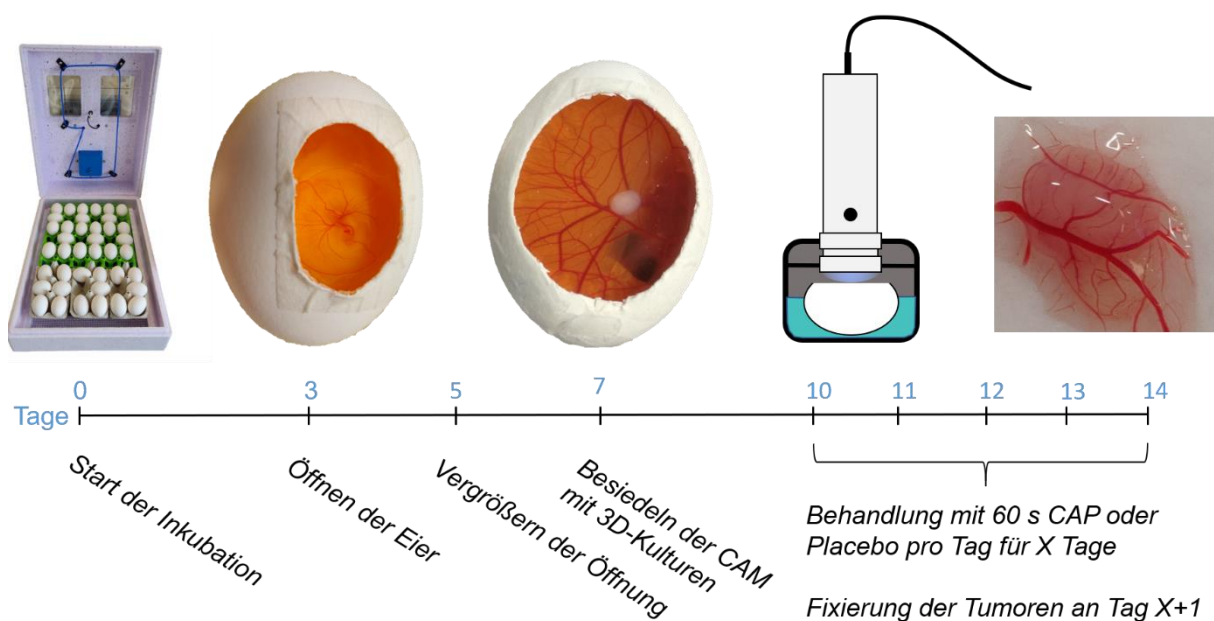


Abbildung 6: Zeitplan des CAM-Modells. Zu sehen ist die befüllte Brutmaschine zu Beginn der Inkubation, ein eröffnetes Ei an Tag 3, ein mit einer 3D-Kultur aus HuH7-Zellen besiedeltes Ei an Tag 7

und anschließend die schematisch dargestellte CAP-Behandlung an Tag 10-14 der Bebrütung. An Tag 14 ist ein gut durchbluteter Tumor in der CAM abgebildet, welcher mitsamt der umliegenden CAM exzidiert wurde.

3.2.2.1 Inkubation

Die Hühnereier wurden einen Tag vor Versuchsbeginn geliefert und in einem kühlen, klimatisierten Raum gelagert. Vor jedem Versuchsdurchlauf erfolgte eine manuelle Reinigung der Eier mit autoklaviertem VE-Wasser, beschädigte Exemplare wurden aussortiert. Die gesäuberten Eier konnten anschließend waagrecht in die vorgewärmten Brutapparate eingelegt werden und die Inkubation bei 38°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von durchschnittlich 60% begonnen werden. Um die Luftfeuchtigkeit konstant zu halten, wurden die Wasserrinnen der Brüter mit autoklaviertem VE-Wasser befüllt, welches im Versuchsverlauf regelmäßig ausgetauscht wurde. Zur Orientierung im weiteren Versuchsablauf wurden die Eier am oberen Pol mit einem Permanent-Marker markiert und während der Bebrütung nicht gedreht.

3.2.2.2 Eröffnung der Eischale

An Tag 3 der Bebrütung erfolgte die erste Öffnung der Schale zur Freilegung der sich bildenden Chorion-Allantois-Membran. Hierfür wurden zunächst pro Ei 6ml Eiklar (*Albumen*) mit einer 21G-Kanüle am stumpfen Pol abgenommen. Um ein Auslaufen von Eiklar zu verhindern, wurde das Punktionsloch anschließend fest mit Tesafilm verschlossen. Durch die Entnahme von Volumen aus dem Ei senkte sich die auf dem Eiklar schwimmende Keimscheibe ab und bildete einen luftgefüllten Hohlraum zwischen Keimscheibe und Eischale. Dieser konnte nun eröffnet werden, ohne die Keimscheibe durch die Schere oder Schalensplitter zu beschädigen. Hierfür wurde der zuvor markierte obere Pol der Eierschale mit Micropore[®]-Vliespflaster abgeklebt. Dies verhinderte ein übermäßiges Absplittern der harten Eierschale beim Öffnen. Mit einer Schere wurde anschließend die abgeklebte Schale durchstoßen und eine ovale Öffnung ausgeschnitten. Bei erfolgreicher Befruchtung und Inkubation war nun die Keimscheibe mit Herzanlage und ersten Blutgefäßen sichtbar. Nicht befruchtete oder zuvor abgestorbene Eier wurden aussortiert. Die Schalenöffnung wurde anschließend

mit Parafilm verschlossen, um das Verdunsten von Flüssigkeit aus dem Eiklar und den Eintritt von Keimen zu verhindern. An Tag 5 der Bebrütung hatte sich die Chorion-Allantois-Membran weiter ausgebildet und abgesenkt, was eine Erweiterung der Schalenöffnung möglich machte. Hierzu wurden die Ränder der bestehenden Öffnung mit Micropore®-Vliespflaster abgeklebt und vorsichtig mit einer Schere umschnitten. Der Schalenrand lag hierbei noch mindestens 0,5 cm über der CAM. Die Öffnung wurde anschließend erneut mit Parafilm verschlossen.

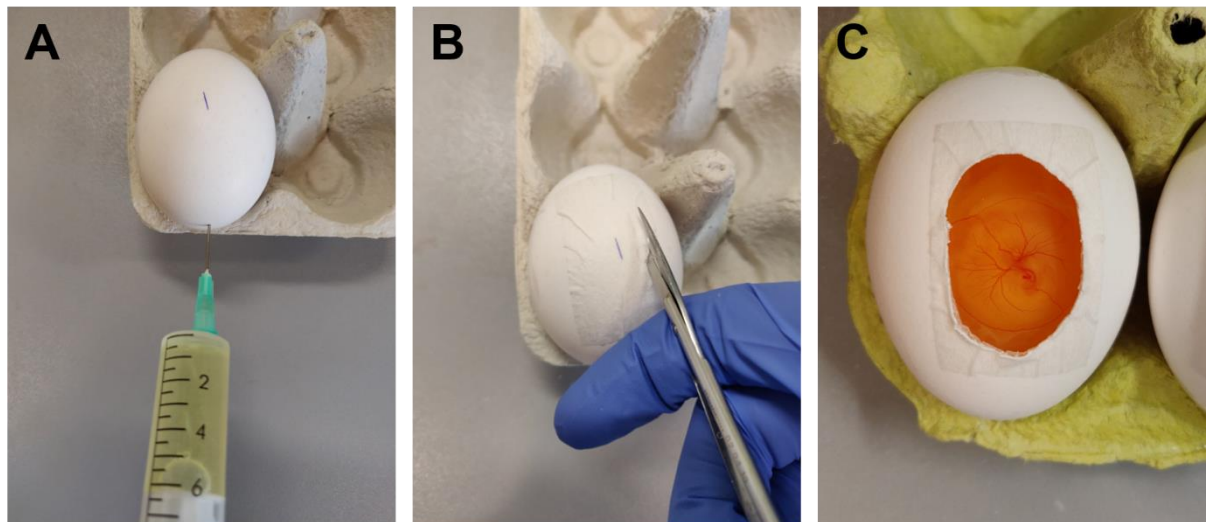


Abbildung 7: Eröffnung der Eischale zur Exposition der sich bildenden CAM. Abgebildet sind (A) das Abnehmen von 6 ml Eiklar, (B) das Öffnen der mit Micropore®-Vliespflaster abgeklebten Eischale und (C) die Keimscheibe an Tag 3 der Inkubation.

3.2.2.3 Besiedelung der CAM

An Tag 7 der Bebrütung erfolgte das Einbringen der einen Tag zuvor erstellten 3D-Kulturen aus 5 Mio. Zellen der HuH7-Linie in Matrigel® in das CAM-Modell. Hierfür wurde auf der inzwischen ausgebildeten und stark vaskularisierten Chorion-Allantois-Membran ein möglichst zentral, jedoch nicht direkt über dem Hühnerembryo gelegener Bereich der CAM aufgesucht. An dieser Stelle wurde mit einem Federskalpell der Größe 11 die CAM samt einem Blutgefäß leicht angeritzt. Dieses Trauma sollte die Inokulation der Tumorzellen fördern und einen weiteren Reiz zur Neoangiogenese schaffen. Die 3D-Kultur wurde daraufhin mit einem Löffelspatel vom Boden der 6-Wellplatte abgehoben und auf die traumatisierte Stelle der CAM gelegt. Zur verbesserten Nährstoffversorgung und Prävention einer Luxation des lose aufgetragenen Tumors wurden anschließend 25 µl flüssiges Matrigel® auf die 3D-

Kultur pipettiert, welches zuvor auf Eis aufgetaut worden war. Dies verhinderte zudem ein zu starkes Austrocknen der 3D-Kulturen auf der CAM. Die Öffnung in der Eierschale wurde schlussendlich erneut mit Parafilm verschlossen, die Eier vorsichtig horizontal in den Brüter gelegt und für drei Tag nicht bewegt, um ein optimales Anwachsen der Tumorzellen auf der CAM zu begünstigen.

3.2.3 Behandlung mit CAP

An Tag 10 der Bebrütung erfolgte zunächst eine Kontrolle der Tumore auf der CAM. Radiär um den Tumor gebildete Blutgefäße als Hinweis auf stattgefunden Angiogenese wurden als Zeichen für eine erfolgreiches Einwachsen der HuH7 Zellen in die CAM gewertet. Eier mit nicht angewachsenen, ausgetrockneten 3D-Kulturen wurden aussortiert. Außerdem wurde die Position der Tumore auf der CAM bewertet. Nur vollständig exponierte, zentral liegende Tumore konnten in die Versuche eingeschlossen werden. Zu nahe an der Schale liegende, oder mit dieser verklebte Exemplare wurden hingegen aus dem Versuch genommen. Dies sollte eine gleichmäßige Exposition der Tumorzellen gegenüber der Behandlung mit CAP gewährleisten. Anschließend erfolgte aus den verbleibenden Eiern eine willkürliche Zuweisung in die Kontroll- und CAP-Gruppe. Die Anzahl pro Gruppe lag hierbei bei jeweils 20-30 Eiern. Die Behandlung mit CAP erfolgte in der Interventionsgruppe täglich für 60 s. Die Anzahl der Tage, an denen eine Behandlung erfolgte, wurde über den Versuchsverlauf variiert. Hierdurch ergab sich eine kumulierte Gesamtbehandlungsdauer mit CAP von 60-240 s, über die Dauer von 1-4 Tagen.

Für die CAP-Behandlung wurde jeweils ein Ei aus dem Brüter genommen und die Parafilmabdeckung entfernt. Nach Lageüberprüfung des Tumors wurde das Ei horizontal in ein gepolstertes, luftdichtes Schraubgefäß gelegt, in dessen Deckel das Drahtgitter des MiniFlatPlaSter® als CAP-Quelle montiert war. Das Gefäß wurde verschlossen, wodurch die Plasmaquelle ca. 0,5 cm oberhalb der CAM zu liegen kam. Als zusätzlicher Verschluss wurde das Behandlungsgefäß von außen mit Parafilm abgedichtet. Die Behandlung mit CAP erfolgte für konsequente 60 s. Anschließend wurde das Ei für weitere 15 s im verschlossenen Gefäß belassen, bevor dieses geöffnet wurde. Nach der Entnahme des Eis erfolgte eine fotografische Dokumentation der CAM samt Tumor, bevor das Ei mit Parafilm verschlossen und in den Brüter zurückgelegt wurde.

Mit den Eiern der Kontrollgruppe wurde im Sinne einer Placebo-Behandlung nach genau demselben Ablauf verfahren. Die Plasmaquelle MiniFlatPlaSter® war hierbei jedoch vom Stromnetz getrennt, so dass keine Exposition gegenüber CAP erfolgen konnte. Während der Bebrütung waren die Eier der Kontroll- und Interventionsgruppe gemischt auf drei verwendeten Brüter verteilt, um etwaige Unterschiede der einzelnen Brutgeräte auszugleichen. Täglich erfolgte eine Kontrolle und Dokumentation der Vitalität der Eier, sowie eine Untersuchung der CAM auf reaktive Veränderungen wie Eintrübungen und Verdickungen.

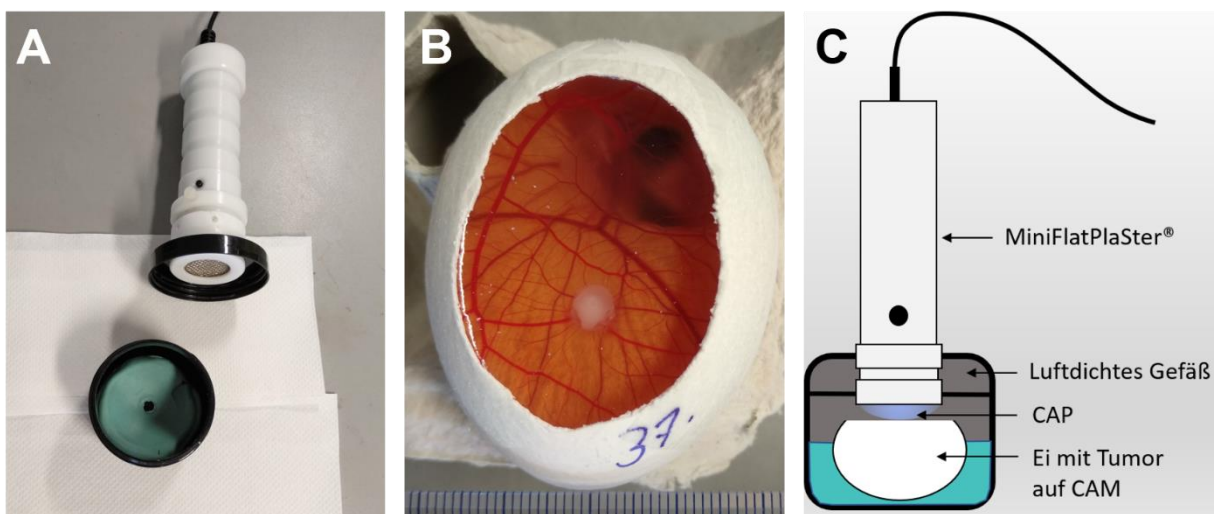


Abbildung 8: Fotoserie zur CAP-Behandlung. Abgebildet sind (A) das Plasmagerät MiniFlatPlaSter®, welches in den Schraubdeckel eines luftdichten Gefäßes integriert ist, (B) ein in die CAM eingewachsener Tumor an Tag 10 der Inkubation mit deutlich erkennbaren, radiär einwachsenden Blutgefäßen und (C) eine schematische Darstellung der CAP-Behandlung. Lizenz: A, B: Eigene Aufnahmen, C: erstellt von Dr. med. Jonas Eckrich, mit freundlicher Genehmigung.

3.2.4 Präparations- und Einbetttechnik

Einen Tag nach der letzten Behandlung mit CAP wurden die Tumore mitsamt umliegender CAM für die Anfertigung histologischer Schnitte aus dem Ei entnommen. Hierfür wurde in allen noch vitalen Eiern der Embryo dekapitiert, die Eischale seitlich eingeschnitten und der Embryo zur einfacheren Handhabung mit seinen umliegenden Strukturen in eine Petrischale gegeben. Die Tumore auf der CAM wurden mit einer chirurgischen Schere im Abstand von ca. 5 mm exzidiert, mit einem Spatel aufgenommen und in eine Petrischale mit destilliertem VE-Wasser überführt. Durch

die Oberflächenspannung des Wassers spannte sich die CAM meist vollständig auf und ermöglichte ein einfaches Aufziehen des Präparates auf Filterpapier. Nach der Einlage in eine Einbettkassette mit einem Einbettschwamm erfolgte die Fixierung der Präparate in einer 4% Formaldehydlösung bei Lagerung unter dem Abzug.

3.2.5 Histologie

Nach der Fixierung in Formaldehyd wurden die Präparate in Paraffin eingebettet, Schnitte angefertigt und diese einzeln auf Objektträger aufgezogen. Pro Präparat wurde eine Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin-Eosin, sowie drei immunhistochemische Färbungen unter Einsatz von Antikörpern gegen *Proliferating Cell Nuclear Antigen*, aktivierter (*cleaved*) Caspase 3 und α -*Smooth Muscle Actin* angefertigt. Das Einbetten der Präparate sowie die Anfertigung von Schnitten und Färbungen wurde freundlicherweise von [REDACTED] im HNO-Labor der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

3.2.5.1 Paraffineinbettung

Für die Einbettung der Präparate erfolgte zunächst eine Entwässerung dieser in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Isopropanol 70%, 80%, 90%, 100%) und eine zweifache Inkubation in Xylol. Anschließend konnte die Kassette mit flüssigem Paraffin übergossen und Paraffinblöcke erstellt werden. Die einzelnen Arbeitsschritte sind Tabelle 5 zu entnehmen.

Tabelle 5: Protokoll zur Paraffineinbettung

Arbeitsschritt/verwendete Lösung	Inkubationszeit
Spülen in autoklaviertem VE-Wasser	3x 20 min
Isopropanol 70%	1h
Isopropanol 80%	1h
Isopropanol 90%	1h
Isopropanol 100%	min. 1h
Xylol	2h
Xylol	Über Nacht
Paraffin	2x 4h

Die Paraffinblöcke mit den darin liegenden Präparaten konnten anschließend mit dem Mikrotom geschnitten werden. Hierbei wurden Schnitte mit einer Stärke von 5 µm angefertigt und für die anschließenden Färbungen einzeln auf Objektträger aufgezogen.

3.2.5.2 HE-Färbung

Die Färbung mit Hämatoxylin-Eosin diente als Orientierungsfärbung über die Strukturen im Schnittbild. Des Weiteren wurden die HE-gefärbten Schnitte verwendet, um die räumliche Orientierung der Tumore zu ermitteln. Zunächst erfolgte eine Entparaffinierung in Xylol und anschließend die Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe. Daraufhin wurden die Schnitte mit Hämalaun inkubiert, welches die basophilen Strukturen wie Zellkerne und RERs anfärbt. Durch das Spülen unter fließendem Leitungswasser wurde daraufhin der pH-Wert angehoben, was zum Bläuen der sauren bzw. basophilen Strukturen führte. Im Anschluss erfolgte die Färbung der Schnitte mit 0,5% Eosin-Lösung. Dieser waren pro 100 ml Lösung 1 Tropfen Eisessig zugesetzt, welcher durch den sauren pH-Wert das Bläuen der Schnitte stoppte. Durch die Inkubation mit Eosin wurden basische bzw. azidophile Strukturen wie Mitochondrien und Kollagen rötlich angefärbt. Abschließend erfolgte die Rehydrierung der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe und die erneute Fixierung durch das Intermedium Xylol. Alle Arbeitsschritte und Inkubationszeiten sind Tabelle 6 zu entnehmen.

Tabelle 6: Protokoll zur Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Arbeitsschritt/verwendete Lösung	Inkubationszeit
Deparaffinierung in Xylol	2 x 5 min
Isopropanol 100%	5 min
Isopropanol 90%	5 min
Isopropanol 80%	5 min
Autoklaviertes VE-Wasser	5 min
Färbung mit Mayer's Hämalaun	5 min
Bläuen in fließendem Leitungswasser	10 min
Spülen mit autoklaviertem VE-Wasser	2 min

Färbung mit Eosin 0,5% (1 Tropfen Eisessig/100ml)	2-3 min
Spülen in Leitungswasser	1 min
Isopropanol 80%	1-2 min
Isopropanol 90%	1-2 min
Isopropanol 100%	5 min
Inkubation in Xylol	2x 5 min

3.2.5.3 Immunhistochemische Färbungen

Zur immunhistochemischen Färbung der Schnitte wurden monoklonale Antikörper verwendet, die spezifisch an eine oder mehrere Zellstrukturen binden. Zum Einsatz als primäre Antikörper für die Detektion apoptotischer Zellen kamen hierbei Antikörper gegen die aktivierte Caspase 3 (*cleaved Caspase 3*). Dieses Enzym, liegt in apoptotischen Zellen in aktiver Form vor und katalysiert die Fragmentierung des DNA-Strangs. Zur Markierung proliferierender Zellen wurde Antikörper gegen das *Proliferating Cell Nuclear Antigen* verwendet, welches während der DNA-Replikation im Zellkern vorliegt. Blutgefäße im Tumorgewebe wurden mit Antikörpern gegen α -*Smooth-Muscle-Actin* dargestellt, welche an das ACTA2-Protein (*actin alpha 2 protein*) in den Aktinfilamenten der glatten Gefäßwandmuskulatur binden. Nach Einsatz des primären Antikörpers erfolgte die Aufbringung des sekundären Antikörpers, welcher spezifisch am Fc-Teil des primären Antikörpers bindet. Des Weiteren war der 2. Antikörper biotinyliert und konnte hierüber die an Streptavidin gekoppelte HRP (*Horse radish Peroxidase*) binden. Schlussendlich erfolgte durch die HRP eine Oxidierung des zugegebenen DAB (3,3'-Diaminobenzidin) zu einem langkettigen Polymer, welches im Schnitt als Präzipitat ausfiel und die markierte Zellstruktur bräunlich anfärbte.

Die Arbeitsschritte der immunhistochemischen Färbungen sind Tabelle 7 zu entnehmen. Zu Beginn erfolgte eine Entparaffinierung in Xylol und eine Rehydrierung der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe. Nach dem Waschen mit autoklaviertem VE-Wasser und TBS/Tween Puffer (VE-Wasser mit 10% TBS und 1% Tween 20) erfolgte die Antigendemaskierung durch Citratpuffer. Hierfür wurde ein Citratpuffer aus 10 mM Citronensäure und 10 mM Natriumcitrat verwendet. Zur Hitzedemaskierung der Antigene wurden die Schnitte zudem für 30 Minuten im Dampfkocher inkubiert, wonach sie in frischem Citratpuffer abkühlten. Die folgende Inkubation in 80 ml Methanol mit 2 ml H₂O₂ 30% diente der Blockierung endogener

Peroxidasen im Gewebe, welche ansonsten zu einer falsch positiven Anfärbung von Strukturen führen könnten. Als weitere Maßnahme gegen eine Hintergrundfärbung durch unspezifische Antikörperbindungen, erfolgte eine Inkubation in Normalserum aus 1:10 PBS und 1% BSA. Nun konnten die primären Antikörper hinzugegeben werden, welche ebenfalls in PBS/1% BSA verdünnt waren. Die Verdünnung betrug bei cl. Caspase-3 1:50, bei PCNA 1:4000 und bei α -SMA 1:1500. Nach einer mehrstündigen Inkubationszeit und Waschen mit TBS/Tween wurde der zweite, biotinylierte Antikörper eingesetzt. Dieser war 1:250 in PBS/1% BSA verdünnt. Das im Anschluss zugegebene Streptavidin/HRP, welches in einer Verdünnung von 1:200 in PBS/1% BSA eingesetzt wurde, katalysierte schlussendlich die Umsetzung des zugesetzten DAB zu einem braunen Präzipitat, welches die markierten Strukturen anfärbt. Zur Gegenfärbung wurde Hämalaun eingesetzt, wodurch die basophilen Strukturen in den Zellen blau angefärbt wurden.

Tabelle 7: Protokoll der immunhistochemischen Färbungen

Arbeitsschritt/verwendete Lösung	Inkubationszeit
Deparaffinierung in Xylol	2 x 5 min
Isopropanol 100%	5 min
Isopropanol 90%	5 min
Isopropanol 80%	5 min
Isopropanol 70%	5 min
Autoklaviertes VE-Wasser	5 min
TBS/Tween	5 min
Citratpuffer (pH 6) in Dampfkocher	30 min
Frischer Citratpuffer	20 min
Methanol/H ₂ O ₂	20 min
Autoklaviertes VE-Wasser	kurz
TBS/Tween	5 min
Normalserum 1:10 verdünnt (PBS/1%BSA)	30-60 min
1. Antikörper verdünnt in PBS/1%BSA	über Nacht
TBS/Tween	2 x 5 min
2. Antikörper biotinyliert 1:250 verdünnt in PBS/1%BSA	30 min
TBS/Tween	2 x 5 min
Streptavidin/HRP conj. 1:200 verdünnt in PBS/1%BSA	30 min

TBS/Tween	2 x 5 min
DAB	1 min
Autoklaviertes VE-Wasser	5 min
Hämalaun	5 min
Isopropanol 70%	5 min
Isopropanol 80%	5 min
Isopropanol 90%	5 min
Isopropanol 100%	5 min
Inkubation in Xylol	2x 5 min

3.2.6 Mikroskopie und Auswertung der Schnitte

Die Mikroskopischen Präparate wurden mit dem Nikon Eclipse TE2000 Mikroskop begutachtet und mit dem eingebauten Kamerasystem Nikon DS-Fi3, sowie der Analysesoftware NIS-Elements in Einzelbildern aufgenommen. Hierbei erfolgten von jedem fixiertem Tumor je eine Übersichtsaufnahme in 4facher Vergrößerung in HE-Färbung, sowie Detailaufnahmen in 200facher Vergrößerung der cl. Caspase 3-Färbung und 100facher Vergrößerung der α -SMA-Färbung. Die Detailaufnahmen wurden anschließend mittels dem von Preibisch et al. [150] entwickelten *Stitchingplugin* für die ImageJ Version 1.52o zu einer Gesamtaufnahme der Schnittfläche zusammengefügt. Die histologischen Präparate nach PCNA-Färbung ließen auf Grund der im Tumorgewebe stark erhöhten Proliferation keine suffiziente Auswertung zu, daher wurde auf die Digitalisierung der Schnitte verzichtet.

3.2.6.1 Hämatoxylin-Eosin (HE)

Zunächst wurden die mit HE gefärbten Schnitten begutachtet, um einen Überblick über das Schnittbild zu gewinnen. Hierbei wurde die räumliche Orientierung der Tumore im Schnitt ermittelt. Um festzustellen, welche Seite der Tumore dem CAP zugewandt war (oben) und welche der abgewandten Seite entsprach (unten) wurde folgendes Ranking erstellt, nach dem jeder Tumorschnitt bewertet wurde:

1. Bewertung der CAM-Epithelien: Hierbei entsprach der Chorionanteil der CAM, ein zwei- oder mehrschichtiges Epithel, der CAP-zugewandten Seite des

- Tumoranschnitts, während der Allantoisanteil der CAM, ein einschichtiges Epithel, der CAP-abgewandten Seite entsprach.
2. Bewertung der Wuchsform: Die typisch bauchige Wuchsform der Tumore (siehe Abbildung 9) entstand durch das Einwachsen in die CAM (nach unten), ausgehend von der auf der Chorionseite (oben) der CAM liegenden 3D-Kultur.
 3. Bewertung der Matrigel®-Auflage: Beim Aufbringen einer 3D-Zellkultur auf die CAM wurden zusätzlich 25 µl Matrigel® auf die Kultur pipettiert. Diese Matrigel®-Auflage konnte teils an der Oberseite der fixierten Tumore beobachtet werden.
 4. Bewertung der Filterpapierposition: Durch den stets gleich ablaufenden Fixierungsprozess der Tumore sollte das verwendete Filterpapier an der Unterseite der Tumore zu liegen kommen und war dort teilweise erkennbar.

Die immunhistochemischen Färbungen wurden anschließend mit den HE-Schnitten verglichen und anhand dieser räumlich ausgerichtet.

3.2.6.2 Aktivierte Caspase 3

Um eine Verfälschung der Apoptosezahlen im Tumorgewebe durch nicht suffizient eingewachsene und mit Blutgefäßen versorgte Tumore zu vermeiden, wurden in die Auswertung der gegen aktivierte Caspase 3 gefärbten Schnitte nur Tumore mit intratumoralen oder umliegenden Blutgefäßen einbezogen (α -SMA-Kategorie 2 und 1, siehe Abschnitt 3.2.6.3). Zur Ermittlung der Anzahl apoptotischen Zellen pro Fläche im Tumoranschnitt, wurde anschließend in den gegen aktivierte Caspase 3 gefärbten Schnitten die zu bewertenden Flächen (*Regions of Interest/ROI*) mit einer Größe von 100x400 µm und einer Fläche von jeweils 40 000 µm² in den Schnittbildern definiert. Durch eine schichtweiße Position der ROI in drei Säulen pro Schnitt sollte ein Vergleich der Apoptosenzahl pro ROI von oberflächlichen und tieferen Tumorbereichen ermöglicht werden. Wie in Abbildung 9 dargestellt, wurden die ROI-Säulen als repräsentative Flächen gleichmäßig in jedes Drittel des Tumoranschnitts verteilt.

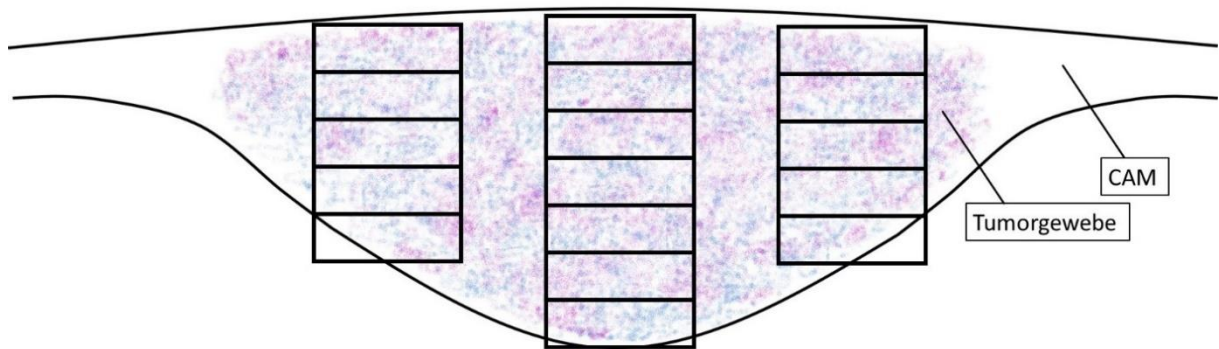


Abbildung 9: Anordnung der ROI in den Schnitten mit akt. Caspase 3-Färbung, schematische Darstellung des Tumoranschnitts mit Säulen aus ROI zu je $100\ \mu\text{m} \times 400\ \mu\text{m}$.

Anschließend erfolgte eine verblindete Auszählung der in der Immunhistochemie positiv angefärbten Zellen pro ROI. Dies stellten sich als braun gefärbte Zellen vor der bläulichen Gegenfärbung dar. ROI deren Fläche mit weniger als $2/3$ Tumorgewebe bedeckt waren, wurden nicht gewertet. Die gezählten Apoptosen pro ROI wurden mit genauer Positionsangabe der ROI zur weiteren Analyse in ein Excelblatt übertragen.

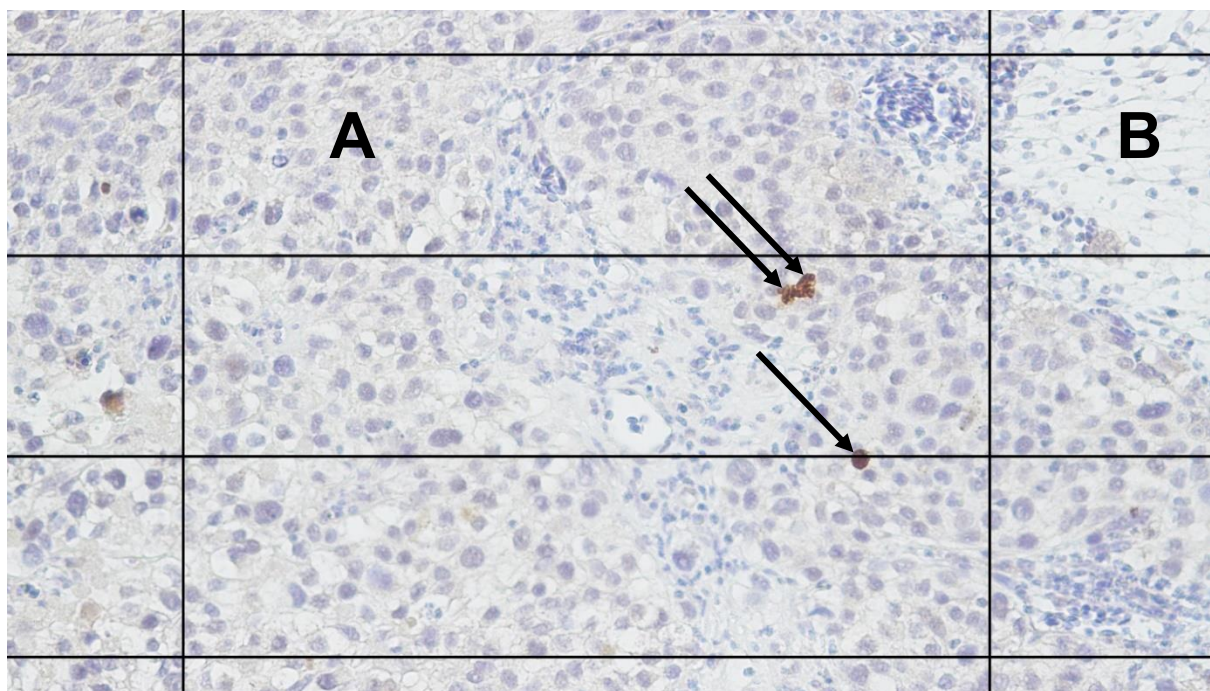


Abbildung 10: Apoptotische Zellen im Tumorgewebe, lichtmikroskopische Aufnahme in $200\times$ Vergrößerung, akt. Caspase 3-Färbung. Abgebildet sind 3 ROI mit jeweils $100\ \mu\text{m}$ Höhe und $400\ \mu\text{m}$ Breite mit (A) vitalem Tumorgewebe mit bräunlich gefärbten, apoptotischen Zellen (Pfeilmarkierung) und (B) Bindegewebe.

3.2.6.3 α -Smooth Muscle Antigen (α -SMA)

Zur Detektion von Blutgefäßen in den Tumoranschnitten wurden diese unter Einsatz von Antikörpern gegen α -SMA gefärbt. Hierdurch ließ sich die glatte Muskulatur in reifen Blutgefäßen braun anfärben, Kapillaren konnten jedoch nicht detektiert werden. Zur semiquantitativen Untersuchung der Vaskularisierung der Tumore wurde diese anhand der mikroskopischen Aufnahmen in drei Kategorien aufgeteilt (siehe Abbildung 11): In Kategorie 0 waren keine Gefäße im oder am Tumorgewebe erkennbar, in Kategorie 1 waren randständige Blutgefäße um die Tumorknötchen herum sichtbar, die Tumore in Kategorie 3 zeigten eine Vaskularisierung im Tumorgewebe, sowie peripher gelegene Gefäße.

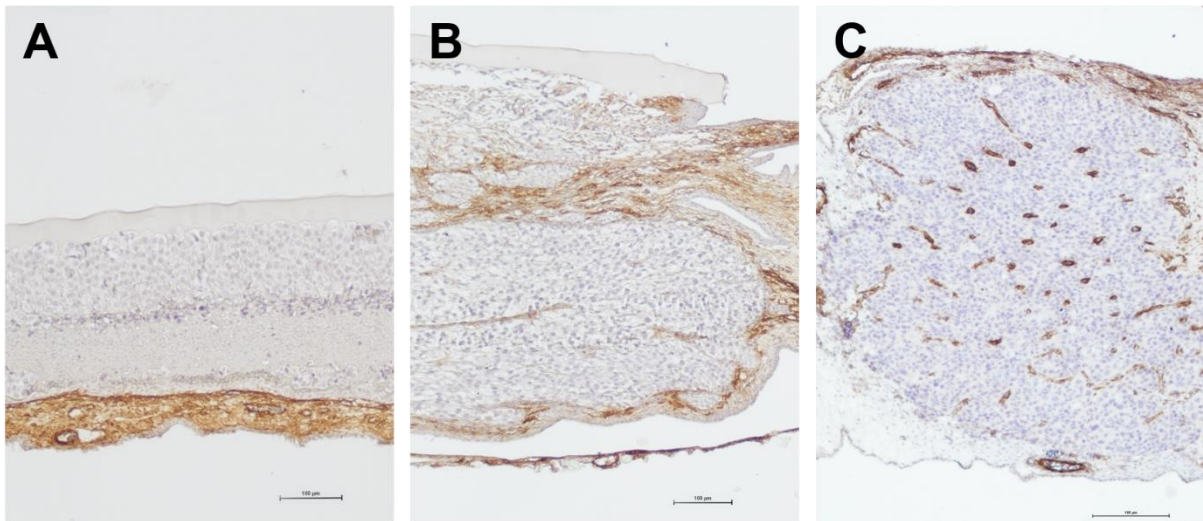


Abbildung 11: Kategorien zur Bewertung der Tumolvaskularisierung, lichtmikroskopische Aufnahmen in 100x Vergrößerung, α -SMA-Färbung. (A) In Kategorie 0 sind keine Blutgefäße im oder am Tumorgewebe sichtbar. (B) In Kategorie 1 sind peripher um das Tumorgewebe liegende Blutgefäße im Bindegewebe sichtbar. (C) In Kategorie 2 finden sich im Tumorgewebe selbst angefärbte Gefäße.

In den Tumoren nach 4x 60 s CAP- oder Placebobehandlung wurde zudem exemplarisch die mittlere Blutgefäßdichte pro mm^2 ermittelt. Hierzu erfolgte in den digitalisierten Schnittbildern in 100x Vergrößerung zunächst die Vermessung der Fläche des Tumorgewebes im Schnitt mittels Image J. Anschließend wurden die Blutgefäße im gesamten Anschnitt des Tumorgewebes ausgezählt und die Blutgefäßdichte als Blutgefäße/ mm^2 berechnet.

3.2.7 Quantitative *real-time* PCR

Um die Auswirkung von CAP auf die VEGF-Expression im CAM-Gewebe zu untersuchen, wurden native Eier ohne Tumore wie zuvor beschreiben für 4 Tage (Tag 10-13 der Inkubation) mit jeweils 60 s CAP behandelt. An Tag 14 erfolgte die Entnahme der CAM aus dem Ei und die sofortige Lagerung in flüssigem Stickstoff, um den Abbau von RNA im Gewebe zu verhindern. Die anschließende Isolation der RNA und quantitative *real-time* Polymerase Kettenreaktion (qPCR) wurden freundlicherweise von [REDACTED] und [REDACTED] im Labor der Mund-Kiefer- Gesichtschirurgie an der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt. Dies erfolgte nach bereits von der Arbeitsgruppe publizierter Methodik [151].

Die mRNA des gesamten Gewebes wurde hierbei mit Hilfe des RNeasy Mini Kits isoliert und deren Konzentration und Reinheit anschließend mit dem NanoDrop™ One bewertet. Zum Umschreiben der RNA in cDNA kam das iScript™ cDNA Synthesis Kit 100 zum Einsatz. Die anschließende qPCR wurde für jede Probe zwei Mal, mit je 5 µl cDNA in jeder PCR-Reaktion und dem iTaq Universal SYBR Green Supermix durchgeführt. Die Daten wurden schließlich mit dem CFX Connect Real-Time PCR Detection System und der zugehörige Bio-Rad CFX Manager Software erhoben. Als endogene Referenzwerte wurde sowohl das Beta Aktin Gen als auch das HRPT1 Gen (Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase) herangezogen. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 8 detailliert aufgeführt. Die Eignung als Referenzgen wurde mit dem Normfinder Microsoft Excel Add-in bestimmt. Die Quantifizierung der Genexpression erfolgte anschließend nach der $\Delta\Delta CT$ Methode [152] unter Verwendung einer internen Kalibrator-Probe (Ei C17), mit der die restlichen Proben verglichen wurden. Die angegebenen Expressionslevel im Ergebnisteil sind daher relative Werte zur Kalibrator-Probe.

Tabelle 8: In der qPCR eingesetzte Primer

Gen	RefSeq ID	Primer	Basensequenz
VEGFA	NM_205042.2	cVEGF3-s	AGAAAGGCCGGTACAAACCA
		cVEGF3-as	GCAAGTGCGCTCGTTTAACT
Beta-Aktin Gen	ENSGALT00000015673	cACTB-s	ACCCCAAAGCCAACAGA
		cACTB-as	CCAGAGTCCATCACAATACC

HPRT1	AJ132697	cHPRT1-s	GCACTATGACTCTACCGACTATTG
		cHPRT1-as	CAGTTCTGGGTTGATGAGGTT

3.2.8 *In ovo*-Sonographie

Die *in ovo*-Sonographie als Methode zur dreidimensionalen Darstellung von Tumoren auf der CAM wurde von Eckrich et al. in der AG Brieger an der Universitätsmedizin Mainz entwickelt [112]. Hiermit können nicht nur Tumore auf der CAM in mehreren Ebenen dargestellt, sondern unter Verwendung eines Farbdopplers auch Blutgefäße im Tumorgewebe bewertet werden. Durch die abgeschirmte Lage der CAM, umgeben von einer röntgendichten Eischale, ist die Evaluation der dreidimensionalen Ausdehnung von Tumoren im HET-CAM-Modell mit herkömmlichen Methoden stark erschwert. Die Auflichtmikroskopie der Tumore durch die Schalenöffnung ist zwar möglich, wird dem multidirektionalen Wachstum der Tumore in die CAM jedoch nicht gerecht. Die Fixierung und Färbung von Tumoren als häufig angewendete Methode erlaubt zudem nur eine Endpunkt-Analyse ohne Möglichkeit einer Evaluation der Wachstumsdynamik. Repetitive *in ovo*-Ultraschalluntersuchung erlauben hingegen das Tumolvolumen im lebenden Organismus an mehreren Zeitpunkten zu erheben und Blutgefäße in den Tumoren darzustellen.

Für eine explorative Ultraschalluntersuchung wurden an Tag 14 der Inkubation 17 Eier nach 240 s kumulativer CAP-Behandlung (4x 60 s) und 15 Eier der Kontrollgruppe ausgewählt. Die sonographische Untersuchung erfolgte mit dem Ultraschallgerät LOGIQ E9 unter Verwendung eines 15 MHz linearen Schallkopfs im B-Modus (*Gain*: 35). Hierzu wurde der Hohlraum zwischen der CAM und der Oberkante der Eischalenöffnung mit durchschnittlich 4 ml steriler Natriumchloridlösung 0.9% aufgefüllt. Die Tumore wurden anschließend sonographisch in longitudinaler und transversaler Achse dargestellt und die Aufnahme bei optimaler Einstellung mit dem „Freeze“ Knopf angehalten. In den Aufnahmen erfolgte die Messung des sagittalen, transversalen und koronaren Durchmessers des Tumorgewebes und eine Überprüfung des Gewebes auf Einblutungen. Auf Grund der dreidimensionalen, ellipsoiden Form der Tumoren erfolgte die Berechnung des etwaigen Tumolvolumens aus erhobenen Tumordurchmessern unter Verwendung der Ellipsoid-Formel:

$$V = \frac{4}{3} \times \pi \times \left(\frac{D \text{ sagittal}}{2}\right) \times \left(\frac{D \text{ transversal}}{2}\right) \times \left(\frac{D \text{ koronar}}{2}\right)$$

Zur Darstellung von Blutgefäßen im Tumorgewebe mittels Duplexsonografie wurde bei gleichem Versuchsaufbau der im Ultraschallgerät eingebaute Farbdoppler verwendet. Bei der farbkodierten Dopplersonografie werden sich auf den Schallkopf zubewegende Flüssigkeiten rot, sich vom Schallkopf wegbewegende Flüssigkeiten blau dargestellt. Blutgefäße können hierdurch als pulsierend farbige Strukturen im Gewebe identifiziert werden. Kurze Videosequenzen der Tumore unter Dopplersonografie wurden aufgezeichnet und hinsichtlich der Stärke der Dopplersignale bewertet.

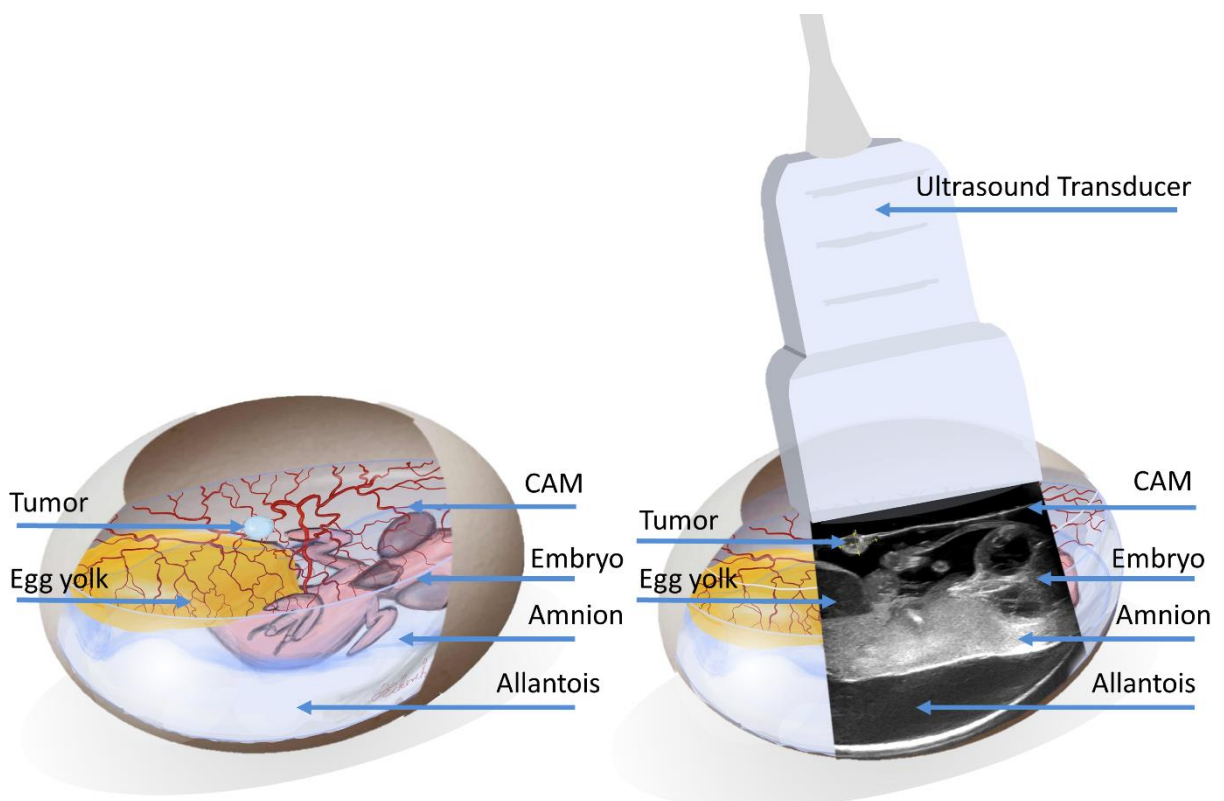


Abbildung 12: Schematische Darstellung der in ovo-Sonographie. Durch die Ultraschalluntersuchung am HET-CAM-Modell lassen sich sowohl anatomische Strukturen des Hühnerembryos als auch Tumore in der CAM in mehreren Ebenen darstellen. Lizenz: Eckrich et al. [112], [CC BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

3.2.9 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Durch die intravitale Fluoreszenzmikroskopie von Tumoren auf der CAM sollte unter Verwendung von TRITC-Dextran mit 70kd die Permeabilität sowie der Blutfluss in den Gefäßen um das Tumorgewebe bewertet werden. Hierzu wurde nach Egawa et al. [153] 30 mg TRITC-Dextran mit einer Feinwaage abgewogen und mit dem Vortex in 3 ml PBS gelöst. An Tag 14 der Inkubation wurden ca. 50 µl der Lösung mit einer 30 G Kanüle in ein Gefäß der gut entwickelten CAM injiziert. Die sofort anschließende Verödung der Einstichstelle mit Silbernitrat-Kaliumnitrat-Ätzstäbchen verhinderte stärkere Blutungen aus dem CAM-Gefäß. Zur Kontrolle einer suffizienten intravasalen TRITC-Injektion erfolgte eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der CAM am *intravital*-Mikroskop unter Verwendung des CY3-Filters (Anregungsfilter 545 nm, Emissionsfilter 605 nm). Hierbei stellten sich Gefäße mit intravasalem TRITC-Dextran deutlich heller fluoreszierend dar als das CAM-Gewebe. Die Eier wurden nun einer Gruppe zugewiesen (CAP n=5, Kontrolle n=4) und auf einer Heizplatte unter dem Mikroskop platziert.

Vor Start des Versuchs erfolgte mithilfe des multi-image Tools der Cell Sense Dimension Software eine Gesamtaufnahme des Tumors mit umliegenden Blutgefäßen in der CAM. Anschließend wurde eine gut vaskularisierte, an das Tumorgewebe angrenzende Region der CAM aufgesucht und eine Aufnahme als Ausgangswert angefertigt. Eier der CAP-Gruppe erhielten nun 60 s CAP-Behandlung wie zuvor beschrieben (Abschnitt 3.2.3), Eier der Kontrollgruppe erhielten keine Behandlung. Anschließend wurden die Eier über eine Stunde unter dem *intravital*-Mikroskop beobachtet. Hierbei wurde mittels der cellSens Dimension Software je eine Bildaufnahme und eine kurze Videosequenz zu folgenden Zeitpunkten akquiriert: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 und 60 Minuten nach CAP/Placebo-Behandlung. Nach Versuchsende erfolgte erneut eine Aufnahme des gesamten Tumors mit umliegenden Blutgefäßen.

Die Bild- und Videosequenzfolgen wurden anschließend im zeitlichen Verlauf verglichen. Zur exemplarischen Ermittlung des segmentalen Blutflusses in jeweils drei tumor-assoziierten Blutgefäßen eines Eis nach CAP-Behandlung und eines Eis nach Placebo-Behandlung wurde die Video Analysesoftware CAP-Image verwendet. Die hiermit ermittelten Flussgeschwindigkeiten und Gefäßdurchmesser erlaubten schließlich die Berechnung des segmentalen Blutflusses mit folgender Formel:

$$\text{segmentaler Blutfluss} \left[\frac{pl}{s} \right] = \left(\frac{\text{Flussgeschw.} \left[\frac{mm}{s} \right]}{1,6} \right) \times \left(\frac{\text{Durchmesser}}{2} \right)^2 \times \pi$$

3.2.10 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse erfolgte mit SPSS® Version 23. Aufgrund des explorativen Ansatzes dieser Arbeit kamen hierbei rein explorativ-deskriptive statistische Methoden zum Einsatz. Alle Datensätze wurden zunächst mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung untersucht. Wie in den jeweiligen Abschnitten gekennzeichnet, wurden bei angenommener Normalverteilung der Daten vergleichende Analysen zwischen zwei Gruppen mittels t-Test durchgeführt. Konnte nicht von einer Normalverteilung der Daten ausgegangen werden, wurden die Gruppen mittel Mann-Whitney-U-Test verglichen. Die Multigruppenanalyse wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test durchgeführt, wenn ebenfalls nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden konnte. In den Ereigniszeitanalysen über das Überleben der tumortragenden Hühnereier und über das Auftreten von Trübungen der CAM wurde zwischen den einzelnen Gruppen mittels Kaplan-Meier-Analysen und Log-Rank-Tests (Mantel-Cox) verglichen. Bei der Analyse der Daten aus den sonographischen Untersuchungen wurden Korrelationen mit dem Eta-Koeffizienten-Test quantifiziert und nach der konventionellen Korrelations-Koeffizienten-Skala interpretiert [154].

4 Ergebnisse

Die Hauptversuche dieser Arbeit wurden in 15 Versuchsdurchgängen jeweils mit Interventions- und Kontrollgruppe bei variierender Expositionszeit gegenüber CAP- oder Placebo-Behandlung wiederholt. Die mit Tumoren besiedelten Eier wurden für 1-4 Tage mit jeweils 60 s CAP oder 60 s Placebo pro Tag behandelt. 24 Stunden nach der letzten Behandlung wurden die Tumore entnommen, fixiert und gefärbt. Die einzelnen Versuchsdurchgänge sind Tabelle 9 zu entnehmen.

Die Signifikanz der Ergebnisse in diesem Abschnitt ist wie folgt gekennzeichnet: n.s. = nicht signifikant ($p > 0.05$); * signifikant ($p \leq 0,05$); ** hoch signifikant ($p \leq 0.01$); *** höchst signifikant ($p \leq 0.001$). Außerdem werden folgende statistischen Parameter abgekürzt: Stichprobengröße (N), Mittelwert (M), Median (Mdn), Standardabweichung (SD), Konfidenzintervall (CI), Interquartilsabstand (IQA).

Tabelle 9: Übersicht aller Versuchsdurchgänge am CAM-Modell

Durchgang, (Gruppe)	Kumulative Expositionszeit (Sekunden), Beobachtungs- zeitraum (Tage)	N Tag 10	N letzter Tag	N gefärbt
1 CAP Kontrolle	240 s, 5 d	23	6	0
		22	16	0
2 CAP Kontrolle	240 s, 5 d	12	4	0
		11	5	0
3 CAP Kontrolle	240 s, 5 d	20	7	7
		18	14	3
4 CAP Kontrolle	240 s, 5 d	20	13	12
		19	13	10
5 CAP Kontrolle	180 s, 4 d	23	12	11
		23	21	11
6 CAP Kontrolle	180 s, 4 d	15	10	10
		14	9	9
7 CAP Kontrolle	120 s, 3 d	36	10	10
		34	29	5

8 CAP Kontrolle	120 s, 3 d	33	16	16
		23	18	5
9 CAP Kontrolle	60 s, 2 d	19	15	7
		9	9	7
10 CAP Kontrolle	240 s, 5 d	24	17	7
		10	10	5
11 CAP Kontrolle	60 s, 2 d	12	8	6
		6	5	5
12 CAP Kontrolle	180 s, 4 d	15	8	6
		6	6	4
13 CAP Kontrolle	120 s, 3 d	23	15	9
		15	15	7
14 CAP Kontrolle	60 s, 2 d	15	12	9
		10	10	7
15 CAP Kontrolle	240 s, 5 d	15	9	9
		6	6	7

4.1 Ereigniszeitanalysen des CAM-Modells

Ab der ersten CAP- oder Placebo-Behandlung der Eier an Tag 10 wurde täglich ein Status auf Überleben oder Ausfall der einzelnen Eier und reaktive Veränderungen in Form von Trübungen in der CAM photographisch dokumentiert. Aus den täglich erhobenen Daten wurden anschließend mit Kaplan-Meier Kurven Ereigniszeitanalysen über das Überleben und Eintrüben erstellt, wobei das Ausfallen eines Eis und die neu aufgetretene Trübung der CAM als Ereignis gewertet wurden. Da sich die Beobachtungszeiträume der Zeitgruppen unterschieden, werden diese im Folgenden einzeln betrachtet. Stichprobengrößen für die Ereigniszeitanalysen sind Tabelle 10 zu entnehmen.

Tabelle 10: Stichprobengrößen der Ereigniszeitanalysen

Expositionszeit	N CAP	N Kontrolle
4x 60 s	101	66
3x 60 s	53	43
2x 60 s	92	72
1x 60 s	46	25

4.1.1 Überleben

In den Überlebenszeitanalysen zeigte sich bei allen Expositionszeiten ein signifikant verringertes Überleben der Eier nach CAP-Behandlung im Vergleich zu einer Placebo-Behandlung (Abbildung 13). Hierbei lag die Sterblichkeitsrate bei der ersten Behandlung mit CAP am höchsten (M = 26,96%) und nahm über die folgenden Behandlungen ab (2. Behandlung M = 19,33%; 3. Behandlung M = 5,25%). Bei einem vierten Behandlungszyklus wurde kein weiteres Versterben der Embryonen detektiert (4. Behandlung M = 0%).

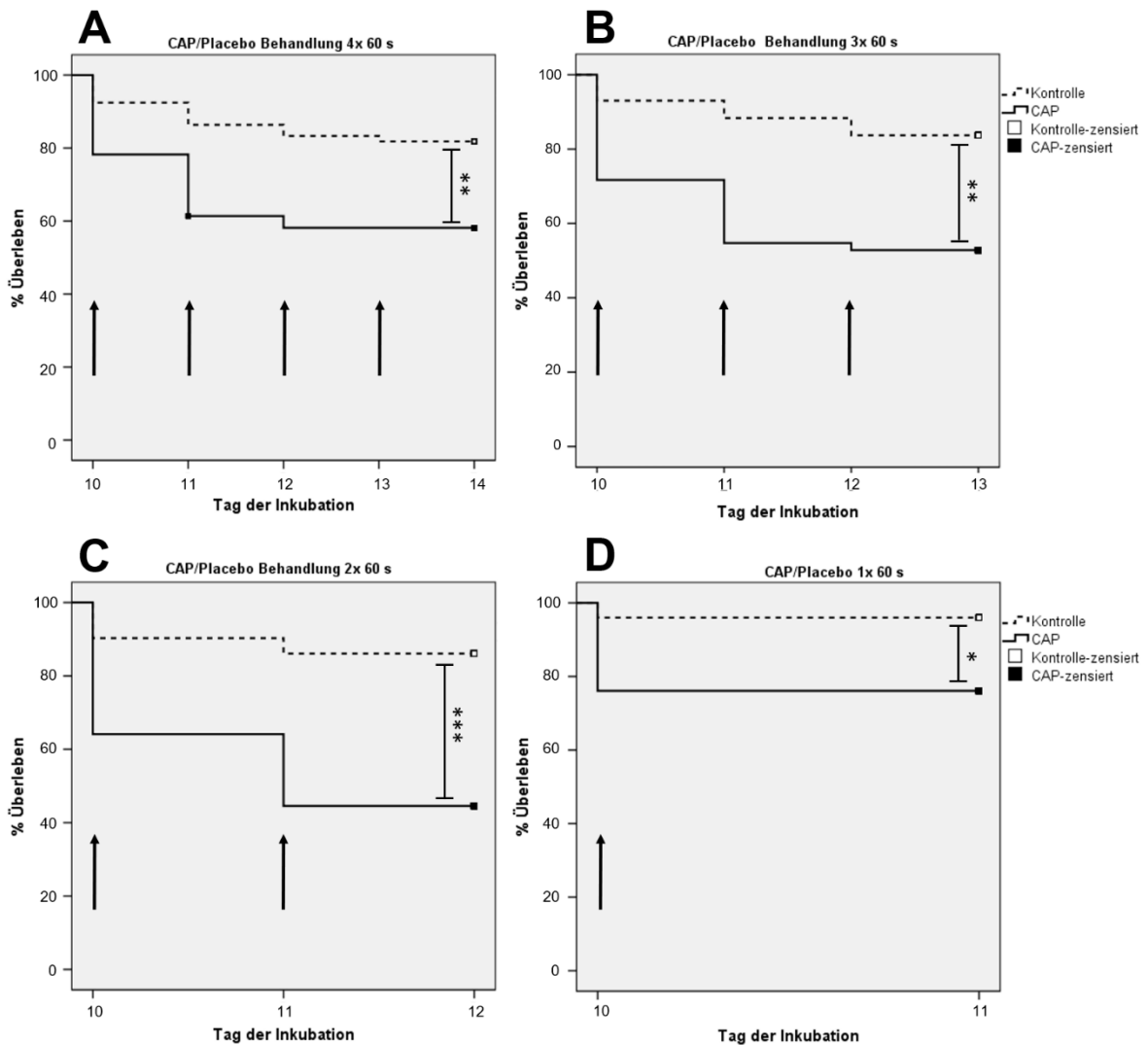


Abbildung 13: Überlebenszeitanalysen mittels Kaplan-Meier Funktionen. Pfeile markieren eine CAP oder Placebo Behandlung für jeweils 60 s. Ein Log-Rank-Test (Mantel Cox) bestätigt in den Gruppen nach (A) 4x 60 s und (B) 3x 60 s kumulativer Exposition einen hoch signifikanten Unterschied (A: $p = 0,001$, B: $p = 0,001$) der Überlebensfunktionen. Die Gruppe nach 2x 60s s Exposition (C) gegenüber CAP oder Placebo unterscheidet sich höchst signifikant ($p < 0,001$) im Überleben, die Gruppe nach einmaliger 60 s Exposition (D) zeigt einen signifikanten Unterschied ($p = 0,034$).

4.1.2 Eintrübung der CAM

Das gehäufte Auftreten von Trübungen und Kontraktionen im CAM-Gewebe nach Behandlungen mit CAP war bereits während der Versuchsdurchführung deutlich erkennbar. Die CAMs der überlebenden Eier zeigten sich im Bereich der CAP-Exposition stark aufgeraut, trüb und verdickt im Vergleich zu unveränderte CAMs (Abbildung 14). Leichte Eintrübungen der CAM waren ebenfalls in Teilen der

Kontrollgruppe beobachtbar, diese erreichten jedoch nicht das Ausmaß der Gewebeveränderungen der mit CAP behandelten Eiern.

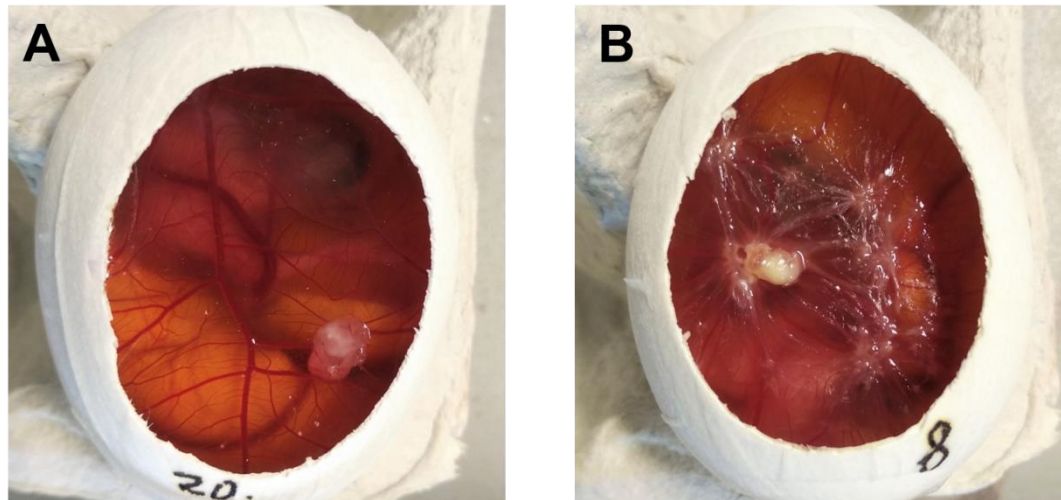


Abbildung 14: CAM-Status an Tag 14 der Inkubation. (A) Ei der Placebo-Gruppe mit klarer CAM und sichtbar gut durchblutetem Tumor. (B) Ei der CAP-Gruppe mit stark eingetrübter CAM im Bereich der CAP-Exposition. Der Tumor ist auf Grund des CAM-Status nur schwer bewertbar.

Die Ereigniszeitanalysen über das Auftreten von Trübungen der CAM bestätigten in den Gruppen aller Expositionszeiten einen höchst signifikanten Unterschied zwischen CAP- und Placebobehandlung (Abbildung 15). Nach einer einmaligen CAP-Behandlung für 60 s konnte bereits in durchschnittlich 67,5% der Eier eine Trübung der CAM beobachtet werden. Nach einer zweiten CAP-Behandlung war die CAM in allen überlebenden (nicht zensierten) Eiern eingetrübt. In der Kontrollgruppe zeigte sich ein stetiger Anstieg der Eier mit Trübungen in der CAM um durchschnittlich zusätzliche 10% pro Tag.

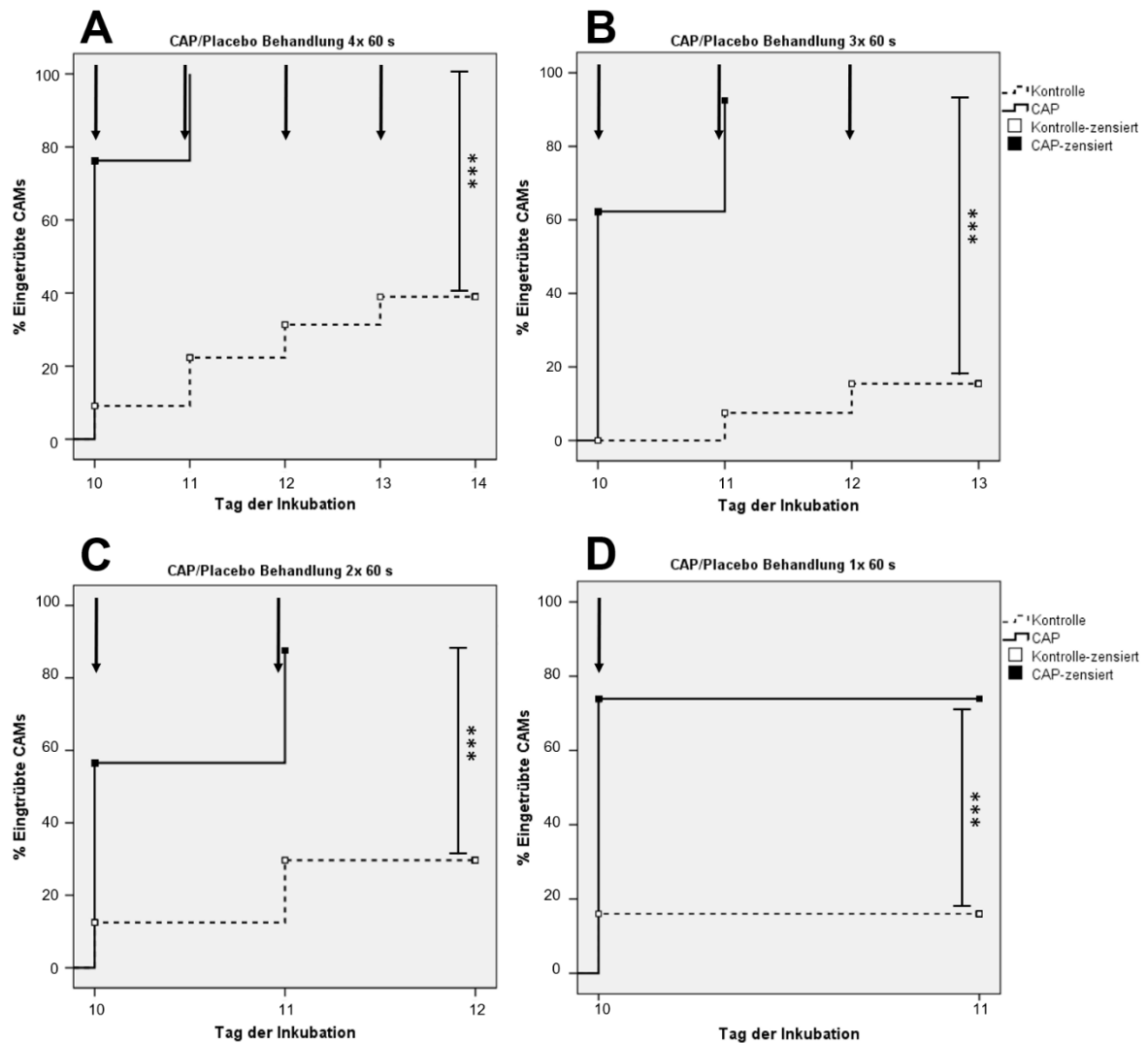


Abbildung 15: Ereigniszeitanalysen der CAM-Trübung mittels Kaplan-Meier Funktionen. Pfeile markieren eine 60 s CAP oder Placebo Behandlung. In den Gruppen aller Expositionszeiten unterscheidet sich das Auftreten der CAM-Trübungen höchst signifikant ($p < 0.001$) im Log-Rank-Test (Mantel Cox).

4.2 Immunhistochemie

4.2.1 Apoptotische Zellen im gesamten Tumoranschnitt

Die ermittelten apoptotischen Zellen pro ROI wurden zunächst für alle ROI einer Zeitgruppe (unabhängig der Position) zwischen CAP- und Kontrollgruppe verglichen. Die Stichprobengrößen der ausgezählten ROI sind Tabelle 11 zu entnehmen. Bei nicht normalverteilten Daten (Shapiro-Wilk $p < 0,05$ in allen Subgruppen) wurden CAP- und Kontrollgruppe mit einem Mann-Whitney-U-Test verglichen. Dies erfolgte für jede Expositionszeit getrennt. Hierbei zeigten Tumore nach 4x 60 s CAP-Exposition eine

hoch signifikant größere apoptotische Zellzahl pro ROI im Vergleich zur Placebobehandlung ($p = 0,005$). Auch Tumore nach 2x 60 s Behandlung unterschieden sich höchst signifikant, wobei mehr Apoptosen pro ROI in der Kontrollgruppe auftraten ($p < 0,001$).

Tabelle 11: Deskriptive Statistik der Apoptosen pro ROI

Expositionszeit	Typ	N (ROI)	M	SD	Mdn	p (MWU-Test)
4x 60 s	CAP	257	4,58	8,25	1	0,005
	Kontrolle	245	2,99	6,40	1	
3x 60 s	CAP	325	2,26	4,47	0	0,388
	Kontrolle	250	2,26	4,75	1	
2x 60 s	CAP	421	4,75	8,56	2	<0,001
	Kontrolle	273	6,40	8,85	3	
1x 60 s	CAP	276	3,59	5,48	2	0,107
	Kontrolle	198	3,78	4,77	2	

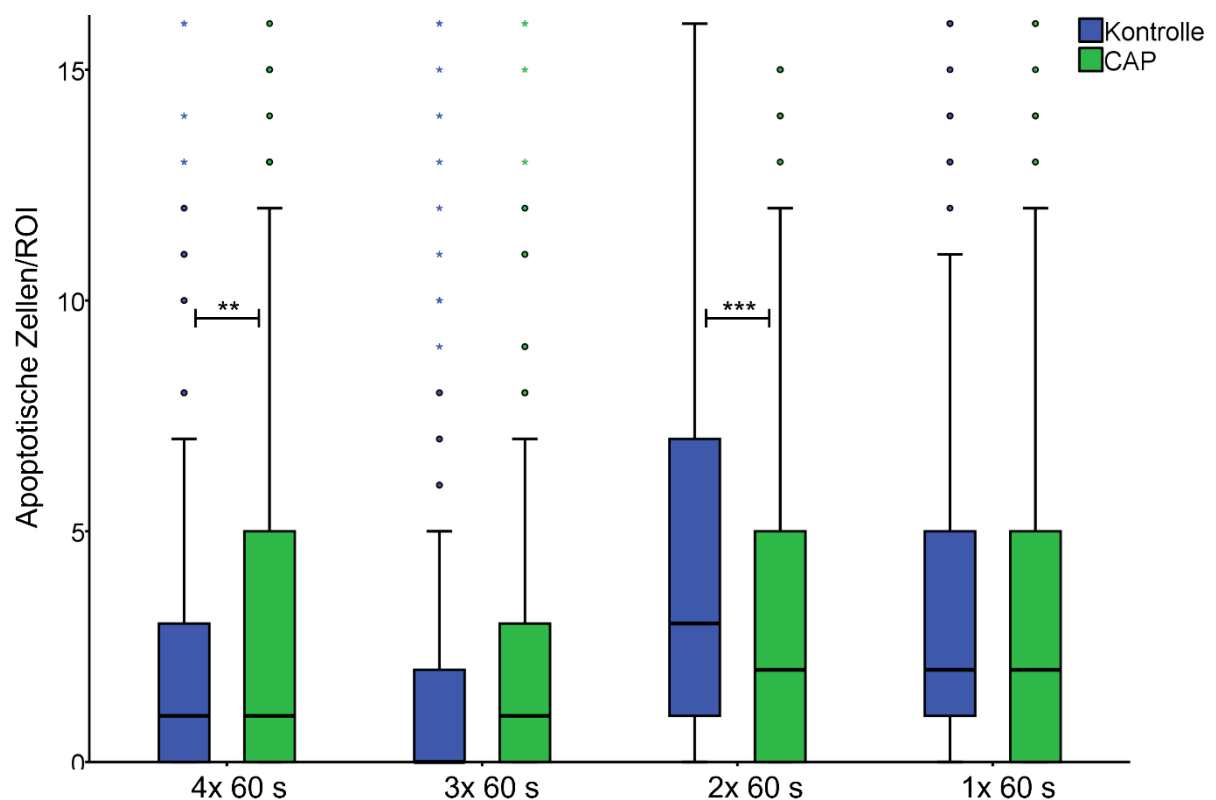


Abbildung 16: Boxplot apoptotischer Zellen pro ROI über alle Behandlungszeiten. Box: Mdn (Mittellinie), 1. Quartil (unterer Rand), 3. Quartil (oberer Rand); Antenne / Whisker: Werte bis 1. / 3. Quartil - / + 1,5 * IQA. Signifikant unterscheiden sich die Anzahl apoptotischer Zellen pro ROI

zwischen CAP- und Kontrollgruppe in Tumoren nach 2x 60 s ($p < 0,001$) und 4x 60 s ($p = 0,005$) Behandlung.

4.2.2 Apoptotische Zellen nach Gewebetiefe

Um das Auftreten apoptotischer Zellen in unterschiedlich tiefen Gewebebereichen zu analysieren, wurden die Apoptosen pro ROI für jede ROI-Position einzeln betrachtet. Die Stichprobengrößen für die unterschiedlichen Tiefen sind Tabelle 12 zu entnehmen. Diese nehmen mit zunehmender Tiefe der betrachteten Region im Tumorgewebe ab, da nicht alle Tumore im Schnittbild eine Dicke von 800 μm erreichten.

Tabelle 12: Stichprobengrößen (N ROI) je Behandlungsgruppe und Tiefe

ROI-Position	4x 60 s		3x 60 s		2x 60 s		1x 60 s	
	N CAP	N Kontr.	N CAP	N Kontr.	N CAP	N Kontr.	N CAP	N Kontr.
0-100 μm	44	51	57	51	78	54	48	33
100-200 μm	43	50	56	50	76	53	48	33
200-300 μm	42	46	54	45	69	48	45	33
300-400 μm	34	38	50	40	61	40	41	31
400-500 μm	30	27	40	32	48	35	35	29
500-600 μm	27	14	33	18	36	20	28	22
600-700 μm	20	11	21	9	30	14	22	10
700-800 μm	17	8	14	5	23	9	9	7

Für jede Behandlungszeitgruppe und ROI-Position getrennt wurden im Anschluss bei nicht normalverteilten Daten (Shapiro-Wilk $p < 0,05$ in allen Subgruppen) Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. Hierbei zeigten sich signifikant höhere Apoptosen/ROI in Tumoren nach 4x 60 s CAP-Behandlung im Vergleich zu Placebo-Behandlung in Gewebetiefen von 0-100 μm ($p = 0,012$), 100-200 μm ($p = 0,048$) und 300-400 μm ($p = 0,027$). In Tumoren nach 2x 60 s Behandlung waren in der Kontrollgruppe signifikant höhere Apoptosen in Gewebetiefen von 100-200 μm ($p = 0,038$) und 200-300 μm ($p = 0,039$) nachweisbar. Alle anderen Gewebetiefen unterschieden sich nicht signifikant (Abbildung 17).

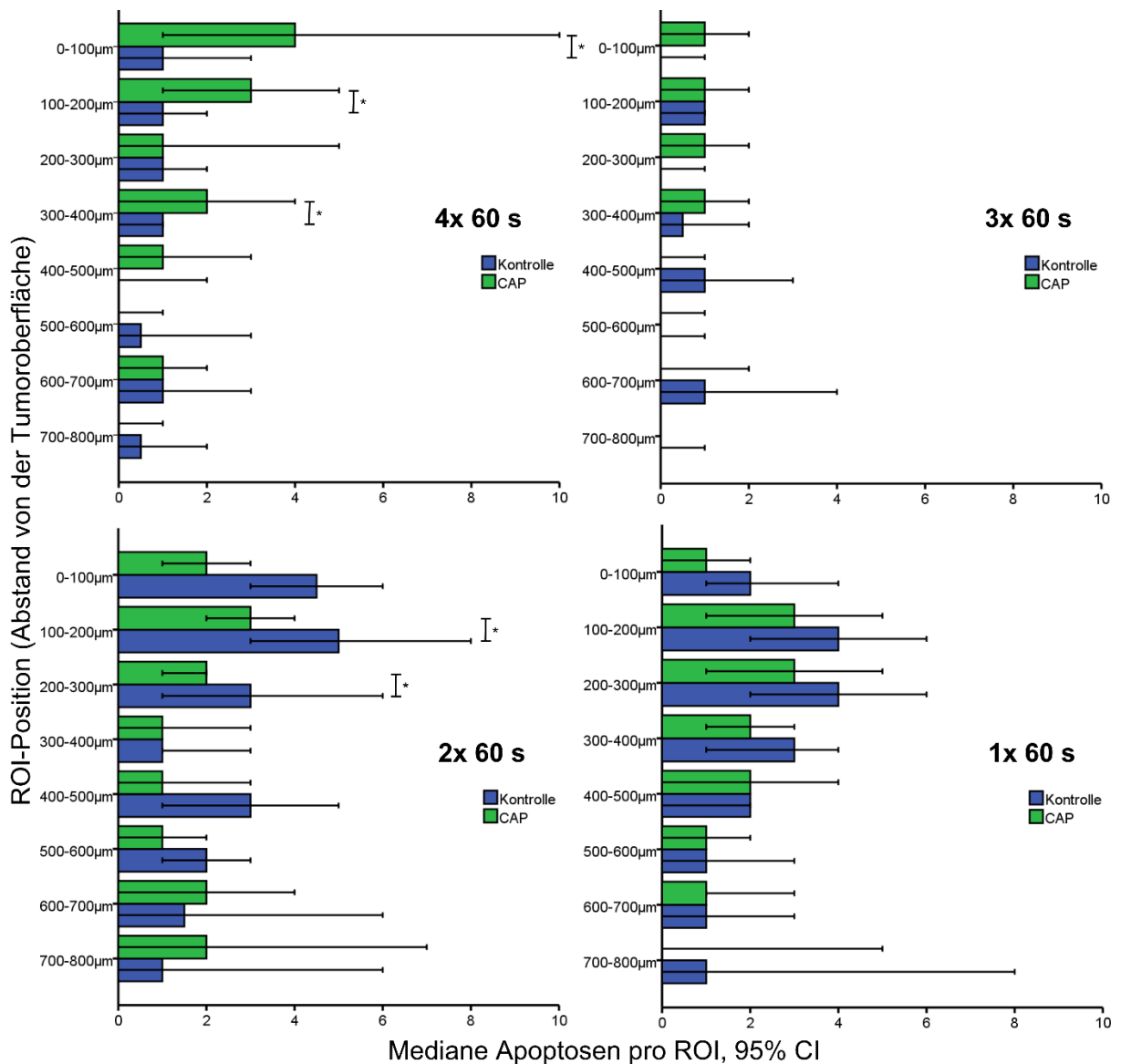


Abbildung 17: Apoptotische Zellen nach Gewebetiefe und Behandlungszeit. Signifikante Unterschiede sind ausschließlich in den Gruppen nach 4x 60 s und 2x 60 s CAP- oder Placebobehandlung zu sehen.

Des Weiteren wurde das Auftreten von apoptotischen Zellen über die Tiefe der Gewebeschichten mittels Kruskal-Wallis Test in Tumoren nach CAP- oder Placebo-Behandlung in jeder Behandlungszeitgruppe einzeln untersucht. Dieser zeigte in Tumoren der CAP-Gruppe eine signifikant unterschiedliche Verteilung der apoptotischen Zellen über die Gewebetiefe nach 4x 60 s ($p < 0,001$) und 3x 60 s Behandlung ($p = 0,009$). In der Kontrollgruppe unterschied sich die Verteilung der apoptotischen Zellen über die Gewebetiefe nach 1x 60 s Placebo-Behandlung ($p < 0,001$). Diese Unterschiede ließen sich in Dunn-Bonferroni Post-Hoc-Tests mit Bonferroni Korrektur des Signifikanzniveaus auf höhere Apoptosezahlen in oberflächlicheren Gewebeschichten im Vergleich zu tiefen Gewebeschichten

zurückführen: **4x 60 s CAP:** 0-100 μm *500-600 μm $p = 0,001$, 0-100 μm *700-800 μm $p = 0,004$, 100-200 μm *500-600 μm $p = 0,009$, 100-200 μm *700-800 μm $p = 0,021$.
3x 60 s CAP: Keine signifikanten Unterschiede zwischen einzelnen Gewebetiefen.
1x 60 s Kontrolle: 100-200 μm *400-500 μm $p = 0,004$, 0-100 μm *500-600 μm $p = 0,005$, 100-200 μm *600-700 μm $p = 0,020$, 200-300 μm *400-500 μm $p = 0,034$, 200-300 μm *500-600 μm $p = 0,036$.

4.2.3 Apoptotische Zellen nach Behandlungszeit

Zur genaueren Analyse eines potentiellen Einflusses der Behandlungszeit im Sinne einer Dosis wurde die Apoptoserate in Abhängigkeit der Behandlungszeit genauer untersucht. Da die Haupteffekte einer CAP-Behandlung in den vorausgegangenen Versuchen in den oberen 400 μm der Tumorschnitte detektierbar waren, wurden im Folgenden nur diese oberflächlichen Bereiche betrachtet. Durch die unterschiedlich lange Zeit der Tumore im CAM-Modell und somit einer unterschiedlich langen Zeit unter Risiko für das Auftreten von Apoptosen war ein direkter Vergleich der Zeitgruppen jedoch nicht möglich. Stattdessen wurde in jeder Behandlungszeitgruppe mit gleicher Zeit unter Risiko jeweils der Median aus CAP- und Kontrollgruppe ermittelt und eine Differenz dieser gebildet (Median CAP - Median Kontrolle). Diese Differenz des Medians als Maß für CAP-induzierte Veränderungen der Apoptosenzahl ist in Abbildung 18 dargestellt.

Hierbei ist eine deutliche Tendenz zu positiven Mediandifferenzen bei steigender Dosis zu erkennen. Dies könnte auf eine höhere Apoptoserate nach CAP-Behandlung im Vergleich zur Placebo-Behandlung bei steigender Dosis hinweisen. Zudem unterschieden sich die Mediane zwischen CAP- und Kontrollgruppe nach höchster Behandlungszeit von 4x 60 s wie zuvor beschrieben signifikant in 3 der 4 dargestellten Gewebetiefen. Interessanterweise zeigten sich bei kürzeren Behandlungszeiten (2x 60 s und 1x 60 s) durchweg negative Mediandifferenzen als Zeichen niedrigerer Apoptosen nach CAP-Behandlung im Vergleich zur Placebo-Behandlung. Nach 2x 60 s Behandlungszeit zeigte sich diese Mediandifferenz zudem in Gewebetiefen zwischen 100 und 300 μm von der Tumoroberfläche signifikant im Mann-Whitney U-Test.

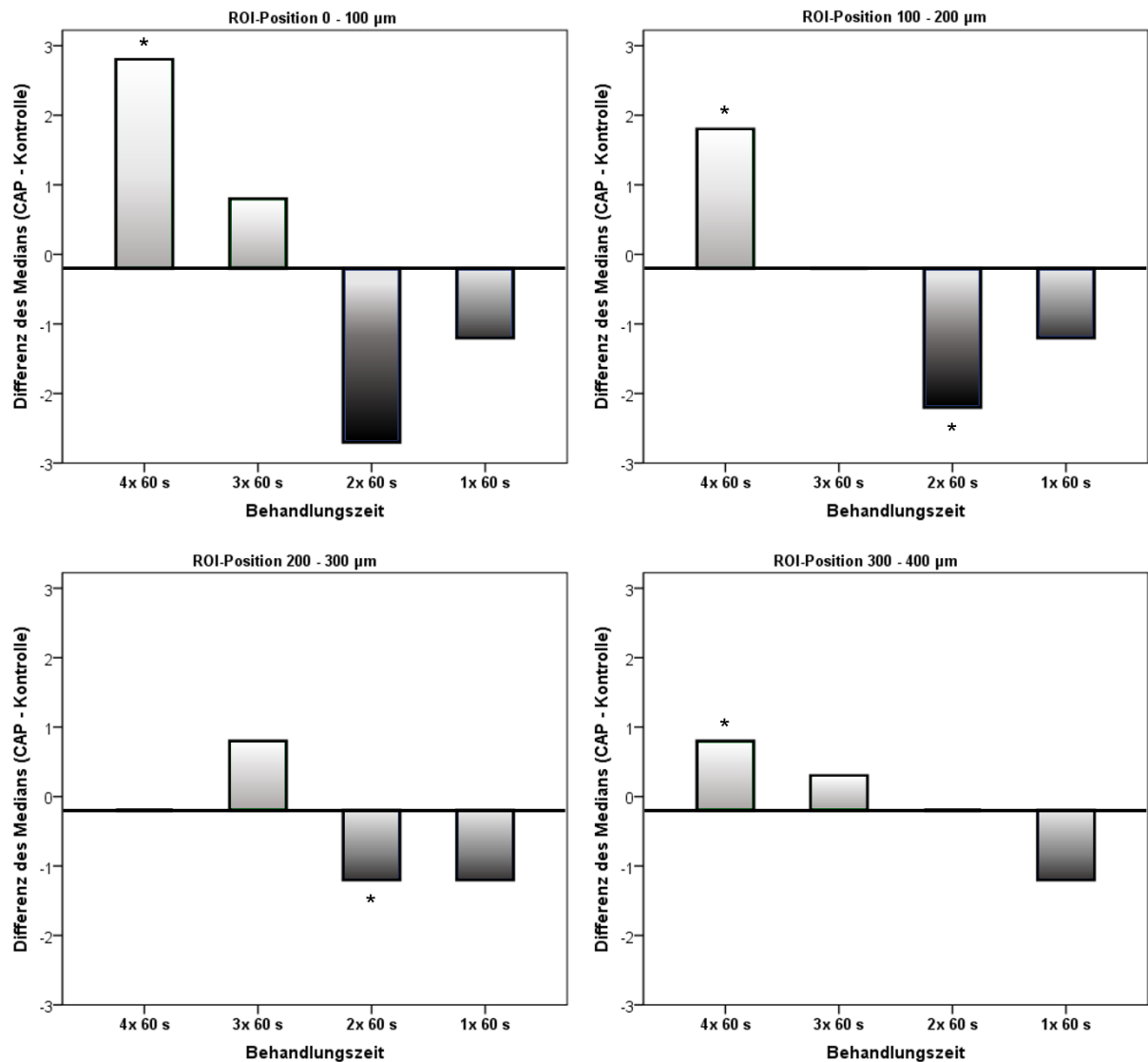


Abbildung 18: Einfluss der Behandlungszeit auf mediane Apoptosenzahl. Dargestellt ist die Differenz des Medians zwischen CAP- und Kontrollgruppe abhängig von Behandlungszeit und Gewebetiefe. Negative Werte sind dunkel, positive Werte heller dargestellt. Ein deutlicher Trend zu positiven Mediandifferenzen bei steigender Behandlungszeit ist zu erkennen. Bei kürzeren Behandlungszeiten sind fast durchgehende negative Werte zu sehen, was auf ein geringeres Auftreten von Apoptosen nach CAP-Exposition im Vergleich zu einer Placebobehandlung hindeutet.

4.2.4 Vaskularisierung des Tumorgewebes

Die gegen α -SMA gefärbten Schnitte wurden zur Evaluation der Blutgefäße zunächst anhand der Blutgefäßverteilung in und um das Tumorgewebe bewertet (keine Blutgefäße, periphere Blutgefäße, zentrale Blutgefäße). Hierbei zeigte keine eindeutige Tendenz in der Häufigkeitsanalyse (Abbildung 19). Auch im Vergleich

zwischen Kontroll- und CAP-Gruppe sowie bei steigender Exposition zeigte sich kein deutlicher Trend einer veränderten Blutgefäßverteilung.

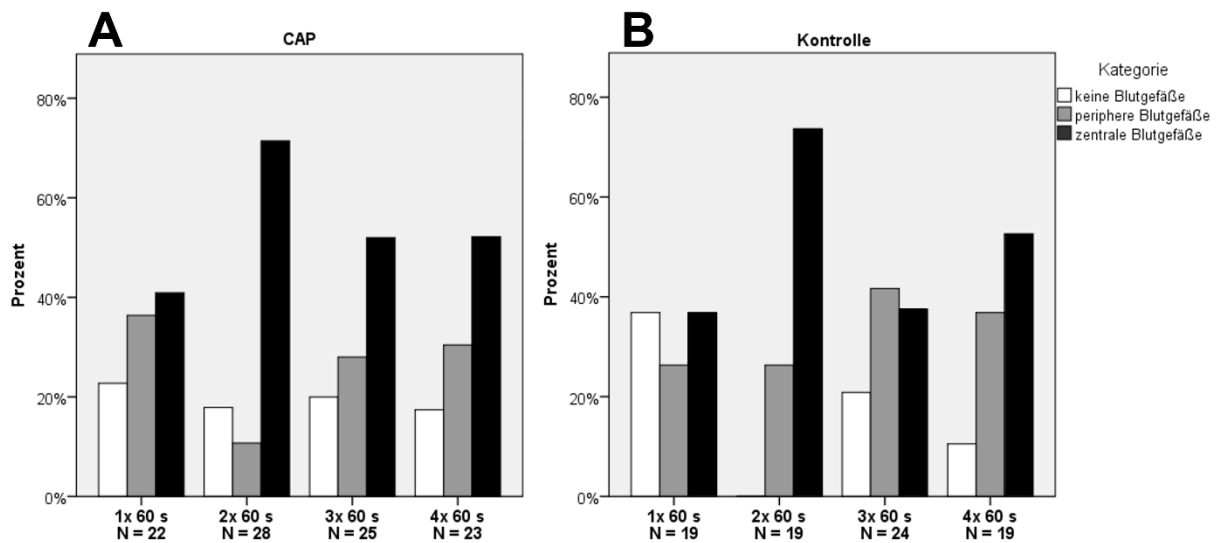


Abbildung 19: Häufigkeitsanalyse der Tumolvaskularisierung nach Kategorien in (A) Tumore nach CAP-Behandlung (B) Tumore nach Placebo-Behandlung. Keine eindeutigen Tendenzen einer veränderten Blutgefäßverteilung sind erkennbar.

Aufgrund der signifikanten Unterschiede der Apoptosen in Tumoren nach 4x 60 s CAP- oder Placebo-Behandlung wurde in dieser Gruppe anschließend eine exemplarische Auszählung der angefärbten Blutgefäße im Tumorgewebe durchgeführt (Abbildung 20). Hierbei zeigten Tumore nach 4x 60 s CAP-Behandlung eine signifikant geringere Blutgefäßdichte im Tumorgewebe ($p = 0.037$) im Vergleich zu Tumoren nach vierfacher Placebobehandlung (CAP: $N = 14$, $M = 103,76 /\text{mm}^2 \pm 27,27$ (SD); Kontrolle: $N = 11$, $M = 135,93 /\text{mm}^2 \pm 44,42$ (SD)). Normalverteilung und Varianzgleichheit wurde angenommen (Shapiro-Wilk $p = 0,275$ (CAP), $p = 0,332$ (Kontrolle); Levene Test $p = 0,273$)

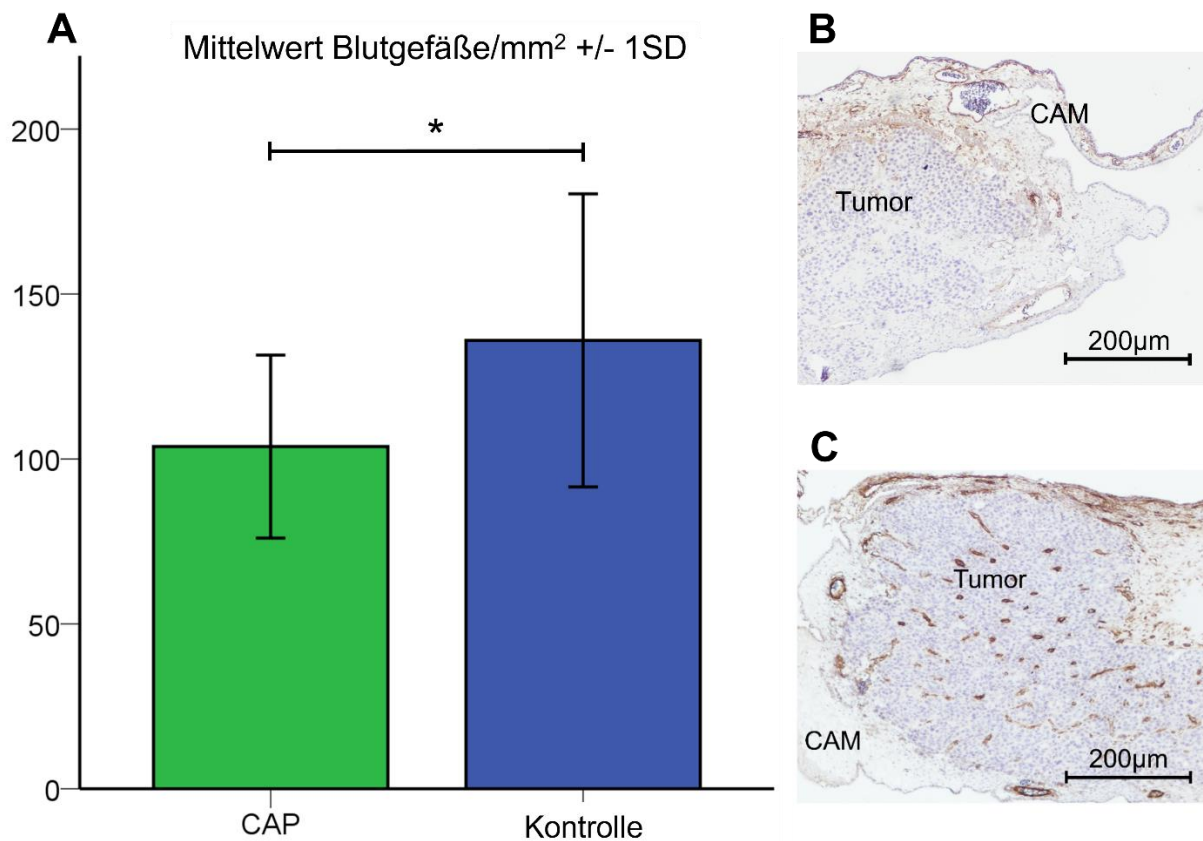


Abbildung 20: Blutgefäßdichte im Tumorgewebe nach 4x 60 s CAP- oder Placebobehandlung. (A) Die mittlere Blutgefäßdichte ist signifikant niedriger in Tumoren nach CAP-Behandlung im Vergleich zu Tumoren nach Placebobehandlung ($p = 0.037$). (B) A-SMA gefärbter Tumorschnitt mit gering vaskularisiertem Tumor. (C) A-SMA gefärbter Tumorschnitt mit stark vaskularisiertem Tumor. Blutgefäße sind durch die immunhistochemische Markierung braun angefärbt. Tumor (bläulich) und umliegendes Bindegewebe der CAM (weiß, hell) sind deutlich unterscheidbar, was eine Flächenmessung des Tumorgewebes im Schnitt ermöglichte. Lizenz: Verändert nach Kugler et al. [155], CC BY 4.0

4.3 Quantifizierung der VEGF-Expression

Zur Quantifizierung der Expression des VEGF-A-Gens mittel qPCR wurden native CAMs ohne Tumor nach 4x 60 s CAP- oder Placebo-Behandlung untersucht (Abbildung 21). Die mittlere relative VEGF-A-Genexpression im CAM-Gewebe lag hierbei in Eiern nach CAP-Behandlung niedriger ($M = 163.03\%$; $N = 3$) als bei Eiern nach Placebo-Behandlung ($M = 263,93\%$; $N = 6$). Dieser Unterschied zeigte sich jedoch im t-Test nicht signifikant ($p = 0.265$), bei angenommener Normalverteilung (Shapiro-Wilk $p = 0,203$ (CAP), $p = 0,467$ (Kontrolle)) und Varianzgleichheit (Levene Test $p = 0,083$) der Daten.

Auffällig war zudem, dass sich bei mit CAP-behandelten Eiern nur aus 3 von 8 CAMs genügend RNA für eine qPCR isolieren ließ und sich das entnommene CAM-Gewebe deutlich verdickt darstellte. In Placebo-behandelten Eiern war dies nicht der Fall, eine ausreichende RNA-Isolation gelang hier in 6 von 8 Proben.

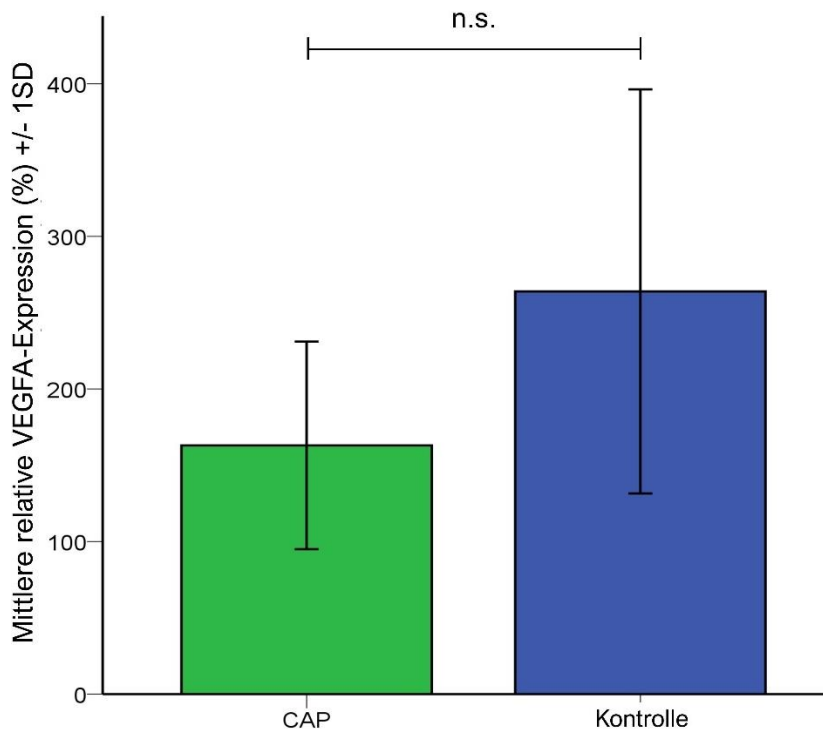


Abbildung 21: Mittlere relative VEGF-A-Genexpression im Vergleich zur internen Kalibrator-Probe. Die niedrigere relative Expression in der CAP-Gruppe unterscheidet sich nicht signifikant ($p = 0.265$) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Lizenz: Verändert nach Kugler et al. [155], [CC BY 4.0](#)

4.4 Sonographische Untersuchung der Tumore

Das Volumen von Tumoren nach einer 4x 60 s CAP-Behandlung zeigte sich in den sonographischen Bestimmungen deutlich höher bei durchschnittlich 76,78 mm³ (N = 17; SD = 33,55) als bei Tumoren nach Placebo-Behandlung mit durchschnittlich 38,03 mm³ (N = 15; SD = 24,25). Da nicht von einer Normalverteilung der Daten ausgegangen werden konnte (Shapiro-Wilk: $p = 0.037$ (Kontrolle), $p = 0.020$ (CAP)) erfolgte der Vergleich der Gruppen mittels Mann-Whitney U Test. Dieser zeigte einen hoch signifikanten Unterschied ($p = 0.001$) der Tumorumfänge zwischen CAP- und Kontrollgruppe (Abbildung 22 A).

Einblutungen im Tumorgewebe waren in 82,4% (14/17) der mit CAP behandelten Proben erkennbar, während nur 20% (3/15) der Kontrollproben diese aufwiesen. Auch eine unabhängig von der Art der Behandlung signifikante Korrelation zwischen einem großem Tumolvolumen und intratumoraler Einblutung im Eta-Koeffizienten-Test ($\eta = 0.503$, $p = 0.03$) deutete auf einen Blutungs-assoziierten Volumenanstieg der Tumore hin.

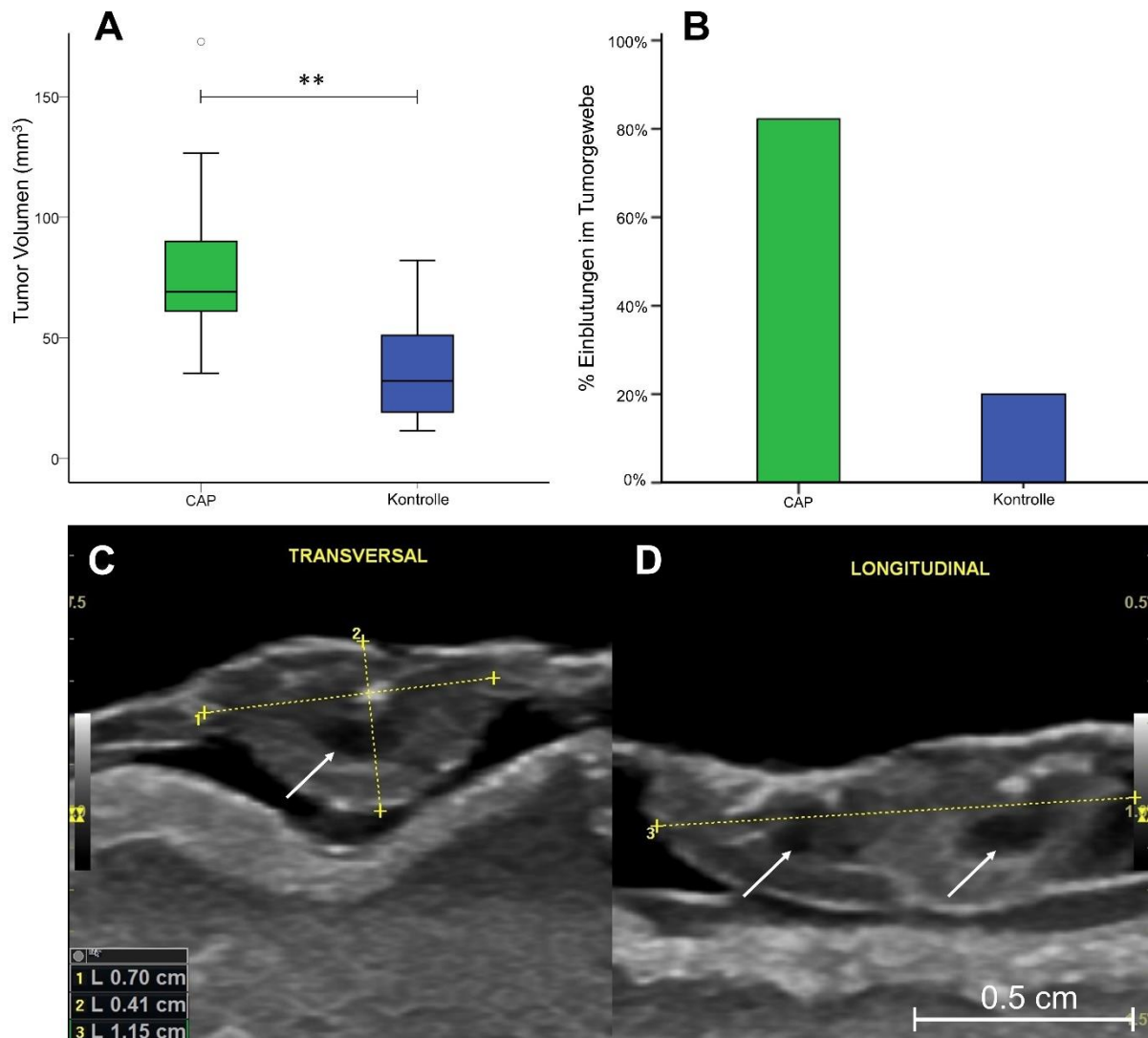


Abbildung 22: Sonographische Untersuchung der Tumore. (A) Boxplot über Tumolvolumina der CAP- und Kontrollgruppe, diese unterscheiden sich hoch signifikant ($p = 0,001$). (B) Die Volumenunterschiede könnten durch das ungleich verteilte Auftreten von Einblutungen im Tumorgewebe entstehen. (C) Sonographische Aufnahme eines Tumors in der CAP in transversaler Achse (D) und longitudinaler Achse. Einblutungen im Tumorgewebe sind mit Pfeilen markiert. Lizenz: Verändert nach Kugler et al. [155], CC BY 4.0

4.5 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Tumore unter Verwendung von 70 kDa TRITC-Dextran zeigten nach einminütiger CAP-Exposition eine starke Extravasation von TRITC-Dextran sowie gehäuft auftretende Thromben und Gefäßverschlüsse der tumor-assoziierten Blutgefäße im CAM-Gewebe (Abbildung 23 D). Das Austreten von TRITC-Dextran in die paravasalen Bereiche des CAM-Gewebes war ab 5 Minuten nach einer CAP-Behandlung sichtbar, die Fluoreszenzintensität in diesen Bereichen nahm über die Zeit weiter zu. Tumore nach Placebo-Behandlung wiesen keine vergleichbaren Effekte auf. Ein starker Anstieg der Fluoreszenzintensität im Tumorgewebe selbst konnte unabhängig der Behandlungsgruppe beobachtet werden.

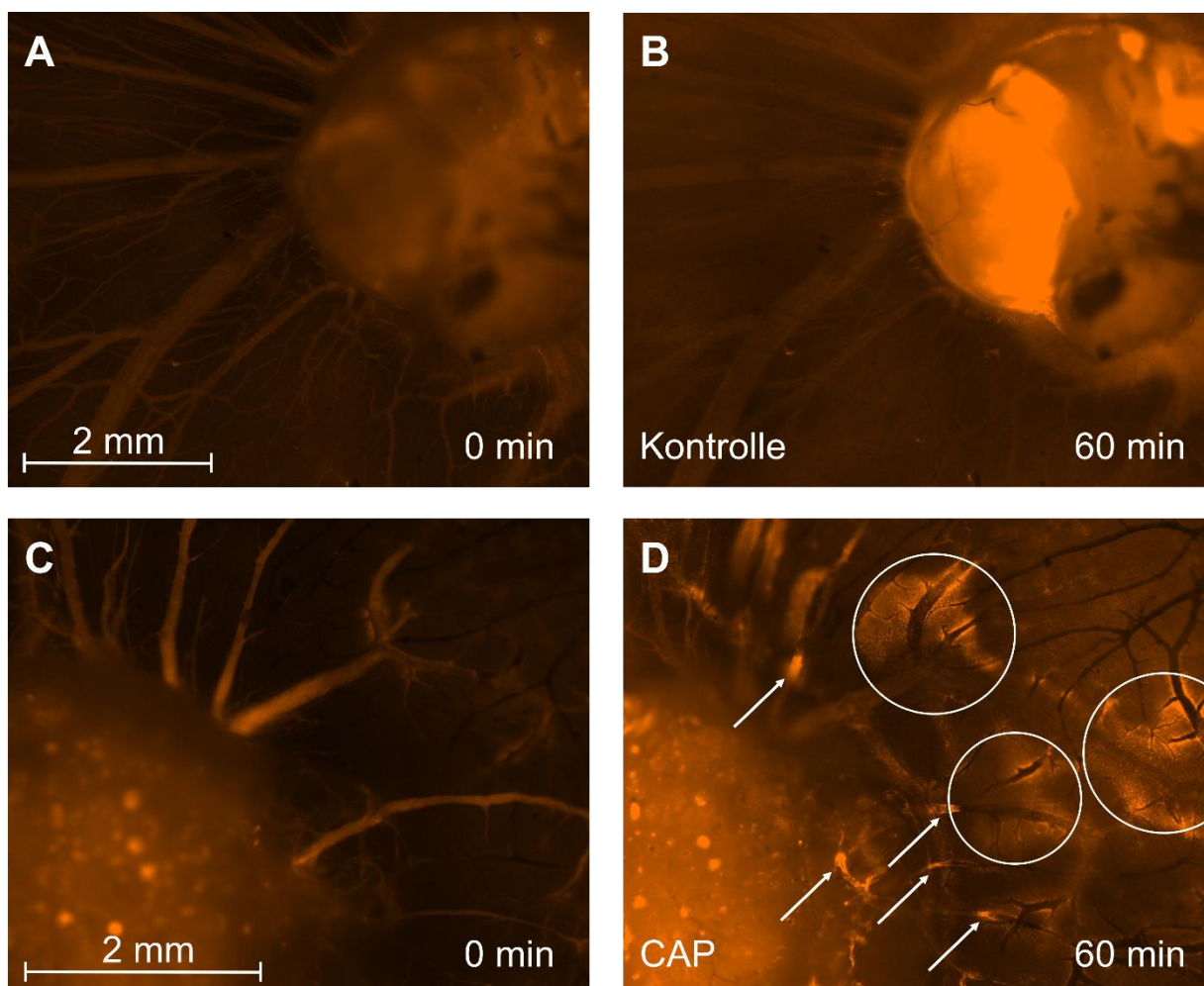


Abbildung 23: Tumore mit assoziierten Blutgefäßen in der CAM, fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. (A) Tumor vor und (B) 60 Minuten nach einer 60 s Placebo-Behandlung. Eine insgesamt steigende Fluoreszenzintensität ist erkennbar, welche jedoch hauptsächlich auf das Tumorgewebe

selbst fokussiert ist. Tumor-assoziierte Blutgefäße erscheinen intakt, Thrombosen oder Obliterationen von Blutgefäßen sind nicht erkennbar. (C) Tumor vor und (D) 60 Minuten nach einer 60 s CAP-Behandlung. Neben einer stärkeren Fluoreszenzintensität des Tumorgewebes zeigen auch die tumor-assoziierten Blutgefäße eine starke Extravasation von TRITC-Dextran in das CAM-Gewebe (weiße Kreise). Thrombosen und Gefäßobliteration sind in mehreren Gefäßen erkennbar (weiße Pfeile). Lizenz: Verändert nach Kugler et al. [155], [CC BY 4.0](#)

Die exemplarische Analyse des segmentalen Blutflusses in den Fluoreszenz-Videoaufnahmen zeigte in einigen Gefäßen einen starken Abfall des Blutflusses direkt nach der CAP-Exposition (Abbildung 24). Aus den drei untersuchten Gefäßen kehrte ein Blutgefäß nach initialem Abfall wieder zu einem normalen Blutfluss zurück. Der Blutfluss der zwei weiteren Gefäße kam innerhalb der einstündigen Beobachtungszeit komplett zum Erliegen. Ein Gefäß zeigte zudem eine Umkehr der Blutflussrichtung, bevor das Gefäß okkludierte.

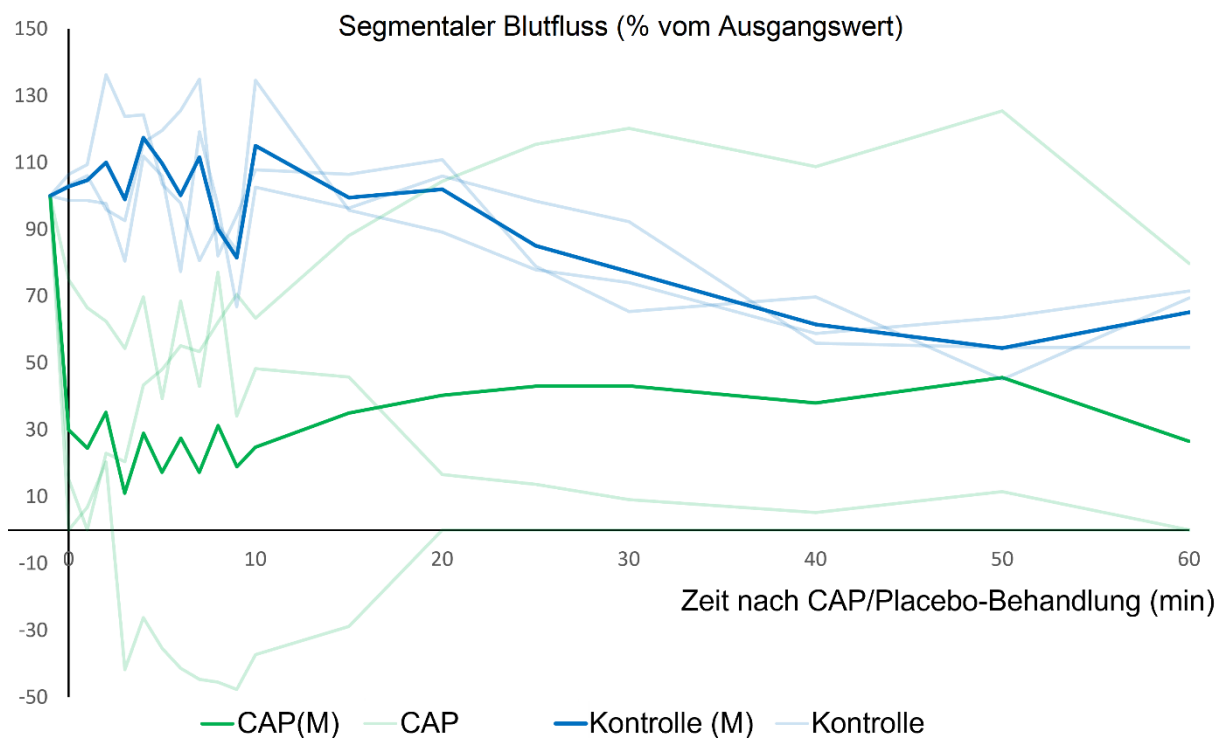


Abbildung 24: Veränderung des segmentalen Blutflusses nach 60 s CAP (grün) oder Placebo-Exposition (blau), Mittelwerte sind kräftig, Einzelwerte schwach dargestellt. Ein deutlicher Abfall im segmentalen Blutfluss nach CAP-Exposition ist zu sehen, mit einem initial vollständigen Sistieren des Blutflusses in zwei von drei Gefäßen. In zwei von drei Gefäßen kam der Blutfluss während des Beobachtungszeitraums zudem vollständig zum Erliegen, ein Blutgefäß kehrte nach initialem Sistieren zu einem normalen Blutfluss zurück. Lizenz: Verändert nach Kugler et al. [155], [CC BY 4.0](#)

5 Diskussion

5.1 Verträglichkeit der CAP-Behandlung

Die Behandlung solider Tumore mit CAP als vielversprechende neue Behandlungsmethode erlangte in den letzten Jahren zunehmende Aufmerksamkeit [1]. Die beobachtete Selektivität der CAP-Effekte gegenüber Tumorzellen unter Schonung des umliegenden Gewebes [3, 22, 50, 52], sowie die gute Verträglichkeit von CAP im klinischen Einsatz ohne Hinweise auf Genotoxizität führten bereits zur Zulassung eines CAP-Geräts als zertifiziertes Medizinprodukt in Deutschland [135, 142].

Die Versuche dieser Arbeit zeigten jedoch deutlich negative Effekte von CAP-Behandlungen auf das Überleben der Hühnerembryonen sowie deutliche Irritationen des behandelten, gesunden CAM-Gewebes (Abbildung 13, Abbildung 14, Abbildung 15). Eine 60 s CAP-Behandlung senkte das Überleben der Embryonen um 26%. Dieser Wert nahm bei wiederholten CAP-Expositionen im zeitlichen Verlauf ab, eine vierte, 60 s CAP-Behandlung zeigte keine zusätzliche Reduktion des Überlebens. Ähnliche Effekte auf die Lebensfähigkeit von Hühnerembryonen nach einer CAP-Behandlung wurde zuvor von einer Arbeitsgruppe berichtet [136]. Hierbei wurde das Überleben der Hühnerembryonen durch 5 Minuten CAP-Behandlung mit einem Gerät der Argon-Plasmajet-Technik um ca. 20% vermindert beschrieben. Obwohl die unterschiedlichen Gerätetypen einen direkten Vergleich nicht zulassen, ist ein insgesamt negativer Einfluss von hohen Plasmadosen auf das Überleben der Hühnerembryonen erkennbar. Die reduzierte Lebensfähigkeit nach einer CAP-Behandlung könnte durch einen hohen Anfall an RONS durch die CAP-Exposition begründet sein. Obwohl Antioxidantien für den Abbau von RONS zu unschädlichen Sauer- und Stickstoffverbindungen im Hühnerembryo vorhanden sind [156], könnte der durch hohe Plasmadosen ausgelöste oxidative Stress die antioxidative Kapazität des Embryos überschreiten, den Organismus schädigen und zum Absterben des Embryos führen.

Auch die beobachtete Irritation des gesunden CAM-Gewebes durch CAP ist bereits beschrieben worden, wenn auch in deutlich geringerem Ausmaß [136, 137]. Die Eintrübung und Verdickung der CAM könnte hierbei die Diffusion von Sauerstoff durch das Gewebe stark beeinträchtigen. Die bei den intravitalmikroskopischen

Experimenten beobachtete starke Reduktion des Blutflusses in den CAM-Gefäßen (Abbildung 24) könnte diesen Effekt noch verstärken. Die CAM als embryologisches Organ ist äquivalent zur Plazenta der Säugetiere für den Gasaustausch des Embryos unverzichtbar [119]. Bei der Behandlung von Tumoren im CAM-Modell sind jedoch große Teile der Membran und damit auch relevante Anteile des embryonalen Blutgefäßnetzes gegenüber CAP exponiert und weisen anschließend entsprechende Schäden und Veränderungen auf (Abbildung 14, Abbildung 15). Hierdurch wäre eine starke Einschränkung des Gasaustausches und des Blutflusses und eine dadurch erhöhte Embryosterblichkeit denkbar. Die Übertragbarkeit der schädlichen CAP-Auswirkungen auf andere Modellorganismen und Gewebetypen ist daher auf Grund der besonderen Bedeutung der CAM für den embryonalen Organismus nur begrenzt vorhanden.

5.2 Effekte von CAP auf Tumorzellen

Das erhöhte Auftreten apoptotischer Zellen nach CAP-Exposition ist für viele malignen Zelllinien *in vitro* wie *in vivo* wiederholt veröffentlicht worden [1, 34]. In den hier durchgeführten Experimenten zeigte sich die Induktion apoptotischen Zelltods durch CAP jedoch weniger deutlich als in der Literatur beschrieben. Ausschließlich die Gruppe mit der höchsten Behandlungsdauer von 4x 60 s CAP zeigte eine insgesamt signifikant erhöhte Apoptoserate im Vergleich zur Placebo-Behandlung. In der Gruppe mit 2x 60s Behandlung zeigte sich sogar ein gegenteiliger Effekt (Abbildung 16). Insgesamt weisen die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung gegen akt. Caspase-3 eine sehr hohe Streuung auf, was die Aussagekraft und Reliabilität der erhobenen Daten deutlich einschränkt.

Auf Grund der dreidimensionalen Struktur der behandelten Tumore und der sich daraus ergebenden unterschiedlichen Distanz der Tumorzellen zur CAP-Quelle, sowie der variierten Behandlungszeit im Sinne einer Dosis soll im Folgenden das Auftreten apoptotischer Zellen im Tumorgewebe nach diesen Gesichtspunkten getrennt beleuchtet werden.

5.2.1 Die Frage der Eindringtiefe

Das gehäufte Auftreten apoptotischer Zellen im Tumorgewebe nach einer CAP-Behandlung wird meist auf die von CAP emittierten RONS zurückgeführt. Diese entstehen bei der Ionisation des eingesetzten Gases und in den angrenzenden Flüssigkeiten [4, S. 21]. Anschließend wird von einer Diffusion der RONS in das Tumorgewebe ausgegangen [80], weshalb bei oberflächlicher CAP-Behandlung solider Tumore apoptotische Zellen vor allem in oberflächlichen Bereichen zu erwarten sind. Die in den durchgeführten Versuchen signifikante Abnahme der apoptotischen Zellen mit Zunahme der Distanz zur Tumoroberfläche nach 4x 60 s CAP-Behandlung bestätigen diese Verteilung (Abbildung 17 A). Die effektive Eindringtiefe von CAP und seinen reaktiven Bestandteilen wird jedoch nach wie vor kontrovers diskutiert [41, 79, 80, 157]. Dabei stellt dies eine wesentliche Information für die Behandlung solider Tumore dar.

Die von Partecke et al. [79] beschriebene, auf die oberen 3 bis 5 Zellschichten begrenzte Wirkung einer CAP-Behandlung ließ sich mit den durchgeführten Versuchen nicht bestätigen. Auch die proklamierte Eindringtiefe von 60 µm spiegelt sich nicht in den Daten aus den akt. Caspase-3 gefärbten Tumorschnitten wieder. Neuere Studien konnten unter Verwendung von Raman-Mikrospektroskopie an Gewebeproben aus Zervixschleimhaut Effekte von CAP auf die DNA und Lipide bis zur Basalmembran des Epithels nachweisen. Dies ließ auf eine effektive Eindringtiefe des CAP von ca. 270µm schließen [157]. In den Versuchen dieser Arbeit konnten vermehrt auftretende apoptotische Zellen im Tumorgewebe in der Behandlungsgruppe mit der höchsten Gesamtdosis (4x 60 s) bis in eine Tiefe von bis 400 µm ab der Tumoroberfläche festgestellt werden (Abbildung 17). Dies weist eher auf ein Eindringen der reaktiven Spezies im Millimeter-Bereich hin, wie von einigen Autoren proklamiert [80-82].

Die unterschiedlichen Ergebnisse im Vergleich zu Partecke et al., trotz der Verwendung des gleichen Modellsystems, könnten erneut am Einsatz verschiedener CAP-Geräte und abweichender Behandlungszeiten liegen. Auch der Einfluss der CAP-Behandlung auf die Angiogenese sowie die bereits ausgebildeten Blutgefäße im Tumorgewebe könnte eine Rolle spielen. Hierbei könnte es zu Veränderungen der Mikrozirkulation im Tumorgewebe und der umliegenden CAM kommen. Durch die veränderte Sauerstoff- und Nährstoffversorgung wäre auch in tieferen

Gewebeschichten die Induktion von Apoptosen und Zelluntergang denkbar. Die in der immunhistochemischen Färbung gegen akt. Caspase-3 in tieferen Geweschichten detektierten Apoptosen könnten somit sowohl durch direkte Effekte von CAP auf die Tumorzellen selbst als auch durch indirekte Effekte wie der Wirkung von CAP auf die Tumorgefäße und die Tumorangiogenese bedingt sein.

Die angenommene Wirtktiefe einer CAP-Behandlung von bis zu 400 µm ab der Tumoroberfläche stellt trotz allem eine der Hauptlimitationen einer CAP-Behandlung solider Tumore im klinischen Einsatz dar. Außerdem wachsen die Tumore im CAM-Modell oberflächlich, ohne Gewebearriere zwischen CAP-Quelle und Tumor, was nur auf die wenigsten klinischen Tumore *in situ* zutrifft. Die Ergebnisse aus Versuchen am CAM-Modell sind daher nicht auf die Behandlung subkutaner oder tiefer liegender Tumore übertragbar. Viele epitheliale Tumore wie mukosale Plattenepithelkarzinome, Urothelkarzinome, Tumore der Haut, sowie einigen Darmtumore wachsen hingegen ebenfalls sehr oberflächlich und könnten wie die Tumore im CAM-Modell direkt mit CAP behandelt werden. Auch die intraoperative Behandlung von Residuen im Tumorbett nach der Resektion eines soliden Tumors oder die endoskopische Behandlung stellen einen möglichen klinischen Einsatz ohne eine Gewebearriere dar [14, 77]. Doch auch mit intakter Hautbarriere konnten subkutane Tumore im Mausmodell bereits mehrfach erfolgreich mit CAP behandelt werden [78, 158, 159]. Dies könnte auf zusätzliche indirekte Effekte der CAP-Behandlung auch auf tiefer liegende Tumorbereiche hindeuten.

5.2.2 Die Frage der Dosis

Die Angabe der Dosis einer CAP-Behandlung im klassischen Sinne einer Wirkstoffmenge ist auf Grund der physikalischen Eigenschaften des Plasmas nicht möglich. Die direkt am CAP-Gerät emittierten geladenen Partikel und reaktiven Teilchen lassen sich zwar für den verwendeten miniFlatPlaSter® bestimmen [140, 141], trotzdem erlauben diese Messungen keine direkten Rückschlüsse auf die Konzentration von RONS im Tumorgewebe. Neben den direkt emittierten reaktiven Spezies können diese zusätzlich in angrenzenden Gasen und Flüssigkeiten um die Tumorzellen und auch intrazellulär entstehen [4, S. 21]. Daher wird anstatt einer Dosis meist die Behandlungszeit der Probe mit CAP angegeben. Die kumulative Behandlungszeit wurde auch in den Versuchen dieser Arbeit variiert, hierbei betrug die

tägliche Exposition gegenüber CAP oder einer Placebobehandlung stets 60 s. Durch die wiederholte Behandlung mit CAP oder Placebo über 1-4 Tage ergaben sich so kumulative Behandlungszeiten von 60-240 s.

In der Analyse der Apoptosen im Tumorgewebe zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit der Apoptoserate von der Behandlungszeit. Zunächst ließen sich allerdings nur in der Gruppe mit längster Behandlungszeit von 4x 60 s über den gesamten Tumorschnitt statistisch höhere Apoptosezahlen nach CAP-Behandlung im Vergleich zu Placebobehandlung beobachten (Abbildung 16). In der Behandlungsgruppe mit 1x 60 s CAP- oder Placebobehandlung zeigte sich entgegen der Erwartung eine signifikant erniedrigte Apoptosenzahl nach CAP-Behandlung. Anschließend erfolgte eine genauere Betrachtung der oberen 400 µm der Tumorschnitte, da in diesen Gewebetiefe die Haupteffekte einer CAP-Behandlung beobachtet werden konnten (Abbildung 17). Hierbei waren positive Mediandifferenzen als Zeichen von erhöhten Apoptosen nach CAP-Behandlung in den Gruppen mit 4x 60s und 3x 60s Behandlungszeit zu erkennen (Abbildung 18). Die Unterschiede in der Gruppe mit längster Behandlungszeit von 4x 60 s zeigten sich zudem als signifikant im Mann-Whitney U-Test in drei von vier der betrachteten Gewebetiefen. Diese Ergebnisse sprechen für eine Abhängigkeit der beobachteten CAP-Effekte von der kumulierten Behandlungszeit.

Interessanterweise zeigten sich in den Gruppen mit kürzerer Behandlungszeit von 2x 60 s und 1x 60 s durchweg negative Mediandifferenzen als Zeichen einer verringerten Apoptoserate nach CAP-Behandlung im Vergleich zur Placebo-Behandlung (Abbildung 18). Dieser Unterschied war außerdem nach 2x 60 s Behandlung in Gewebetiefen zwischen 100 und 200 µm signifikant im Mann-Whitney U-Test. Zunächst lässt sich daher sagen, dass kürzere Behandlungen mit CAP im Vergleich mit einer Placebo-Behandlung keinen Unterschied in den Apoptosezahlen bewirkten oder sogar signifikant weniger Apoptosen im Tumorgewebe verursachten. Dies spricht zunächst erneut für eine Abhängigkeit der antikanzerösen CAP-Effekte von der Behandlungszeit. Denkbar wäre hier zudem ein förderlicher Effekt kurzer CAP-Behandlungen auf die Tumorzellen, vergleichbar mit der stimulierende Wirkung von CAP auf Keratinozyten und Fibroblasten bei der Therapie von chronischen Wunden [36]. Tumorzellen weisen jedoch auf Grund ihres hohen Metabolismus und Proliferationsrate ein bereits erhöhte intrazelluläre RONS-Konzentrationen auf und sind daher nicht direkt vergleichbar mit unveränderten Zellen in Haut und

Bindegewebe [22]. Als mögliche Ursache kommen demnach auch methodische Faktoren in Betracht. Durch die geringere Zeit der Tumorzellen auf der CAM in den Gruppen mit kurzer Behandlungszeit (1x 60 s: 4 Tage, 2x 60 s: 5 Tage), könnte ein schlechteres Einwachsen und die damit einhergehend geringere Blutversorgung der Tumore eine Rolle spielen. Durch Minderperfusion könnten Tumorzellen bereits unabhängig von der Behandlung untergehen und so einen möglichen Effekt der Behandlung kaschieren.

Fraglich bleibt, ob sich eine einmalige, längere Behandlung mit insgesamt gleicher Behandlungsdauer von der repetitive CAP-Behandlung über mehrere Tage wie in diesen Versuchen unterscheidet. Durch eine einmalige, lange Behandlung mit CAP ließe sich vermutlich eine deutlich höhere intrazelluläre Konzentration ans RONS erzielen, welche auch stärkere antikanzeröse Effekt bewirken könnte. Eine ähnliche Strategie wird in der „Flash“-Radiotherapie von Malignomen verfolgt. Hierbei werden Tumore bei nur geringer oder keiner Fraktionierung der Behandlung und sehr hoher Dosis bestrahlt. Hierdurch wird ein stärkerer antikanzeröser Effekt als durch eine stark fraktionierte Behandlung bei gleicher Gesamtdosis erwartet [160].

Als Limitation der Dosis pro Behandlung gilt in der Radiotherapie und auch in der Behandlung mit CAP jedoch das Ausmaß der Schädigung von umliegenden, physiologischen Geweben. Auf Grund der bereits hohen Ausfallrate von über 25% nach der initialen CAP-Behandlung mit 60 s (Abbildung 13), sowie deutlichen Schäden an der CAM mit möglicher Beeinträchtigung des Gasaustausches (Abbildung 14), ist eine längere CAP-Behandlung für Tumore im CAM-Modell vermutlich mit sehr hohen Ausfallraten verbunden und daher nicht zielführend. Für Tumore in Mausmodellen oder dem klinischen Einsatz von CAP stellt eine einmalige, lange Behandlung im Sinne einer „Flash“-Therapie hingegen eine interessante Option dar, deren Auswirkungen weiter untersucht werden sollten.

5.3 Effekte von CAP auf Tumorgefäße und Mikrozirkulation

Trotz ihrer Bedeutung für die Behandlung solider Tumore wurde die Wirkungen von CAP auf Tumorgefäße und die Mikrozirkulation im Tumorgewebe bisher nur selten untersucht. Aufgrund der zentralen Rolle für die Progression solider Tumore ist die Untersuchung der Wirkung von CAP auf Tumorgefäße jedoch von großem Interesse [68]. Diese sind essenziell für die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung und das daraus

mögliche Tumorstadium und werden daher vermehrt als Zielstruktur neuer Tumorthapeutika eingesetzt. Neben der Wirkung von CAP auf die Tumorzellen selbst konnten in den hier durchgeführten Versuchen deutliche Hinweise auf eine Beeinflussung der tumor-assoziierten Blutgefäße durch CAP beobachtet werden.

5.3.1 Gefäßdichte und Angiogenese

Während sich in der Gefäßverteilung in und um das Tumorgewebe kein deutlicher Unterschied zwischen Tumoren nach (repetitiver) CAP-Behandlung und Placebo-Behandlung zeigte (Abbildung 19), wiesen die Tumore nach höchster CAP-Dosis (4x 60 s) eine signifikant erniedrigte mittlere Gefäßdichte auf (Abbildung 20). Dies scheint am ehesten durch direkt eintretende Effekte der Plasma-Behandlung an den bestehenden Gefäßen, wie der Koagulation bereits ausdifferenzierter Blutgefäße im Tumorgewebe bedingt zu sein [161]. Ein indirekter Einfluss von CAP durch eine verringerte Expression von VEGF in der CAM konnte hingegen nicht gezeigt werden. So erbrachte die Quantifizierung der VEGF-Expression keinen signifikanten Unterschied zwischen Behandlungs- und Placebogruppe (Abbildung 21). Die nicht signifikante, jedoch im Mittel niedrigere Expression nach CAP-Exposition könnte allerdings auf eine Reduktion der VEGF-Expression hinweisen. Ein geringeres VEGF-Level nach CAP-Exposition ist bereits für zwei maligne Zelllinien *in vitro* beschrieben worden [73, 74], vergleichbare *in vivo*-Daten fehlen bislang. Auch die direkte Hemmung von Endothelzellen und damit der Tumorangiogenese durch CAP wäre als Erklärung für eine geringere Gefäßdichte im Tumorgewebe denkbar. Diese ist *in vitro* mehrfach untersucht worden und erbrachte eine verringerte Tubusbildung und Migration der Endothelzellen nach einer CAP-Behandlung [75, 76]. Ob sich diese Beobachtungen in den komplexen Mechanismus der Angiogenese in soliden Tumoren übertragen lassen, ist jedoch fraglich. Insgesamt betrachtet zeigen sich deutliche Hinweise auf schädigende Effekte von CAP auf Blutgefäße in soliden Tumoren, für eine endgültige Aussage reicht jedoch die Datenlage in der Literatur und den hier durchgeführten Experimenten nicht aus.

Gegensätzlich zu den in der Literatur vermuteten hemmenden Effekten auf die Gefäßneubildung in Tumoren ist für Blutgefäße in chronischen Wunden eine förderliche Wirkung von CAP-Behandlungen auf die Angiogenese und Mikrozirkulation beschrieben [36, 162]. Hierbei wird von einer stimulierenden Wirkung durch

geringgradig erhöhte Konzentrationen an RONS und dem damit verbundenen, leichten oxidativen Stress ausgegangen [69, 72]. Nicht geklärt ist hierbei, wie die gegensätzlichen Effekte von CAP auf Blutgefäßen in Wunden und Gefäßen im Vergleich zu Blutgefäßen in Tumoren zu erklären sind. Denkbar wäre ein Unterschied durch die meist deutlich längeren Behandlungszeiten mit CAP in der experimentellen Tumorthherapie und der dadurch deutlich höheren Konzentration anfallender RONS.

Auch eine in gewissen Maßen selektiv destruktive Wirkung von CAP auf die Tumorangiogenese und Tumorgefäße wäre möglich. Diese Theorie ließe sich durch eine erhöhte Empfindlichkeit der Tumorgefäße gegenüber Schäden durch eine CAP-Exposition begründen. Die veränderte Gefäßarchitektur von Tumorblutgefäßen, charakterisiert durch einen unregelmäßigen Wandbau und Gefäßdurchmesser, ungleichmäßigen Blutfluss und höherer Durchlässigkeit der Gefäßwand [89-91] könnte diese anfälliger für zusätzliche Schäden durch CAP-vermittelten, starken oxidativen Stress machen. Um dieser Theorie weiter nachzugehen wären vergleichende Versuche zur Wirkung von CAP auf Tumorgefäße und Gefäße in gesundem, physiologischem Gewebe notwendig. Hierbei wäre jedoch die fragliche Eindringtiefe einer CAP-Behandlung in das Gewebe zu beachten (siehe Abschnitt 5.2.1). Aufgrund der oberflächlichen Lage der Blutgefäße in der Chorion-Allantois-Membran wäre das HET-CAM-Modell bestens für weitere Versuche von CAP auf physiologische sowie tumor-assoziierte Blutgefäßen geeignet [126, 130].

5.3.2 Gefäßpermeabilität

Ein häufig beschriebener Effekt von CAP-Behandlungen auf solide Tumore *in vivo* ist die Reduktion des Tumolvolumens [14, 37, 78, 158, 159]. Diese Daten wurden meist in murinen Modellen durch die extrakorporale Vermessung des subkutanen Tumors nach repetitiver CAP-Behandlung erhoben. Gegensätzlich hierzu ergaben die sonographischen Messungen der Tumorumfänge in den hier durchgeführten Versuchen ein signifikant erhöhtes Tumolvolumen nach 4x 60 s CAP-Behandlung im Vergleich zur Placebo-Behandlung (Abbildung 22 A). Dieses zunächst unerwartete Ergebnis lässt sich allerdings durch das Vorliegen intratumoraler Blutungen in 82,4 % der mit CAP behandelten Tumore erklären. Placebo-behandelte Tumore wiesen hingegen nur in 20 % Einblutungen in das Tumorstroma auf (Abbildung 22 B). Auch die positive Korrelation von Tumolvolumen und dem Vorhandensein intrumoraler

Blutungen lässt auf eine blutungsbedingte Volumenzunahme und nicht auf ein tatsächliches Wachstum des Tumorgewebes nach CAP-Behandlung schließen. Intratumorale Blutungen können in soliden Tumoren auf Grund der veränderten Gefäßarchitektur und erhöhten Durchlässigkeit häufig beobachtet werden [93]. Die im Vergleich zur Placebogruppe stark erhöhte Rate an intratumoralen Blutungen nach CAP-Behandlung könnte jedoch zusätzlich auf eine Schädigung der Blutgefäße und einer Steigerung der Gefäßdurchlässigkeit durch die CAP-Exposition hinweisen [155].

Um die Effekte von CAP auf tumor-assoziierte Gefäße weiter zu untersuchen, wurden daher anschließend tumor-assoziierte Gefäße in der CAM durch intravitale Fluoreszenzmikroskopie weiter untersucht. Für Fluoreszenz-markierte Kohlenhydrat mit 70 kDa Größe, wie dem applizierten TRITC-Dextran, werden unter homöostatischen Bedingungen eine nur begrenzte vaskuläre Permeabilität angenommen [153]. Tumor-assoziierte Blutgefäße weisen durch ihren veränderten Wandbau jedoch häufig eine erhöhte Permeabilität auf [89, 93, 94, 153]. Die behandlungsunabhängig auftretende Anreicherung von TRITC-Dextran im Tumorgewebe (Abbildung 23) ist am ehesten hierdurch bedingt.

Große Unterschiede zeigten sich jedoch in der umfangreichen Extravasation von TRITC-Dextran in den tumorassoziierten Blutgefäßen der CAM nach einer einmaligen CAP-Exposition für 60 s (Abbildung 23 D). Ab einem Zeitpunkt von 5 Minuten nach der CAP-Exposition zeigte sich eine paravasale Akkumulation von TRITC-Dextran, die Anreicherung des Fluorophors nahm im Laufe der Zeit kontinuierlich zu. Die tumor-assoziierten Blutgefäße nach Placebo-Behandlung zeigten hingegen nur eine minimale Extravasation, insgesamt erscheinen die Blutgefäße auch 60 Minuten nach der Behandlung intakt (Abbildung 23 B).

Der Einfluss von CAP auf die Permeabilität tumorassoziierte Gefäße ist bisher nicht ausreichend untersucht worden. Beschrieben ist jedoch der vermehrt auftretende apoptotische Zelltod von Endothelzellen und glatter Gefäßmuskulatur nach einer CAP-Exposition [76, 163]. Neben der Schädigung von Endothelzellen konnte auch eine Veränderung der Membranpermeabilität und -funktion beobachtet werden [164]. Auch Proteine der Extrazellulärmatrix wie Kollagene oder Hyaluronsäure könnten durch erhöhte RONS-Konzentration depolymerisiert und dadurch destabilisiert werden [38]. Diese Vorgänge könnten zu einer Destabilisierung der Gefäßwand und letztlich zu einer erhöhten Permeabilität und Instabilität der Blutgefäße nach einer CAP-Exposition beitragen. Darüber hinaus ist eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität durch

Wachstumsfaktoren wie VEGF und entzündungsfördernde Faktoren im Tumormikromilieu bekannt [92, 95]. Da die VEGF-Expression in der CAP jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen CAP- oder Placebobehandlung aufzeigte (Abbildung 21) und bereits mehrfach erniedrigte VEGF-Level nach CAP-Behandlung beschrieben wurden [73, 74], scheint eine durch VEGF verursachte Veränderung der Gefäßpermeabilität in den durchgeführten Versuchen eher unwahrscheinlich.

Des Weiteren ist bekannt, dass CAP mehrere proinflammatorische Zytokine wie Interleukine, Interferone und Tumornekrosefaktoren induzieren und so ein entzündliches Milieu bedingen kann [58, 59, 165]. Durch die von CAP ausgelöste Entzündungsreaktion könnte nachfolgend eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität und eine Veränderung des Blutflusses verursacht werden [166]. Neben einer Veränderung der Permeabilität durch den Einfluss auf Zytokine wäre auch eine Rolle des durch die CAP-Quelle emittierte Stickstoffmonoxid (NO) denkbar. Dieses hat als Botenstoff einen relevanten Einfluss auf die Gefäßpermeabilität [167]. Die von dem verwendeten CAP-Gerät miniFlatPlaSter® emittierten NO-Werte sind jedoch vergleichsweise niedrig [140-142]. Ein Anstieg der Gefäßpermeabilität durch das vom CAP-Gerät direkt emittierte NO erscheint somit unwahrscheinlich. Allerdings führen proinflammatorische Zytokine zur erhöhten Expression der induzierbaren NO-Synthase in Zellen des Immunsystems wie Monozyten, Makrophagen oder neutrophilen Granulozyten. Daher könnten aufgrund des durch CAP induzierten entzündlichen Milieus im Gewebe eventuell höhere Mengen an NO synthetisiert werden und so vermehrten Einfluss auf die Gefäßpermeabilität nehmen [168].

Bisher nur insuffizient untersucht ist der Einfluss des elektrischen Feldes, welches durch die Akkumulation geladener Teilchen auf der Zellmembran bei einer CAP-Behandlung entsteht. Durch das elektrische Feld selbst oder auch eine kombinierte Wirkung von elektrischen und chemischen Faktoren wie Zytokinen könnte die Gefäßpermeabilität weiter beeinflusst werden [169].

Relevant ist eine Veränderung der Permeabilität tumor-assoziiertes Gefäße insbesondere für den Einsatz systemischer Tumorthapeutika und einer möglichen kombinierten Therapie mit CAP. Synergistische Effekte von nanopartikulären Medikamenten oder Chemotherapeutika in Kombination mit einer CAP-Behandlung wurden bereits von mehreren Arbeitsgruppen berichtet [170-173]. Diese synergistischen Effekte wurden meist auf den gemeinsamen Wirkmechanismus der RONS-Freisetzung zurückgeführt. Es wird angenommen, dass es durch die

kombinierte Behandlung zu einem stark erhöhten intrazellulären RONS-Spiegel kommt, welcher die antioxidative Kapazität der Zellen schnell überschreitet und so DNA-Schäden und Apoptosen verursacht [174]. Der mögliche Einfluss einer durch CAP induzierten gesteigerten Gefäßpermeabilität auf die vermehrte Akkumulation von therapeutischen Wirkstoffen wie Nanopartikeln oder Chemotherapeutika im Zielgewebe wurde in den entsprechenden Arbeiten nicht diskutiert. Diese Hypothese wäre anhand der im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse jedoch plausibel. Durch die Steigerung der Gefäßpermeabilität könnten synergistische Behandlungseffekte in der kombinierten Therapie mit CAP und systemischen Therapeutika ausgenutzt werden. So könnte der topische, auf Tumor und Tumorumgebung begrenzte Einsatz von CAP eine lokal erhöhte Konzentration an systemischen Wirkstoffen vermitteln. Im Optimalfall ließe sich so, trotz Verwendung einer niedrigeren Dosis an nanopartikulären Medikamenten oder Chemotherapeutika, eine gleichbleibende oder höhere Wirksamkeit dieser im Tumorgewebe erzielen. Damit wäre durch den kombinierten Einsatz lokaler (CAP) und systemischer Tumortherapien und der daraus resultierenden lokalen Wirkungsfokussierung im Tumorgewebe auch die Reduktion unerwünschter Arzneimittelwirkungen im Gesamtorganismus verbunden.

Dem entgegen ist jedoch zu bedenken, dass eine erhöhte Gefäßpermeabilität auch negative Auswirkungen auf die Akkumulation systemischen Tumortherapeutika im Gewebe haben könnte. Durch die CAP-induzierte Schädigung der tumorassoziierten Blutgefäße könnte der bereits hohe interstitielle Druck im Tumorgewebe weiter steigen [94, 95]. Hierdurch würde sich die notwendige Diffusion systemischer Tumortherapeutika ins Tumorgewebe nach einem initialen Einstrom aufgrund der nun veränderten Druckverhältnisse reduzieren und sich so negativ auf deren Wirksamkeit auswirken [94, 95, 175]. Außerdem ist zu bedenken, dass eine erhöhte Permeabilität der Tumorgefäße auch eine einfachere Invasion der Tumorzellen in die Blutgefäße und damit eine schnellere und ausgeprägtere Metastasierung bedingen könnte [38, 176]. Es wird daher in Folgearbeiten wichtig sein, zu evaluieren, wie eine zeitliche Konzentrierung der CAP- und Chemotherapeutika-Applikation antitumorale Effekte fördern kann, ohne potenziell prognostisch negative Faktoren wie Metastasierung und reduzierte Therapeutika-Aufnahme zu bedingen. Zu diskutieren ist hierbei, dass einige Publikationen bereits einen hemmenden Einfluss von CAP auf die Tumormetastasierung proklamieren. Dies könnte durch die Regulierung des epithelial-

mesenchymalen Übergangs [177] und der Herunterregulierung pro-metastatischer Signalwege [178, 179] vermittelt werden. *In vivo*-Versuche, die den Einfluss von CAP auf tumor-assoziierte Blutgefäße und die Tumormetastasierung adäquat abbilden, fehlen jedoch bislang.

Zusammenfassend zeigten sich deutliche Hinweise relevanter Effekte von CAP auf die Permeabilität von Tumorgefäßen und dadurch auf die Wirksamkeit der therapeutischen Wirkstoffabgabe ins Gewebe. Weitere Studien sind dringend notwendig, um die Auswirkung dieser CAP-induzierter Veränderungen genauer zu untersuchen und deren therapeutische Konsequenzen zu evaluieren.

5.3.3 Mikrozirkulation

Die exemplarische Analyse des segmentalen Blutflusses in tumor-assoziierten Blutgefäßen der CAM zeigte einen starken Abfall des Blutflusses unmittelbar nach CAP-Exposition. Während ein Gefäß innerhalb von ca. 10 Minuten wieder eine normale Fließgeschwindigkeit erreichte, kam der Blutfluss in zwei weiteren Blutgefäßen komplett zum Erliegen. Auch eine Umkehr der Flussrichtung konnte nach CAP-Exposition in einem Gefäß beobachtet werden (Abbildung 24). Zudem waren eine Stunde nach CAP-Exposition in der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme mehrere thrombotische Gefäßverschlüsse sichtbar (Abbildung 23 D). Es ist bekannt, dass CAP die Blutgerinnung *in vitro* und *in vivo* durch eine erhöhte Fibrinogen-Aggregation beeinflussen kann [161, 180]. Hierbei scheint durch die CAP-Exposition entstehendes Wasserstoffperoxid eine Häm-vermittelte Vernetzung von Fibrinogen zu initiieren, was zur Bildung eines Fibrinnetzwerks und letztlich zur Blutgerinnung führt [181]. Thrombotische Verschlüsse von Gefäßen in der CAM nach CAP-Exposition sind bereits von anderen Arbeitsgruppen berichtet worden [136, 137], die Gefäßschädigungen und Blutflussveränderungen traten in den Versuchen dieser Arbeit jedoch in einem vorher nicht beschriebenen Ausmaß auf.

Der initial nach CAP-Exposition beobachtete starke Abfall des segmentalen Blutflusses mit nachfolgendem Wiederanstieg könnte zudem eine direkte Wirkung der von CAP-emittierten RONS darstellen. Da RONS als Messenger-Moleküle eine wichtige Rolle in den zellulären Mechanismen der Vasokonstriktion und -dilatation einnehmen [182], könnte ein plötzlicher starker Anstieg der RONS-Konzentration das

Gleichgewicht reaktiver Spezies stören und zu Vasospasmen führen. Die Rolle der einzelnen RONS in den Signalkaskaden ist jedoch umstritten und unterscheidet sich für die einzelnen Moleküle. Während Hyperoxide wie O_2^- eine Vaskonstriktion auslösen können, bewirkt NO über die Aktivierung der zytosolischen Guanylatzyklase eine Vasodilatation [182].

Auch ein ähnlicher Mechanismus der durch die CAP-Exposition ausgelösten Okklusionen von Gefäßen wie bei der photodynamischen Therapie von Tumoren wäre denkbar. Hierbei werden durch die Anregung einer intravasalen Photosensibilisator-Substanz RONS generiert, welche die Tumorblutgefäße schädigen und okkludieren können [183]. Dabei wird von einer oxidativen Schädigung der Endothelzellen durch RONS ausgegangen, welche durch die Freilegung thrombogener Strukturen und die Freisetzung von Thromboxan A_2 und Von-Willebrand-Faktor eine Vasokonstriktion und die Entstehung von Thromben auslösen kann [183, 184]. Diese Effekte wurden auch für Blutgefäßen in der CAM beschrieben [185].

Vergleichbar zur gesteigerten Gefäßpermeabilität birgt auch die beobachtete Reduktion des Blutflusses in tumor-assoziierten Blutgefäßen sowohl therapeutische Chancen als auch Hindernisse. Zum einen wäre bereits durch die Reduktion des Blutflusses und der damit verbundenen reduzierten Versorgung des Tumorgewebes mit Nährstoffen und Sauerstoff ein antikanzeröser Effekt möglich. So könnte dieser Effekt auch das erhöhte Auftreten intratumoraler Apoptosen, insbesondere in tieferen Tumorbereichen bedingt haben (Abbildung 10). Andererseits könnte durch eine CAP-induzierte Reduktion der Blutversorgung des Tumorgewebes eine suffiziente Anreicherung systemischer Tumortherapeutika wie nanopartikulären Medikamenten oder Chemotherapeutika verhindert werden. Um dieser Problematik zu umgehen, müsste eine genau abgestimmte zeitliche Abfolge der CAP-Behandlung im Anschluss an die Gabe des systemischen Therapeutikums eingehalten werden. So könnte sichergestellt werden, dass sich das intravenös verabreichte Tumortherapeutikum zunächst systemisch verteilen und durch die noch gut ausgebildeten Blutgefäße im Tumorgewebe anreichern kann. Anschließend könnte durch eine CAP-Behandlung des Tumorgewebes sowohl die Permeabilität der Gefäße erhöht als auch der Blutfluss durch die auftretenden Vasospasmen und Thromben reduziert werden (Abbildung 23, Abbildung 24). So wäre eine vermehrte Anreicherung des systemischen Therapeutikums und eine zusätzliche Minderperfusion des Tumorgewebes durch eine CAP-Behandlung möglich. Hierdurch wäre eine kombinierte Wirkung aus starkem

oxidativem Stress mit der Induktion von Apoptosen im Tumorgewebe und einer gleichzeitigen Wachstumsrestriktion durch die CAP-bedingte Minderperfusion möglich. Aktuelle Studien zur synergistischen Wirkung von CAP und systemischen Tumorthapeutika verfolgen jedoch meist keine genaue Abfolge der Behandlungen bzw. applizieren das systemischen Therapeutikum teils erst nach der CAP-Behandlung [173]. Trotz der hier vermuteten reduzierten Perfusion des Tumorgewebes nach der CAP-Behandlung ließen sich jedoch synergistische Effekte nachweisen. Ob diese bei einer adäquaten zeitlichen Abfolge größer ausgefallen wären, bleibt allerdings unklar.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass CAP durch die Generierung hoher Konzentrationen an RONS die Mikrozirkulation von Tumoren und umgebenden Strukturen relevant beeinflussen könnte. Durch die beobachtete Reduktion des segmentalen Blutflusses und die verringerte Blutgefäßdichte im Tumorgewebe könnte das Tumorwachstum durch die eingeschränkte Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen begrenzt werden. Gleichzeitig muss insbesondere bei der kombinierten Therapie mit systemischen Tumorthapeutika eine mögliche Einschränkung der Anreicherung dieser Substanzen im Tumorgewebe bedacht werden.

5.4 Limitationen

Die physikalische Zusammensetzung des CAP selbst und die Erzeugung reaktiver Spezies variiert stark zwischen verschiedenen Plasmageräten, den verwendeten Trägergasen und den behandelten Geweben [10]. Dies schränkt die Vergleichbarkeit von Experimenten, die mit verschiedenen CAP-Geräten und Modellen durchgeführt wurden, deutlich ein. Hinzu kommen Limitationen, die sich aus dem Einsatz des CAM-Modells ergeben. Dieses zeigt durch die Verwendung eines relativ kleinen, embryonalen Organismus möglicherweise eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Noxen auf. Daraus könnte eine erhöhte Mortalität im Vergleich zum Einsatz muriner Modelle bedingt sein (Abbildung 13). Die CAM als dünne extraembryonale Membran ist zudem womöglich weniger in Lage CAP-induzierte Schäden zu kompensieren als intakte Haut oder andere Zielgewebe. Die beobachteten Irritationen der CAM durch eine CAP-Behandlung (Abbildung 14) sind daher nur eingeschränkt auf die kutane Anwendung am Menschen oder der Maus übertragbar.

Die CAM übernimmt außerdem im embryonalen Organismus die Funktion des Gasaustausches und weist daher ein dichtes und sehr oberflächliches Gefäßnetz auf, welches gegenüber einer CAP-Behandlung stark exponiert ist. Die Effekte von CAP auf Tumore mit geringer ausgeprägten oder weniger exponierten Blutgefäßen könnten daher stark von den Beobachtungen in dieser Arbeit abweichen. Ein weiterer Nachteil des CAM-Modells für die Untersuchung von Tumoren ist zudem der vergleichsweise kurze Beobachtungszeitraum von etwa sieben Tagen (Abbildung 6). Dieser ist begrenzt durch den Beginn der CAM-Entwicklung ab Tag 6 der Bebrütung [119] und dem Auftreten unspezifischer immunologischer Reaktion ab Tag 14. Aus ethischen Gründen werden Versuche am CAM-Modell daher meist nicht weiter als zum 14. Tag der Inkubation verfolgt.

Das CAM-Modell ermöglicht durch das Wachstum der Tumore in und auf der CAM eine direkte *in ovo*-Behandlung und Beobachtung der Tumore ohne eine nennenswerte Gewebebarriere zwischen CAP-Quelle und Tumor. Bei der Behandlung solider Tumore in Mausmodellen oder dem klinischen Einsatz befindet sich jedoch häufig eine Haut oder anderes physiologisches Gewebe zwischen Plasmagerät und Zielgewebe. Da die vermutlich nur geringe Wirtiefe einer CAP-Behandlung im Millimeterbereich eine Hauptlimitation dieser Behandlung darstellt (Abschnitt 5.2.1), sind die Ergebnisse aus Versuchen am CAM-Modell nicht auf die Behandlung subkutaner oder tiefer liegender Tumore übertragbar. Eine direkte Behandlung oberflächlicher Tumorentitäten ohne Gewebebarriere kommt hingegen in Frage (Abschnitt 5.2.1).

Methodisch ergeben sich durch den verwendeten Versuchsablauf mit jeweiligem Behandlungsbeginn an Tag 10 der Bebrütung und Variation der kumulierten Behandlungsdauer von 60-240 s an 1-4 Tagen (Abschnitt 3.2.3) weitere Limitationen für die statistische Vergleichbarkeit der erhobenen Daten. So ist durch den variierten Beobachtungszeitraum der einzelnen Gruppen und der damit unterschiedlichen Zeit unter Risiko nur der direkte Vergleich einer CAP-Gruppe mit der entsprechenden Placebo-Gruppe in den Ereigniszeitanalysen zulässig (Abschnitt 4.1). Auch ein direkter Vergleich der unterschiedlichen Behandlungszeiten im Sinne einer Dosis ist aufgrund der variierten Entnahmezeitpunkte der Tumorproben aus dem Modellorganismus nicht zulässig. Um ein Vergleich zu ermöglichen wurden daher in Abschnitt 4.2.3 die Mediandifferenzen der CAP-Gruppen zur jeweiligen Placebo-Gruppen dargestellt (Abbildung 18). Außerdem weisen die Daten aus der Färbung

gegen aktivierte Caspase-3 eine insgesamt sehr hohe Streuung auf (Tabelle 11, Abbildung 16), was die Aussage der nachfolgenden statistischen Analysen deutlich einschränkt.

Die in den Versuchen beobachteten Effekte von CAP auf tumor-assoziierte Blutgefäße und Mikrozirkulation (Abbildung 23, Abbildung 24) beruhen auf kleine Stichproben in einem explorativen Versuchsansatz und stellen somit zwar eine wichtige Beobachtung dar, eignen sich jedoch nicht zu einer validen statistischen Auswertung.

Insgesamt betrachtet lässt sich jedoch festhalten, dass trotz der genannten Limitationen die erhobenen Daten auf deutliche Effekte von CAP auf solide Tumore schließen lassen. Neben der direkten Beeinflussung von Apoptoseraten ergeben sich insbesondere durch die deutliche Beeinflussung des tumor-assoziierte Gefäßnetzes neue Möglichkeiten für den kombinierten Einsatz von CAP in der Tumorthherapie. Weitere Versuche sind hier dringend notwendig, um die proklamierten Effekten von CAP auf die Blutgefäße und Mikrozirkulation solider Tumore genauer zu untersuchen und das Potenzial einer kombinierten Therapie aus CAP und systemischen Therapeutika zu evaluieren.

6 Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es, die Effekte von CAP auf solide Tumore *in ovo*, unter Einsatz des HET-CAM-Modells zu untersuchen. Neben der direkten Wirkung auf Tumorzellen selbst sollten auch die Verträglichkeit und mögliche Toxizität einer CAP-Behandlung sowie insbesondere die Effekte von CAP auf die tumor-assoziierten Blutgefäße und Mikrozirkulation betrachtet werden. Zur Analyse der CAP-induzierten Veränderungen wurde hierfür neben der immunhistochemischen Auswertung der Hauptversuche eine möglichst breite methodische Herangehensweise aus qPCR, *in ovo*-Sonographie und intravitale Fluoreszenzmikroskopie gewählt.

Entgegen der häufig proklamierten guten Verträglichkeit einer CAP-Behandlung ließen sich während den Versuchen dieser Arbeit deutlich negative Effekte von CAP auf die Viabilität des embryonalen Organismus und die Integrität des gesunden CAM-Gewebes beobachten. Der zugrundeliegenden Literatur entsprechend zeigte sich ein deutlicher Effekt der CAP-Behandlung auf die Viabilität der untersuchten Tumorzellen. Die häufig diskutierte effektive Eindringtiefe der Plasmabehandlung war hierbei mit ca. 400 µm größer als aus der Literatur erwartet. Signifikant erhöhte Apoptosezahlen ließen sich allerdings nur bei hoher kumulativer Dosis erzielen, kurze Behandlungszeiten erbrachten nicht die erwartete Wirkung vermehrter Apoptosen im Tumorgewebe, sondern zeigten teils einen gegenteiligen Effekt. Nach einer Behandlung mit CAP konnten außerdem eine verringerte intratumorale Gefäßdichte, eine erhöhte Gefäßpermeabilität und ein reduzierter Blutfluss in den untersuchten tumor-assoziierten Blutgefäßen gezeigt werden.

Neben den bekannten direkten Effekten von CAP auf Tumorzellen ergeben sich durch die neu beobachteten Effekte auf die tumor-assoziierten Blutgefäße weitere Möglichkeiten für den Einsatz von CAP als ergänzende Behandlungsmodalität zu systemischen Tumorthapeutika. Insbesondere die CAP-induzierte Erhöhung der Gefäßpermeabilität könnte eine intratumorale Akkumulation systemischer Chemotherapeutika oder nanopartikulärer Wirkstoffe bewirken. Die topische Applikation und damit lokalisierte Wirkung von CAP könnte die Wirksamkeit systemischer Therapeutika im Tumorgewebe damit deutlich erhöhen, bei gleichzeitiger Reduktion systemischer Nebenwirkungen.

Um dieses innovative therapeutische Konzept weiter zu verfolgen, sind weiterführende *in vivo*-Untersuchungen und letztlich klinische Studien dringend erforderlich. Hierbei gilt es, synergistische Effekte einer CAP-Behandlung mit etablierten und neuartigen Tumortherapeutika weiter zu untersuchen und CAP als neue Behandlungsmodalität in der Therapie solider Tumore zu evaluieren und standardisieren.

7 Literaturverzeichnis

1. Dubuc A, Monsarrat P, Virard F, Merbahi N, Sarrette J-P, Laurencin-Dalicieux S, et al. Use of cold-atmospheric plasma in oncology: a concise systematic review. *Therapeutic advances in medical oncology*. 2018;10.
2. Ratovitski EA, Cheng X, Yan D, Sherman JH, Canady J, Trink B, et al. Anti-Cancer Therapies of 21st Century: Novel Approach to Treat Human Cancers Using Cold Atmospheric Plasma. *Plasma Processes and Polymers*. 2014;11(12):1128-37.
3. Yan D, Talbot A, Nourmohammadi N, Sherman JH, Cheng X, Keidar M. Toward understanding the selective anticancer capacity of cold atmospheric plasma--a model based on aquaporins (Review). *Biointerphases*. 2015;10(4):040801.
4. Metelmann H-RvW, Thomas; Weltmann, Klaus-Dieter. *Plasmamedizin, Kaltplasma in der medizinischen Anwendung*. Heidelberg: Springer-Verlag; 2016.
5. Ginsberg GG, Barkun AN, Bosco JJ, Burdick JS, Isenberg GA, Nakao NL, et al. The argon plasma coagulator February 2002. *Gastrointestinal endoscopy*. 2002;55(7):807-10.
6. d'Agostino R, Favia P, Oehr C, Wertheimer MR. Low-temperature plasma processing of materials: Past, present, and future. *Plasma Processes and Polymers*. 2005;2(1):7-15.
7. Moreau M, Orange N, Feuilloley M. Non-thermal plasma technologies: new tools for bio-decontamination. *Biotechnology advances*. 2008;26(6):610-7.
8. Isbary G, Morfill G, Schmidt H, Georgi M, Ramrath K, Heinlin J, et al. A first prospective randomized controlled trial to decrease bacterial load using cold atmospheric argon plasma on chronic wounds in patients. *British Journal of Dermatology*. 2010;163(1):78-82.
9. Lee HW, Kim GJ, Kim JM, Park JK, Lee JK, Kim GC. Tooth bleaching with nonthermal atmospheric pressure plasma. *Journal of endodontics*. 2009;35(4):587-91.
10. Weltmann KD, Kindel E, von Woedtke T, Hähnel M, Stieber M, Brandenburg R. Atmospheric-pressure plasma sources: Prospective tools for plasma medicine. *Pure and Applied Chemistry*. 2010;82(6):1223-37.
11. Heinlin J, Isbary G, Stolz W, Morfill G, Landthaler M, Shimizu T, et al. Plasma applications in medicine with a special focus on dermatology. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2011;25(1):1-11.
12. Kong MG, Kroesen G, Morfill G, Nosenko T, Shimizu T, Van Dijk J, et al. Plasma medicine: an introductory review. *new Journal of Physics*. 2009;11(11):115012.
13. Fridman G, Brooks AD, Balasubramanian M, Fridman A, Gutsol A, Vasilets VN, et al. Comparison of direct and indirect effects of non-thermal atmospheric-pressure plasma on bacteria. *Plasma Processes and Polymers*. 2007;4(4):370-5.

14. Chen Z, Simonyan H, Cheng X, Gjika E, Lin L, Canady J, et al. A novel micro cold atmospheric plasma device for glioblastoma both in vitro and in vivo. *Cancers*. 2017;9(6):61.
15. Shimizu T, Steffes B, Pompl R, Jamitzky F, Bunk W, Ramrath K, et al. Characterization of microwave plasma torch for decontamination. *Plasma Processes and Polymers*. 2008;5(6):577-82.
16. Iwao T, Inaba T. Plasma length on characteristics of DC argon plasma torch arc. *Vacuum*. 2002;65(3-4):299-304.
17. Li Y-F, Zimmermann JL, Morfill GE. Optimizing the distance for bacterial treatment using surface micro-discharge plasma. *New Journal of Physics*. 2012;14(2):023058.
18. MacLaughlin JA, Anderson R, Holick MF. Spectral character of sunlight modulates photosynthesis of previtamin D3 and its photoisomers in human skin. *Science*. 1982;216(4549):1001-3.
19. D'Orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A, Scott T. UV radiation and the skin. *Int J Mol Sci*. 2013;14(6):12222-48.
20. Jurkiewicz BA, Buettner GR. Ultraviolet light-induced free radical formation in skin: an electron paramagnetic resonance study. *Photochemistry and Photobiology*. 1994;59(1):1-4.
21. International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection. Guidelines on limits of exposure to ultraviolet radiation of wavelengths between 180 nm and 400 nm (incoherent optical radiation). *Health Physics*. 2004;87(2):171-86.
22. Ja Kim S, Min Joh H, Chung T. Production of intracellular reactive oxygen species and change of cell viability induced by atmospheric pressure plasma in normal and cancer cells. *Applied Physics Letters*. 2013;103(15):153705.
23. Kalghatgi S, Kelly CM, Cerchar E, Torabi B, Alekseev O, Fridman A, et al. Effects of non-thermal plasma on mammalian cells. *PloS one*. 2011;6(1):e16270.
24. Thiyagarajan M, Anderson H, Gonzales XF. Induction of apoptosis in human myeloid leukemia cells by remote exposure of resistive barrier cold plasma. *Biotechnology and bioengineering*. 2014;111(3):565-74.
25. Yan D, Sherman JH, Keidar M. Cold atmospheric plasma, a novel promising anti-cancer treatment modality. *Oncotarget*. 2017;8(9):15977.
26. Han X, Klas M, Liu Y, Sharon Stack M, Ptasinska S. DNA damage in oral cancer cells induced by nitrogen atmospheric pressure plasma jets. *Applied Physics Letters*. 2013;102(23):233703.
27. Graves DB. The emerging role of reactive oxygen and nitrogen species in redox biology and some implications for plasma applications to medicine and biology. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2012;45(26):263001.
28. Harman E. Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Gerontology*. 1956;11:298-300.

29. Baldrige C, Gerard R. The extra respiration of phagocytosis. *Am J Physiol.* 1933;103(1):235-6.
30. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, et al. Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxidative medicine and cellular longevity.* 2017;2017.
31. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions.* 2007;35(5):1147-50.
32. Nishida N, Arizumi T, Takita M, Kitai S, Yada N, Hagiwara S, et al. Reactive oxygen species induce epigenetic instability through the formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in human hepatocarcinogenesis. *Digestive Diseases.* 2013;31(5-6):459-66.
33. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): a critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *Journal of environmental science and health Part C.* 2009;27(2):120-39.
34. Braný D, Dvorská D, Halašová E, Škovierová H. Cold Atmospheric Plasma: A Powerful Tool for Modern Medicine. *International Journal of Molecular Sciences.* 2020;21(8):2932.
35. Zimmermann J, Shimizu T, Schmidt H, Li Y, Morfill G, Isbary G. Test for bacterial resistance build-up against plasma treatment. *New Journal of Physics.* 2012;14(7):073037.
36. Schmidt A, Bekeschus S, Wende K, Vollmar B, von Woedtke T. A cold plasma jet accelerates wound healing in a murine model of full-thickness skin wounds. *Experimental dermatology.* 2017;26(2):156-62.
37. Keidar M, Shashurin A, Volotskova O, Ann Stepp M, Srinivasan P, Sandler A, et al. Cold atmospheric plasma in cancer therapy. *Physics of Plasmas.* 2013;20(5):057101.
38. Privat-Maldonado A, Bengtson C, Razzokov J, Smits E, Bogaerts A. Modifying the Tumour Microenvironment: Challenges and Future Perspectives for Anticancer Plasma Treatments. *Cancers.* 2019;11(12):1920.
39. Vandamme M, Robert E, Lerondel S, Sarron V, Ries D, Dozias S, et al. ROS implication in a new antitumor strategy based on non-thermal plasma. *International journal of cancer.* 2012;130(9):2185-94.
40. Ishaq M, Kumar S, Varinli H, Han ZJ, Rider AE, Evans MD, et al. Atmospheric gas plasma-induced ROS production activates TNF-ASK1 pathway for the induction of melanoma cancer cell apoptosis. *Molecular biology of the cell.* 2014;25(9):1523-31.
41. Liedtke KR, Diedrich S, Pati O, Freund E, Flieger R, Heidecke CD, et al. Cold physical plasma selectively elicits apoptosis in murine pancreatic cancer cells in vitro and in ovo. *Anticancer Research.* 2018;38(10):5655-63.
42. Ahn HJ, Kim KI, Kim G, Moon E, Yang SS, Lee J-S. Atmospheric-pressure plasma jet induces apoptosis involving mitochondria via generation of free radicals. *PloS one.* 2011;6(11):e28154.

43. Bauer G, Sersenová D, Graves DB, Machala Z. Cold atmospheric plasma and plasma-activated medium trigger RONS-based tumor cell apoptosis. *Scientific reports*. 2019;9(1):1-28.
44. 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. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2014;1843(12):2827-37.
45. Kim G, Kim W, Kim K, Lee J. DNA damage and mitochondria dysfunction in cell apoptosis induced by nonthermal air plasma. *Applied Physics Letters*. 2010;96(2):021502.
46. Chang JW, Kang SU, Shin YS, Kim KI, Seo SJ, Yang SS, et al. Non-thermal atmospheric pressure plasma induces apoptosis in oral cavity squamous cell carcinoma: Involvement of DNA-damage-triggering sub-G1 arrest via the ATM/p53 pathway. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2014;545:133-40.
47. Joerger AC, Fersht AR. Structural biology of the tumor suppressor p53. *Annu Rev Biochem*. 2008;77:557-82.
48. Arndt S, Wacker E, Li YF, Shimizu T, Thomas HM, Morfill GE, et al. Cold atmospheric plasma, a new strategy to induce senescence in melanoma cells. *Experimental dermatology*. 2013;22(4):284-9.
49. Volotskova O, Hawley TS, Stepp MA, Keidar M. Targeting the cancer cell cycle by cold atmospheric plasma. *Scientific reports*. 2012;2:636.
50. Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nature reviews Drug discovery*. 2009;8(7):579-91.
51. Bienert GP, Chaumont F. Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2014;1840(5):1596-604.
52. Papadopoulos MC, Saadoun S. Key roles of aquaporins in tumor biology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2015;1848(10):2576-83.
53. Yan D, Xiao H, Zhu W, Nourmohammadi N, Zhang LG, Bian K, et al. The role of aquaporins in the anti-glioblastoma capacity of the cold plasma-stimulated medium. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2017;50(5):055401.
54. Van der Paal J, Neyts EC, Verlackt CC, Bogaerts A. Effect of lipid peroxidation on membrane permeability of cancer and normal cells subjected to oxidative stress. *Chemical science*. 2016;7(1):489-98.
55. de Meyer F, Smit B. Effect of cholesterol on the structure of a phospholipid bilayer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(10):3654-8.
56. Yusupov M, Yan D, Cordeiro RM, Bogaerts A. Atomic scale simulation of H₂O₂ permeation through aquaporin: toward the understanding of plasma cancer treatment. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2018;51(12):125401.

57. Van der Paal J, Verheyen C, Neyts EC, Bogaerts A. Hampering Effect of Cholesterol on the Permeation of Reactive Oxygen Species through Phospholipids Bilayer: Possible Explanation for Plasma Cancer Selectivity. *Sci Rep.* 2017;7:39526.
58. Miller V, Lin A, Fridman AJPC, Processing P. Why Target Immune Cells for Plasma Treatment of Cancer. 2016;36(1):259-68.
59. Miller V, Lin A, Fridman G, Dobrynin D, Fridman A. Plasma stimulation of migration of macrophages. *Plasma Processes and Polymers.* 2014;11(12):1193-7.
60. Lin A, Truong B, Pappas A, Kirifides L, Oubarri A, Chen S, et al. Uniform Nanosecond Pulsed Dielectric Barrier Discharge Plasma Enhances Anti-Tumor Effects by Induction of Immunogenic Cell Death in Tumors and Stimulation of Macrophages. *Plasma Processes and Polymers.* 2015;12(12):1392-9.
61. Kaushik NK, Kaushik N, Min B, Choi KH, Hong YJ, Miller V, et al. Cytotoxic macrophage-released tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) as a killing mechanism for cancer cell death after cold plasma activation. *Journal of Physics D: Applied Physics.* 2016;49(8):084001.
62. Lee A, Lin A, Shah K, Singh H, Miller V, Gururaja Rao S. Optimization of non-thermal plasma treatment in an in vivo model organism. *PloS one.* 2016;11(8):e0160676.
63. Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P, Vandenabeele P. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer.* 2012;12(12):860-75.
64. Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, Zitvogel L. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annual review of immunology.* 2013;31:51-72.
65. Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Théry C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annual review of immunology.* 2002;20(1):621-67.
66. Olive PL, Vikse C, Trotter MJ. Measurement of oxygen diffusion distance in tumor cubes using a fluorescent hypoxia probe. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics.* 1992;22(3):397-402.
67. Augustin HG, Christian S. Angiogenese. *Die Onkologie: Springer;* 2010. p. 291-307.
68. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell.* 2011;144(5):646-74.
69. Liu L-Z, Hu X-W, Xia C, He J, Zhou Q, Shi X, et al. Reactive oxygen species regulate epidermal growth factor-induced vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor-1 α expression through activation of AKT and P70S6K1 in human ovarian cancer cells. *Free Radical Biology and Medicine.* 2006;41(10):1521-33.
70. Jo M, Nishikawa T, Nakajima T, Okada Y, Yamaguchi K, Mitsuyoshi H, et al. Oxidative stress is closely associated with tumor angiogenesis of hepatocellular carcinoma. *Journal of gastroenterology.* 2011;46(6):809-21.

71. Skinner HD, Zheng JZ, Fang J, Agani F, Jiang B-H. Vascular endothelial growth factor transcriptional activation is mediated by hypoxia-inducible factor 1 α , HDM2, and p70S6K1 in response to phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(44):45643-51.
72. Chandel N, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu C, Simon M, Schumacker P. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(20):11715-20.
73. Bekeschus S, Rödder K, Fregin B, Otto O, Lippert M, Weltmann K-D, et al. Toxicity and immunogenicity in murine melanoma following exposure to physical plasma-derived oxidants. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2017;2017:4396467.
74. Zhu W, Lee S-J, Castro NJ, Yan D, Keidar M, Zhang LG. Synergistic effect of cold atmospheric plasma and drug loaded core-shell nanoparticles on inhibiting breast cancer cell growth. *Scientific reports*. 2016;6:21974.
75. Gweon B, Kim H, Kim K, Kim M, Shim E, Kim S, et al. Suppression of angiogenesis by atmospheric pressure plasma in human aortic endothelial cells. *Applied Physics Letters*. 2014;104(13):133701.
76. Haralambiev L, Neuffer O, Nitsch A, Kross NC, Bekeschus S, Hinz P, et al. Inhibition of Angiogenesis by Treatment with Cold Atmospheric Plasma as a Promising Therapeutic Approach in Oncology. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(19):7098.
77. Mirpour S, Piroozmand S, Soleimani N, Faharani NJ, Ghomi H, Eskandari HF, et al. Utilizing the micron sized non-thermal atmospheric pressure plasma inside the animal body for the tumor treatment application. *Scientific reports*. 2016;6:29048.
78. Vandamme M, Robert E, Dozias S, Sobilo J, Lerondel S, Le Pape A, et al. Response of human glioma U87 xenografted on mice to non thermal plasma treatment. *Plasma medicine*. 2011;1(1):27–43.
79. Partecke LI, Evert K, Haugk J, Doering F, Normann L, Diedrich S, et al. Tissue tolerable plasma (TTP) induces apoptosis in pancreatic cancer cells in vitro and in vivo. *BMC cancer*. 2012;12(1):473.
80. Szili EJ, Hong S-H, Oh J-S, Gaur N, Short RD. Tracking the penetration of plasma reactive species in tissue models. *Trends in biotechnology*. 2018;36(6):594-602.
81. Kawasaki T, Sato A, Kusumegi S, Kudo A, Sakanoshita T, Tsurumaru T, et al. Two-dimensional concentration distribution of reactive oxygen species transported through a tissue phantom by atmospheric-pressure plasma-jet irradiation. *Applied Physics Express*. 2016;9(7):076202.
82. He T, Liu D, Xu H, Xu D, Li D, Li Q, et al. A 'tissue model' to study the barrier effects of living tissues on the reactive species generated by surface air discharge. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2016;49(20):205204.

83. Utsumi F, Kajiyama H, Nakamura K, Tanaka H, Mizuno M, Ishikawa K, et al. 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(12):e81576.
84. Takeda S, Yamada S, Hattori N, Nakamura K, Tanaka H, Kajiyama H, et al. Intraperitoneal administration of plasma-activated medium: proposal of a novel treatment option for peritoneal metastasis from gastric cancer. *Annals of surgical oncology*. 2017;24(5):1188-94.
85. Yan D, Sherman JH, Cheng X, Ratovitski E, Canady J, Keidar M. Controlling plasma stimulated media in cancer treatment application. *Applied Physics Letters*. 2014;105(22):224101.
86. Mak IW, Evaniew N, Ghert M. Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. *American journal of translational research*. 2014;6(2):114.
87. Hutchinson L, Kirk R. High drug attrition rates—where are we going wrong? *Nature reviews Clinical oncology*. 2011;8(4):189-90.
88. Sant S, Johnston PA. The production of 3D tumor spheroids for cancer drug discovery. *Drug Discovery Today: Technologies*. 2017;23:27-36.
89. Konerding M, Malkusch W, Klapthor B, Van Ackern C, Fait E, Hill S, et al. Evidence for characteristic vascular patterns in solid tumours: quantitative studies using corrosion casts. *British journal of cancer*. 1999;80(5):724-32.
90. Mangir N, Raza A, Haycock JW, Chapple C, Macneil S. An Improved In Vivo Methodology to Visualise Tumour Induced Changes in Vasculature Using the Chick Chorionic Allantoic Membrane Assay. In vivo (Athens, Greece). 2018;32(3):461-72.
91. Minchinton AI, Tannock IF. Drug penetration in solid tumours. *Nature Reviews Cancer*. 2006;6(8):583-92.
92. Roberts WP, GE. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci*. 1995;108:2369-79.
93. Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, McLean JW, Thurston G, Roberge S, et al. Openings between Defective Endothelial Cells Explain Tumor Vessel Leakiness. *The American Journal of Pathology*. 2000;156(4):1363-80.
94. Heldin C-H, Rubin K, Pietras K, Östman A. High interstitial fluid pressure—an obstacle in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. 2004;4(10):806-13.
95. Baronzio G, Parmar G, Baronzio M. Overview of methods for overcoming hindrance to drug delivery to tumors, with special attention to tumor interstitial fluid. *Frontiers in oncology*. 2015;5:165.
96. Horsman MR, Vaupel P. Pathophysiological basis for the formation of the tumor microenvironment. *Frontiers in oncology*. 2016;6:66.
97. Langhans SA. Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. *Frontiers in pharmacology*. 2018;9:6.

98. Breslin S, O'Driscoll L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug discovery today*. 2013;18(5-6):240-9.
99. Richmond A, Su Y. *Mouse xenograft models vs GEM models for human cancer therapeutics*. The Company of Biologists Ltd; 2008.
100. Fichtner I. Präklinische Daten als Grundlage für die Konzeption klinischer Studien. *Oncology Research and Treatment*. 2008;31(Suppl. 2):34-8.
101. Hidalgo M, Amant F, Biankin AV, Budinská E, Byrne AT, Caldas C, et al. Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. *Cancer discovery*. 2014;4(9):998-1013.
102. Hanahan D, Wagner EF, Palmiter RD. The origins of oncomice: a history of the first transgenic mice genetically engineered to develop cancer. *Genes & development*. 2007;21(18):2258-70.
103. Finlay CA. What the papers say: p53 loss of function: implications for the processes of immortalization and tumorigenesis. *Bioessays*. 1992;14(8):557-60.
104. Kersten K, de Visser KE, van Miltenburg MH, Jonkers J. Genetically engineered mouse models in oncology research and cancer medicine. *EMBO molecular medicine*. 2017;9(2):137-53.
105. Jonkers J, Berns A. Conditional mouse models of sporadic cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2002;2(4):251-65.
106. Russell WMS, Burch RL. *The principles of humane experimental technique*: Methuen; 1959.
107. Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere, (2010).
108. Gerlach L. Über neue Methoden auf dem Gebiet der experimentellen Embryologie. *Anat Anz*. 1887;2:538-609.
109. Goertler K. The "teratological basic experiment" on the incubated chick embryo, its possibilities and limitations. *Klinische Wochenschrift*. 1962;40:809.
110. Luepke N. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food and Chemical Toxicology*. 1985;23(2):287-91.
111. Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. *Mech Dev*. 2016;141:70-7.
112. Eckrich J, Kugler P, Buhr CR, Ernst BP, Mendler S, Baumgart J, et al. Monitoring of tumor growth and vascularization with repetitive ultrasonography in the chicken chorioallantoic-membrane-assay. *Scientific Reports*. 2020;10(1):18585.
113. Fasenko G. Egg storage and the embryo. *Poultry science*. 2007;86(5):1020-4.
114. Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Developmental dynamics*. 1992;195(4):231-72.

115. Funk E, Biellier HV. The minimum temperature for embryonic development in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Poultry Science*. 1944;23(6):538-40.
116. Bellairs R, Osmond M. Atlas of chick development. London, UK: Elsevier; 2005.
117. Burton FG, Tullett S. Respiration of avian embryos. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. 1985;82(4):735-44.
118. Bellairs R, Osmond M. Chapter 13 - Extra-Embryonic Membranes. In: Bellairs R, Osmond M, editors. *Atlas of Chick Development (Third Edition)*. Boston: Academic Press; 2014. p. 127-9.
119. Makanya AN, Dimova I, Koller T, Styp-Rekowska B, Djonov V. Dynamics of the developing chick chorioallantoic membrane assessed by stereology, allometry, immunohistochemistry and molecular analysis. *PLoS One*. 2016;11(4):e0152821.
120. Leeson T, Leeson C. The chorio-allantois of the chick. Light and electron microscopic observations at various times of incubation. *Journal of anatomy*. 1963;97(Pt 4):585.
121. Murphy JB, Rous P. The behavior of chicken sarcoma implanted in the developing embryo. *The Journal of experimental medicine*. 1912;15(2):119-32.
122. Murphy JB. Transplantability of tissues to the embryo of foreign species: its bearing on questions of tissue specificity and tumor immunity. *The Journal of experimental medicine*. 1913;17(4):482-93.
123. Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for tumor biology. *Exp Cell Res*. 2014;328(2):314-24.
124. Janse EM, Jeurissen SH. Ontogeny and function of two non-lymphoid cell populations in the chicken embryo. *Immunobiology*. 1991;182(5):472-81.
125. Janković B, Isaković K, Lukić M, Vujanović N, Petrović S, Marković B. Immunological capacity of the chicken embryo. I. Relationship between the maturation of lymphoid tissues and the occurrence of cell-mediated immunity in the developing chicken embryo. *Immunology*. 1975;29(3):497.
126. Ribatti D. *The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane in the Study of Angiogenesis and Metastasis: The CAM assay in the study of angiogenesis and metastasis*: Springer Science & Business Media; 2010.
127. DeBord LC, Pathak RR, Villaneuva M, Liu H-C, Harrington DA, Yu W, et al. The chick chorioallantoic membrane (CAM) as a versatile patient-derived xenograft (PDX) platform for precision medicine and preclinical research. *American journal of cancer research*. 2018;8(8):1642.
128. Knighton D, Ausprunk D, Tapper D, Folkman J. Avascular and vascular phases of tumour growth in the chick embryo. *British journal of cancer*. 1977;35(3):347-56.
129. Hagedorn M, Javerzat S, Gilges D, Meyre A, de Lafarge B, Eichmann A, et al. Accessing key steps of human tumor progression in vivo by using an avian embryo model. *Proceedings of the national academy of sciences*. 2005;102(5):1643-8.

130. Deryugina EI. Chorioallantoic membrane microtumor model to study the mechanisms of tumor angiogenesis, vascular permeability, and tumor cell intravasation. *Angiogenesis protocols*: Springer; 2016. p. 283-98.
131. Lugassy C, Barnhill RL. Angiotropic melanoma and extravascular migratory metastasis: a review. *Advances in anatomic pathology*. 2007;14(3):195-201.
132. Koop S, Khokha R, Schmidt EE, MacDonald IC, Morris VL, Chambers AF, et al. Overexpression of metalloproteinase inhibitor in B16F10 cells does not affect extravasation but reduces tumor growth. *Cancer Research*. 1994;54(17):4791-7.
133. Shioda T, Munn LL, Fenner MH, Jain RK, Isselbacher KJ. Early events of metastasis in the microcirculation involve changes in gene expression of cancer cells. Tracking mRNA levels of metastasizing cancer cells in the chick embryo chorioallantoic membrane. *The American journal of pathology*. 1997;150(6):2099.
134. Deryugina EI, Quigley JP. Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cell metastasis. *Histochemistry and cell biology*. 2008;130(6):1119-30.
135. Bekeschus S, Schmidt A, Weltmann K-D, von Woedtke T. The plasma jet kINPen–A powerful tool for wound healing. *Clinical Plasma Medicine*. 2016;4(1):19-28.
136. Kluge S, Bekeschus S, Bender C, Benkhai H, Sckell A, Below H, et al. Investigating the Mutagenicity of a Cold Argon-Plasma Jet in an HET-MN Model. *PLoS One*. 2016;11(9):e0160667.
137. Bender C, Matthes R, Kindel E, Kramer A, Lademann J, Weltmann K-D, et al. The Irritation Potential of Nonthermal Atmospheric Pressure Plasma in the HET-CAM. *Plasma Processes and Polymers*. 2010;7(3-4):318-26.
138. Bender C, Partecke LI, Kindel E, Doring F, Lademann J, Heidecke CD, et al. The modified HET-CAM as a model for the assessment of the inflammatory response to tissue tolerable plasma. *Toxicol In Vitro*. 2011;25(2):530-7.
139. Maisch T, Shimizu T, Li Y-F, Heinlin J, Karrer S, Morfill G, et al. Decolonisation of MRSA, *S. aureus* and *E. coli* by cold-atmospheric plasma using a porcine skin model in vitro. *PloS one*. 2012;7(4):e34610.
140. Welz C, Becker S, Li Y-F, Shimizu T, Jeon J, Schwenk-Zieger S, et al. Effects of cold atmospheric plasma on mucosal tissue culture. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2013;46(4).
141. Welz C, Emmert S, Canis M, Becker S, Baumeister P, Shimizu T, et al. Cold Atmospheric Plasma: A Promising Complementary Therapy for Squamous Head and Neck Cancer. *PLoS One*. 2015;10(11):e0141827.
142. Boxhammer V, Li Y, Köritzer J, Shimizu T, Maisch T, Thomas H, et al. Investigation of the mutagenic potential of cold atmospheric plasma at bactericidal dosages. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2013;753(1):23-8.

143. Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J. Growth of human hepatoma cell lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer research*. 1982;42(9):3858-63.
144. Nakabayashi H, Taketa K, Yamane T, Oda M, Sato J. Hormonal control of α -fetoprotein secretion in human hepatoma cell lines proliferating in chemically defined medium. *Cancer research*. 1985;45(12 Part 1):6379-83.
145. Kasai F, Hirayama N, Ozawa M, Satoh M, Kohara A. HuH-7 reference genome profile: complex karyotype composed of massive loss of heterozygosity. *Human cell*. 2018;31(3):261-7.
146. Kaino M. Alterations in the tumor suppressor genes p53, RB, p16/MTS1, and p15/MTS2 in human pancreatic cancer and hepatoma cell lines. *Journal of gastroenterology*. 1997;32(1):40-6.
147. Li M, Pathak RR, Lopez-Rivera E, Friedman SL, Aguirre-Ghiso JA, Sikora AG. The in ovo chick chorioallantoic membrane (CAM) assay as an efficient xenograft model of hepatocellular carcinoma. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2015(104):e52411.
148. Smolková B, Lunova M, Lynnyk A, Uzhytchak M, Churpita O, Jirsa M, et al. Non-thermal plasma, as a new physicochemical source, to induce redox imbalance and subsequent cell death in liver cancer cell lines. *Cell Physiol Biochem*. 2019;52:119-40.
149. Kleinman HK, Martin GR. Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Seminars in cancer biology*. 2005;15(5):378-86.
150. Preibisch S, Saalfeld S, Tomancak P. Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions. *Bioinformatics*. 2009;25(11):1463-5.
151. Heimes D, Wiesmann N, Eckrich J, Brieger J, Mattyasovszky S, Proff P, et al. In Vivo Modulation of Angiogenesis and Immune Response on a Collagen Matrix via Extracorporeal Shockwaves. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(20):7574.
152. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nature protocols*. 2008;3(6):1101.
153. Egawa G, Nakamizo S, Natsuaki Y, Doi H, Miyachi Y, Kabashima K. Intravital analysis of vascular permeability in mice using two-photon microscopy. *Scientific reports*. 2013;3:1932.
154. Schober P, Boer C, Schwarte LA. Correlation coefficients: appropriate use and interpretation. *Anesthesia & Analgesia*. 2018;126(5):1763-8.
155. Kugler P, Becker S, Welz C, Wiesmann N, Sax J, Buhr CR, et al. Cold Atmospheric Plasma Reduces Vessel Density and Increases Vascular Permeability and Apoptotic Cell Death in Solid Tumors. *Cancers*. 2022;14(10):2432.
156. Surai PF. Tissue-specific changes in the activities of antioxidant enzymes during the development of the chicken embryo. *British Poultry Science*. 1999;40(3):397-405.

157. Wenzel T, Carvajal Berrio DA, Daum R, Reisenauer C, Weltmann K-D, Wallwiener D, et al. Molecular Effects and Tissue Penetration Depth of Physical Plasma in Human Mucosa Analyzed by Contact-and Marker-Independent Raman Microspectroscopy. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2019;11(46):42885-95.
158. Zhou X, Cai D, Xiao S, Ning M, Zhou R, Zhang S, et al. InvivoPen: A novel plasma source for in vivo cancer treatment. *Journal of Cancer*. 2020;11(8):2273.
159. Lin L, Wang L, Liu Y, Xu C, Tu Y, Zhou J. Non-thermal plasma inhibits tumor growth and proliferation and enhances the sensitivity to radiation in vitro and in vivo. *Oncology reports*. 2018;40(6):3405-15.
160. Vozenin MC, Hendry JH, Limoli CL. Biological Benefits of Ultra-high Dose Rate FLASH Radiotherapy: Sleeping Beauty Awoken. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2019;31(7):407-15.
161. Fridman G, Peddinghaus M, Balasubramanian M, Ayan H, Fridman A, Gutsol A, et al. Blood Coagulation and Living Tissue Sterilization by Floating-Electrode Dielectric Barrier Discharge in Air. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*. 2006;26(4):425-42.
162. Duchesne C, Banzet S, Lataillade JJ, Rousseau A, Frescaline N. Cold atmospheric plasma modulates endothelial nitric oxide synthase signalling and enhances burn wound neovascularisation. *The Journal of pathology*. 2019;249(3):368-80.
163. Stoffels E, Roks AJ, Deelman LE. Delayed effects of cold atmospheric plasma on vascular cells. *Plasma Processes and Polymers*. 2008;5(6):599-605.
164. Haralambiev L, Nitsch A, Jacoby JM, Strakeljahn S, Bekeschus S, Mustea A, et al. Cold Atmospheric Plasma Treatment of Chondrosarcoma Cells Affects Proliferation and Cell Membrane Permeability. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(7):2291.
165. Haralambiev L, Wien L, Gelbrich N, Kramer A, Mustea A, Burchardt M, et al. Effects of Cold Atmospheric Plasma on the Expression of Chemokines, Growth Factors, TNF Superfamily Members, Interleukins, and Cytokines in Human Osteosarcoma Cells. *Anticancer Research*. 2019;39(1):151.
166. Park SA, Jeong S, Choe YH, Hyun Y-M. Sensing of Vascular Permeability in Inflamed Vessel of Live Animal. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 2018;2018:5797152.
167. Fukumura D, Jain RK. Role of nitric oxide in angiogenesis and microcirculation in tumors. *Cancer and Metastasis Reviews*. 1998;17(1):77-89.
168. Sharma JN, Al-Omran A, Parvathy SS. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology*. 2007;15(6):252-9.
169. Sasaki S, Kanzaki M, Hokari Y, Tominami K, Mokudai T, Kanetaka H, et al. Roles of charged particles and reactive species on cell membrane permeabilization induced by atmospheric-pressure plasma irradiation. *Japanese Journal of Applied Physics*. 2016;55(7S2):07LG4.

170. Li W, Yu H, Ding D, Chen Z, Wang Y, Wang S, et al. Cold atmospheric plasma and iron oxide-based magnetic nanoparticles for synergetic lung cancer therapy. *Free Radical Biology and Medicine*. 2019;130:71-81.
171. Cheng X, Murphy W, Recek N, Yan D, Cvelbar U, Vesel A, et al. Synergistic effect of gold nanoparticles and cold plasma on glioblastoma cancer therapy. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2014;47(33):335402.
172. 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. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(22):12252.
173. Soni V, Adhikari M, Simonyan H, Lin L, Sherman JH, Young CN, et al. In Vitro and In Vivo Enhancement of Temozolomide Effect in Human Glioblastoma by Non-Invasive Application of Cold Atmospheric Plasma. *Cancers*. 2021;13(17):4485.
174. Manaloto E, Gowen A, Lesniak A, He Z, Casey A, Cullen PJ, et al. Cold Atmospheric Plasma induces silver nanoparticle uptake, oxidative dissolution and enhanced cytotoxicity in Glioblastoma multiforme cells. *Arch Biochem Biophys*. 2020;689:108462.
175. Maeda H. Vascular permeability in cancer and infection as related to macromolecular drug delivery, with emphasis on the EPR effect for tumor-selective drug targeting. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*. 2012;88(3):53-71.
176. Zhou W, Fong MY, Min Y, Somlo G, Liu L, Palomares MR, et al. Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis. *Cancer cell*. 2014;25(4):501-15.
177. Dai X, Bazaka K, Thompson EW, Ostrikov K. Cold Atmospheric Plasma: A Promising Controller of Cancer Cell States. *Cancers*. 2020;12(11):3360.
178. Schmidt A, Bekeschus S, von Woedtke T, Hasse S. Cell migration and adhesion of a human melanoma cell line is decreased by cold plasma treatment. *Clinical Plasma Medicine*. 2015;3(1):24-31.
179. Li W, Yu KN, Bao L, Shen J, Cheng C, Han W. Non-thermal plasma inhibits human cervical cancer HeLa cells invasiveness by suppressing the MAPK pathway and decreasing matrix metalloproteinase-9 expression. *Scientific Reports*. 2016;6(1):19720.
180. Kalghatgi SU, Fridman G, Cooper M, Nagaraj G, Peddinghaus M, Balasubramanian M, et al. Mechanism of Blood Coagulation by Nonthermal Atmospheric Pressure Dielectric Barrier Discharge Plasma. *IEEE Transactions on Plasma Science*. 2007;35(5):1559-66.
181. Ke Z, Huang Q. Haem-assisted dityrosine-cross-linking of fibrinogen under non-thermal plasma exposure: one important mechanism of facilitated blood coagulation. *Scientific reports*. 2016;6:26982.

182. Perez-Vizcaino F, Cogolludo A, Moreno L. Reactive oxygen species signaling in pulmonary vascular smooth muscle. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. 2010;174(3):212-20.
183. Peng Q, Nesland JM. Effects of Photodynamic Therapy on Tumor Stroma. *Ultrastructural Pathology*. 2004;28(5-6):333-40.
184. Krammer B. Vascular effects of photodynamic therapy. *Anticancer research*. 2001;21(6B):4271.
185. Debeve E, Pegaz B, van den Bergh H, Wagnières G, Lange N, Ballini JP. Video monitoring of neovessel occlusion induced by photodynamic therapy with verteporfin (Visudyne), in the CAM model. *Angiogenesis*. 2008;11(3):235-43.

Danksagung

Es kommt mir fast wie gestern vor, als ich zum ersten Mal das Labor der HNO-Klinik in Mainz betrat, gespannt was mich erwarten würde auf der langen Reise Richtung Promotion. Damals war kaum vorstellbar, dass dieses Projekt einmal zu Ende geht. Rückblickend zeigt sich, dass neben einer Menge Arbeit und Ausdauer vor allem die richtigen Menschen an meiner Seite den erfolgreichen Abschluss dieses Projekts erst möglich gemacht haben. Ich hatte das große Glück immer von wunderbaren Menschen umgeben zu sein, die mich auf diesem Weg begleitet und unterstützt haben.

Besonders bedanken möchte ich mich bei [REDACTED] für die herausragende Betreuung in allen Lebenslagen. Ohne deine tatkräftige Unterstützung wäre diese Arbeit sicherlich nicht in dieser Form möglich gewesen. Ich danke dir für all die wissenschaftlichen, aber auch persönlichen Gespräche und dein offenes Ohr bei allen meinen Fragen.

Gleichermaßen gilt mein großer Dank meinem Doktorvater [REDACTED], der mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und von dessen jahrelange Erfahrung ich ungemein profitieren durfte. Ich bin sehr dankbar, dass ich mit meiner Arbeit Teil der AG Brieger sein konnte. Deine guten Ratschläge haben mir im Laufe meiner Promotion immer wieder weitergeholfen und so manche Tür geöffnet.

Ein herzliches Dankeschön geht an das gesamte Team der AG Brieger im HNO-Labor der Universitätsmedizin Mainz. Insbesondere danke ich [REDACTED], die immer für Fragen, spontane Problemlösung oder auch ein nettes Gespräch zur Verfügung stand. Ebenso danke ich [REDACTED] für ihre Einarbeitung, Unterstützung und Anleitung beim Arbeiten an der Zellkultur und dem CAM-Modell. Ganz besonders danke ich [REDACTED] für ihre tagelange und unermüdliche Arbeit beim Schneiden und Färben der histologischen Präparate für diese Arbeit.

Mein Dank gilt auch den Mitpromovierenden im Labor der HNO-Klinik: [REDACTED], [REDACTED] und [REDACTED]. Gemeinsam haben wir so manche Durststrecke überstanden, uns gegenseitig unterstützt und immer wieder motiviert.

Des Weiteren danke ich [REDACTED] für die Initiierung des CAP-Projekts im Labor der HNO-Klinik und die Überlassung des Plasmageräts sowie [REDACTED] für die schnelle und professionelle Reparatur und Beratung.

Zuletzt möchte ich den größten Dank meiner Familie und meinen Freunden aussprechen. Ohne eure Unterstützung, euer Zuhören, Mitfühlen und Mitfiebern wären mein Studium und letztlich auch die Promotion niemals möglich gewesen. Ich danke euch von Herzen.

Tabellarischer Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name Kugler
Vorname Philipp

BILDUNG

06/2022 **Approbation als Arzt**
Studium der Humanmedizin
04/2016 – 06/2022 Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
10/2015 – 03/2016 Otto-von-Guericke Universität, Magdeburg
10/2013 – 09/2015 **Studium der Veterinärmedizin**
Justus-Liebig-Universität, Gießen, mit Physikum 09/2015
07/2012 **Allg. Hochschulreife**
Albertus-Magnus-Gymnasium, Stuttgart

BERUFSERFAHRUNG

Arzt in Weiterbildung

seit 12/2022 Klinik für Anästhesiologie, Intensiv- und Schmerzmedizin,
BG Klinikum Unfallkrankenhaus Berlin

Praktisches Jahr in den Fachbereichen

12/2021 – 04/2022 Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum Bonn
09/2021 – 12/2021 Allgemein- & Viszeralchirurgie, Unfallchirurgie, Charité Campus
Virchow-Klinikum, Berlin
05/2021 – 09/2021 Innere Medizin, Zuger Kantonsspital, Baar, Schweiz

Famulaturen in den Fachbereichen

- 02/2020 – 03/2020 Innere Medizin, Eduardus-Krankenhaus, Köln
- 08/2019 – 09/2019 Allgemeinmedizin, Praxis Dr. Fiering, Winnenden
- 09/2018 – 10/2018 Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Poliklinik der
Universitätsmedizin Mainz
- 02/2018 – 03/2018 Anästhesie, Intensiv- und Notfallmedizin, Rems-Murr-
Klinikum Winnenden

Studienbegleitende Tätigkeiten

- 07/2020 – 03/2021 Studentische Nachtwache in der Notübernachtung,
Drogenhilfzentrum Café Balance der Stadt Mainz
- 04/2017 – 02/2018 Wissenschaftliche Hilfskraft, Präparierkurs für Human- und
Zahnmedizinstudierende, Universität Mainz

WISSENSCHAFTLICHE ARBEIT

12/2020 – 05/2021 **Promotionsstipendium**
im Rahmen des Mainz-DOC-Promotionskollegs der Mainz
Research School of Translational Biomedicine

seit 08/2019 **Promotion**
Labor der Hals-, Nasen-, Ohren- und Poliklinik der
Universitätsmedizin Mainz, wissenschaftliche Betreuung:
[REDACTED] und [REDACTED]

Publikationen

- 05/2022 Kugler P, Becker S, Welz C, et al. Cold Atmospheric Plasma Reduces Vessel Density and Increases Vascular Permeability and Apoptotic Cell Death in Solid Tumors. Cancers. DOI: 10.3390/cancers14102432
- 10/2020 Eckrich J, Kugler P, Buhr CR, et al. Monitoring of tumor growth and vascularization with repetitive ultrasonography in the chicken chorioallantoic-membrane-assay. Scientific Reports. DOI: 10.1038/s41598-020-75660-y