

Aus dem
Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie
der Universitätsmedizin Rostock
Direktorin: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

In vivo Charakterisierung der antitumorigenen Effizienz von kaltem
Atmosphärendruckplasma und small molecules am Modell des menschlichen
Hautkrebses

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizinwissenschaften (Dr. rer. hum.)
der
Universitätsmedizin Rostock

Betreuung: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

Einrichtung: Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie

Vorgelegt von

Marcel Kordt | Geb. am 01.05.1987 in Lutherstadt Wittenberg
aus Rostock

Rostock | 28.11.2022

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00004440



Dieses Werk ist lizenziert unter einer
Creative Commons Namensnennung - Nicht kommerziell - Keine Bearbeitungen
4.0 International Lizenz.

Gutachter:

Prof. Dr. Brigitte Vollmar, Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie, Universitätsmedizin Rostock

Prof. Dr. Barbara Nebe, Institut für Zellbiologie, Universitätsmedizin Rostock

Dr. Dr. Katharina Boch, Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein

Jahr der Einreichung: 2022

Jahr der Verteidigung: 2023



Die Promotion wurde im Rahmen des Forschungsprojektes ONKOTHER-H angefertigt und durch Mittel des Europäischen Sozialfonds (ESF) finanziert (ESF/14-BM-A55-0003/18). Die vorliegende Arbeit ist Bestandteil des Qualifikationsprogrammes „Förderung von Nachwuchswissenschaftlern in exzellenten Forschungsverbänden - Exzellenzforschungsprogramm des Landes Mecklenburg-Vorpommern“.

Für Mich

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis.....	1
2	Zusammenfassung	4
3	Abstract.....	6
4	Einleitung	7
4.1	Hautkrebs	7
4.1.1	Einteilung und Epidemiologie.....	7
4.1.2	Pathogenese	9
4.1.3	Diagnostik und Therapie.....	10
4.2	Kaltes Atmosphärendruckplasma (KAP).....	12
4.3	Small molecules.....	14
5	Ziel.....	16
6	Material und Methoden	17
6.1	Subkutanes Mausmodell.....	17
6.1.1	Zelllinien	17
6.1.2	Versuchstiere.....	18
6.1.3	Subkutane Tumorzellinjektion	19
6.2	Therapie der subkutanen Flankentumoren	20
6.2.1	Therapie mit KAP und Chemilumineszenz Analyse reaktiver Spezies.....	20
6.2.2	Therapie mit small molecules.....	22
6.3	Methoden zur Erfassung des Tumorwachstums und -metabolismus.....	23
6.3.1	Caliper.....	23
6.3.2	Magnetresonanztomographie.....	23
6.3.3	Positronen-Emissions- und Computer-Tomographie.....	24
6.4	<i>Ex vivo</i> Analysen	26
6.4.1	Blutbild	26
6.4.2	Multiplex-Zytokinanalyse	26
6.4.3	Histologie und Immunhistochemie	27
6.4.4	Molekularbiologie	28
6.5	Versuchsablauf	29
6.5.1	Therapie mit KAP	29
6.5.2	Therapie von Langzeit KAP stimulierten Zellen.....	30
6.5.3	Therapie mit small molecules mit und ohne KAP.....	31

Inhaltsverzeichnis

6.6	Statistische Auswertung.....	33
7	Ergebnisse	34
7.1	Auswahl der Tumorzelllinien	34
7.2	Auswirkung von KAP auf das Tumorwachstum und den -metabolismus.....	38
7.3	Auswirkung von KAP auf die Tumorbiologie	43
7.4	Auswirkung von KAP auf Langzeit KAP stimulierte Tumorzellen	46
7.5	Auswirkung von small molecules und KAP auf das Tumorwachstum	48
7.6	Auswirkung von small molecules und KAP auf Blutbild und Tumorbiologie.....	50
8	Diskussion	52
8.1	Material und Methoden	52
8.2	Ergebnisse	56
8.3	Ausblick und potentielle klinische Anwendungsfelder	64
9	Literaturverzeichnis	66
10	Tabellenverzeichnis.....	82
11	Abbildungsverzeichnis	83
12	Eidesstattliche Erklärung.....	84
13	Wissenschaftlicher Lebenslauf.....	85
14	Danksagung.....	87
15	Anhang	88
15.1	Abbildungen	88

1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
[¹⁸ F]FDG	2-[¹⁸ F]fluoro-2-deoxy-D-glucose
3D-OSEM/OP-MAP	Ordered Subsets Expectation Maximization Algorithmus
ADC	scheinbarer Diffusionskoeffizient
AK	Antikörper
ANOVA	Varianzanalyse
AP	alkalischer Phosphatase
BCC	Basalzellkarzinom
CAE	Chloracetat-Esterase
CAP	cold atmospheric pressure plasma
CL	Chemilumineszenz
CT	Computertomographie
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's serum
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Solution
DWI	diffusionsgewichtete Bildgebung
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
ERY	Erythrozyt
ET	echo time
FCS	fetales Kälberserum
FoV	field of view
GFR	Growth Factor Reduced
H&E	Hämatoxylin- und Eosinfärbung
HB	Hämoglobin
HC	High Concentration
HK	Hämatokrit
HPV	Humanes Papillomvirus
HRP	Meerrettichperoxidase
i.p.	intraperitoneal
IL	Interleukin

Abkürzungsverzeichnis

Il2rg	Interleukin 2-Rezeptor Gamma-Kette
INF γ	Interferon- γ
KAP	kaltes Atmosphärendruckplasma
L-012	8-Amino-5-chlor-7-phenyl-pyrido [3,4-d] pyridazine-1,4(2H,3H)dione
LEU	Leukozyt
LsgM	Lösungsmittel
MM	malignes Melanom
MRT	Magnetresonanztomographie
MTV	metabolisches Tumervolumen
MW	Mittelwert
N ₂	flüssiger Stickstoff
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NSG	NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ
ozN	ohne zentrale Nekrose
PAF	Plasma aktivierte Flüssigkeiten
PEK	Plattenepithelkarzinom
PET	Positronenemissionstomographie
RNS	reaktive Stickstoffspezies
ROI	Region of Interest
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RS	reaktive Spezies
s.c.	subkutan
SCC	squamous cell carcinoma
Scid	schwerer kombinierter Immundefekt
SD	Standardabweichung
SE	SpinEcho
slm	Standard-Liter pro Minute
SUV _{max}	maximale standardisierte Uptake-Wert
TE	Echozeit
THRO	Thrombozyt
TierSchG	Tierschutzgesetz
TNF α	Tumornekrosefaktor-alpha

Abkürzungsverzeichnis

TR	Wiederholungszeit
TR	repetition time
UV	Ultraviolett
VOI	Volume of Interest
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WPB	wiederholt Plasma behandelt
WT	Wildtyp

2 Zusammenfassung

Tumorerkrankungen stellen nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Krankheitslast weltweit dar. Unter den verschiedenen Krebsarten, die beim Menschen auftreten, ist Hautkrebs eine der häufigsten Krebsentitäten weltweit. Auf der Grundlage der entarteten Zelllinie kann Hautkrebs im Allgemeinen in die folgenden zwei Hauptgruppen unterteilt werden: epithelialer Hautkrebs und malignes Melanom (MM). Zu den Hautkrebsarten, die aus der epithelialen Linie entstehen, gehören das Basalzellkarzinom (BCC) und das Plattenepithelkarzinom (PEK). Kaltes Atmosphärendruckplasma (KAP) ist eine der vielversprechendsten und neuartigsten Behandlungsmethoden der letzten Jahrzehnte gegen Krebs, insbesondere Hautkrebs. Mehrere Studien an Dutzenden von Krebszelllinien haben eine signifikante antikanzerogene Wirkung und das therapeutische Potenzial durch die Behandlung mit KAP gezeigt. Ebenfalls hat in den letzten Jahren die Bedeutung von small molecules bei einer zielgerichteten Therapie gegen Krebs zugenommen. In der vorliegenden Dissertationsschrift wurden die Auswirkungen von KAP auf PEK und MM *in vivo* untersucht, wobei ein umfassender Ansatz mit multimodalen Bildgebungsverfahren verfolgt wurde. Es wurden longitudinale MRT und PET/CT Untersuchungen durchgeführt, um das anatomische und metabolische Tumorumfängen zu bestimmen. Zusätzlich wurde die Bildung reaktiver Spezies nach der KAP Behandlung durch nicht invasive Chemilumineszenz Bildgebung von L-012 bewertet. Es wurden histologische Analysen und immunhistochemische Färbungen sowie Proteinexpressionsprofile erhoben, um Proliferation, Apoptose, Entzündung und Angiogenese in KAP-behandelten Tumoren zu untersuchen. Zudem wurde im *in vivo* Xenograft Modell untersucht, ob eine wiederholte Behandlung von Tumoren mit KAP zur Ausbildung einer Resistenz gegen die KAP Behandlung führt. Weiterführend wurde evaluiert, ob es zu einem synergistischen antikanzerogenen Effekt kommt, wenn die KAP Behandlung durch den zusätzlichen Einsatz von small molecules ergänzt wird. Als wichtigstes Ergebnis zeigte die multimodale *in vivo* Bildgebung eine deutliche Verringerung des Tumorwachstums und einen Anstieg der reaktiven Spezies nach der KAP Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Tumoren. Im Gegensatz dazu wurden weder die Marker für Apoptose noch die Stoffwechselaktivität beider Tumorentitäten durch KAP beeinflusst. Zudem zeigten wiederholt Plasma behandelte (WPB) Zellen im Vergleich zu Wildtyp (WT) Zellen ein langsames Wachstumsverhalten. Auffallend ist, dass WPB Zellen deutlich kleinere Tumoren bildeten, während die therapeutische KAP Empfindlichkeit unverändert

Zusammenfassung

blieb. Interessanterweise konnte die antikanzerogene Wirkung von KAP durch den Einsatz von small molecules weiter gesteigert werden. Dies äußerte sich in einem deutlich reduzierteren Tumorwachstum im Vergleich zur alleinigen KAP Behandlung. Auch hier kam es zu keinem Anstieg der Marker für Apoptose. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass KAP eine potenzielle adjuvante Therapieoption zu den etablierten Standardtherapien bei Hautkrebs darstellen könnte. Darüber hinaus deuten die Daten darauf hin, dass es synergistische Effekte zwischen KAP und den verwendeten small molecules gibt.

3 Abstract

After cardiovascular disease, cancer is the second most common burden of disease worldwide. Among the various cancer entities that occur in humans, skin cancer is the most frequent cancer worldwide and is divided into non-melanoma skin cancer, including basal cell carcinoma, as well as squamous cell carcinoma (SCC) and malignant melanoma (MM). Cold atmospheric pressure plasma (CAP) is one of the most promising and novel treatments for cancer, especially skin cancer, in recent decades. Several studies on dozens of cancer cell lines have shown significant anticarcinogenic effect and therapeutic potential by treatment with CAP. Likewise, the importance of small molecules in targeted therapy against cancer has increased in recent years. In the present study, the effects of CAP on SCC and MM were investigated *in vivo*, using a comprehensive approach with multimodal imaging techniques. Longitudinal MR- and PET/CT-imaging were performed to determine anatomic and metabolic tumor volume. In addition, the formation of reactive species after CAP treatment was assessed by non-invasive chemiluminescence imaging of L-012. Histological analysis and immunohistochemical staining as well as protein expression profiling were performed to investigate proliferation, apoptosis, inflammation, and angiogenesis in CAP-treated tumors. In addition, *s.c. in vivo* xenograft model was used to investigate whether repeated treatment of tumors with CAP leads to the development of resistance to CAP treatment. Furthermore, we evaluated whether a synergistic anticarcinogenic effect occurs when CAP treatment is complemented by the additional use of small molecules. Most importantly, *in vivo* multimodal imaging showed a significant reduction in tumor growth and an increase in reactive species after CAP treatment compared to untreated tumors. In contrast, neither markers of apoptosis nor metabolic activity of both tumor entities were affected by CAP. In addition, repeated plasma treated (WPB) cells showed slower growth behavior compared to wild-type (WT) cells. Strikingly, WPB cells formed significantly smaller tumors, whereas therapeutic CAP sensitivity remained unchanged. Interestingly, the anticarcinogenic effect of CAP was further enhanced by the use of small molecules. This was manifested in significantly reduced tumor growth compared to CAP treatment alone. Again, there was no increase in markers of apoptosis. These results suggest that CAP could be a potential adjuvant therapy option to the established standard therapies for skin cancer. In addition, the data suggest that there were synergistic effects between CAP and the small molecules used.

4 Einleitung

4.1 Hautkrebs

4.1.1 Einteilung und Epidemiologie

Nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellt Krebs mit 9 % die zweithäufigste Krankheitslast weltweit dar [1]. Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) kam es im Jahr 2019 weltweit zu 9,3 Millionen neuen Todesfällen aufgrund von Tumorerkrankungen [2]. Dies entspricht etwa 19 % aller Todesfälle. Im Vergleich dazu lag der Anteil der krebsbedingten Todesfälle im Jahr 1990 lediglich bei ca. 12 % [2,3]. Dieser Anstieg der Sterblichkeit ist auch bei Hautkrebs zu beobachten. Bezogen auf alle Todesfälle weltweit starben 1990 noch 0,12 % der Menschen an Hautkrebs, 2019 verdoppelte sich die Anzahl fast auf 0,21 % der durch Hautkrebs bedingten Todesfälle [3]. Zudem ist Hautkrebs eine der häufigsten Krebsarten [4,5].

Auf der Grundlage der entarteten Zelllinie kann Hautkrebs im Allgemeinen in die folgenden zwei Hauptgruppen unterteilt werden: Der epitheliale Hautkrebs, der umgangssprachlich auch als „weißer Hautkrebs“ bezeichnet wird sowie das maligne Melanom (MM), das aus den pigmentbildenden Zellen (Melanozyten) der Haut hervorgeht und landläufig auch als „schwarzer Hautkrebs“ bekannt ist. Zu den Hautkrebsarten, die aus der Epithellinie entspringen, gehören das Basalzellkarzinom (BCC, auch Basaliom) und das Plattenepithelkarzinom (PEK, auch Spinaliom) [5]. Zudem gibt es noch weitere seltenere Krebsarten, die mit zum Hautkrebs gezählt werden, aber nicht aus Zelllinien der Haut entspringen, wie das Merkelzellkarzinom, das Kaposi-Sarkom, die kutanen Lymphomen der Haut und verschiedene Arten von Sarkomen [6]. Zusammen machen diese Formen aber weniger als 1 % aller Hautkrebserkrankungen aus. Unter den Hautkrebserkrankungen repräsentiert das BCC, mit 70 bis 80 % der Fälle, die am häufigsten auftretende Form gefolgt vom PEK, welches sich für 20 bis 30 % der auftretenden Hautkrebsfälle verantwortlich zeichnet [6,7]. Schaut man sich die Häufigkeit des kutanen PEK einmal in den Vereinigten Staaten an, dann gehört dieses dort zu der zweithäufigsten Form des epithelialen Hautkrebses [8,9]. Weltweit betrachtet kann davon ausgegangen werden, dass es allein im Jahr 2020 zum Auftreten von fast 1,2 Millionen neuer Fälle von epithelialen Hautkrebs kam und fast 325 Tausend Menschen ein MM entwickelten [10]. Den Neuerkrankungen gegenübergestellt sind die Schätzungen, wie viele Menschen im Jahr 2020 weltweit an den

Einleitung

Folgen ihrer zugrundeliegenden Hautkrebserkrankung verstarben. Es kann davon ausgegangen werden, dass etwa 64 Tausend Menschen in Folge der Erkrankung mit einer Form des epithelialen Hautkrebses erlagen und 57 Tausend Patienten als Folge einer Erkrankung an dem MM verstarben [10]. Interessanterweise werden die meisten Todesfälle durch das MM verursacht, obwohl dieses lediglich für nur 2 % der bösartigen Hautkrebsfälle verantwortlich ist [4]. Im Vergleich zu den weltweiten Zahlen erkrankten in Deutschland 2016 den Schätzungen des Krebsregisters nach, aufbauend auf den Daten von Schleswig-Holstein, 272.202 Menschen neu an Hautkrebs, wobei 37.242 davon die Diagnose MM erhielten [11]. Auf Basis von Daten der Techniker Krankenkasse gipfelte die Häufigkeit für epithelialen Hautkrebs 2017 in Deutschland in der Altersgruppe zwischen 80 und 84 Jahren, wohingegen die Prävalenz des MM zwischen 75 und 79 Jahren lag [12]. Die Prognose für Patienten mit Hautkrebs bei der Erstdiagnose wird durch das Tumorstadium bestimmt, das anhand der Ausdehnung des Tumors sowie des Vorhandenseins von Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen ermittelt wird [13]. Wie das Beispiel des MM zeigt, beträgt die relative 5-Jahres-Überlebensrate für alle Stadien zusammen 92 %. Bei Vorhandensein von Fernmetastasen hingegen sinkt die relative 5-Jahres-Überlebensrate auf 25 % [14]. Das PEK hingegen gilt im Allgemeinen eher als niedriggradig malign und führt nur etwa bei 3 % der Patienten zum Versterben [15,16]. Die große Mehrheit der Patienten mit PEK wird also geheilt. Nur etwa 1,9 bis 2,6 Prozent der auftretenden PEK Fälle führen zu einem Lokalrezidiv oder metastasieren [17]. Was allerdings die Prognose betrifft, so ist die Fernmetastasierung vom PEK mit einer Sterblichkeitsrate von über 70 % fatal [18]. Wie auch das PEK weist das BCC eine sehr gute Prognose auf, insbesondere wenn es in einem frühen Stadium identifiziert und behandelt wird. Tatsächlich ist das BCC die am wenigsten aggressive Hautkrebsentität mit epithelalem Ursprung und weist einen eher geringen Malignitätsgrad auf, obwohl es zur Gewebedestruktion, Rezidiven, lokaler Invasion neigt und über eine begrenzte Befähigung zur Metastasierung verfügt [19].

Betrachtet man, wie bereits eingangs erwähnt, die steigende Inzidenz an Hautkrebs weltweit über die Zeit, so ist dieser Anstieg der gemeldeten Hautkrebsfälle nicht nur mit der Zunahme einer immer älter werdenden Bevölkerung assoziiert, sondern auch mit einem allgemein gestiegenen Bewusstsein über die Bedeutung von Gesundheit. Somit kann ein Zusammenhang gezogen werden zwischen der gestiegenen Inzidenz und einer damit einhergehenden Zunahme der Hautkrebsvorsorgeuntersuchungen in den letzten Jahrzehnten [15]. Es sollte diesbezüglich jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass in vielen Ländern nicht alle

Einleitung

Fälle von Hautkrebs des epithelialen Ursprungs offiziell erfasst werden, so dass die tatsächliche Inzidenz in der Regel wesentlich höher geschätzt werden kann [14,20].

4.1.2 Pathogenese

Im Allgemeinen kann gesagt werden, dass die Pathogenese für die Entstehung von Hautkrebs multifaktoriell ist. Zu den Risikofaktoren für die Entwicklung von Hautkrebs gehören unter anderem: Sonnenexposition, fortgeschrittenes Alter, Röntgenstrahlen, humane Papillomviren (HPV) und die Empfindlichkeit der Haut gegenüber ultravioletter (UV) Strahlung [21,22]. Der stärkste umweltbedingte Risikofaktor für die Entwicklung von einem BCC, PEK oder dem MM ist die kumulative chronische UV-Bestrahlung [22] (Abbildung 1).

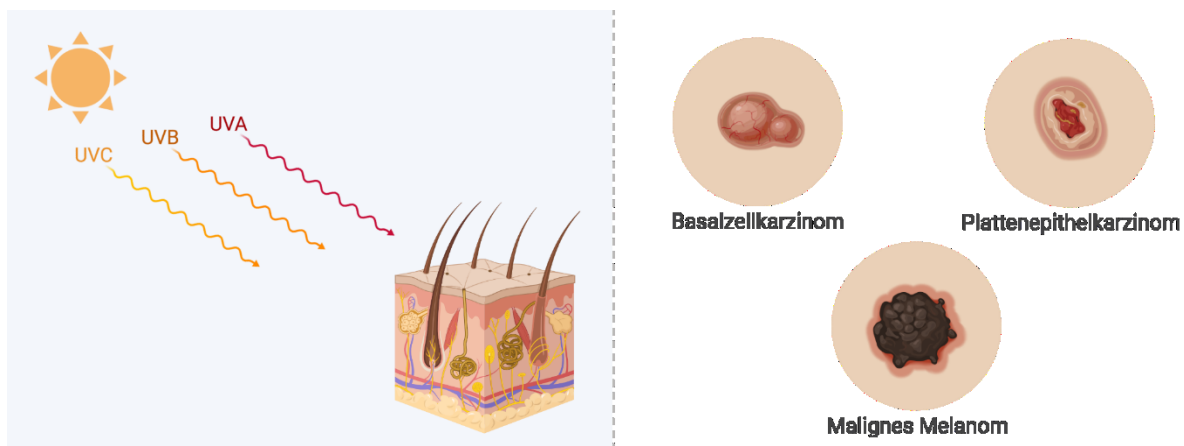


Abbildung 1: Schematische Übersicht über Exposition mit ultravioletter (UV) Licht und Hautkrebsformen. Grafik erstellt mit BioRender.

UV-Strahlung ist das einzig bekannte komplette Karzinogen, welches in der Lage ist, nicht nur durch Mutationen in Tumorsuppressorgenen die Tumorentstehung zu initiieren, sondern auch die Tumorentwicklung direkt zu fördern [23]. Für die Entstehung von Hautkrebs zeichnen sich die UV-A und UV-B Strahlen in besonderem Maße ab. Die UV-A Strahlen sind, im Vergleich zu UV-B Strahlen, in der Lage in tiefere Hautschichten einzudringen und können dort Hautschäden hervorrufen [24]. UV-B Bestrahlung führt meist vornehmlich zu Erythemen oder Sonnenbrand. Die Folge von übermäßiger Exposition gegenüber UV-Bestrahlung ist das Auftreten von Zellschäden aufgrund der Suppression der zellvermittelten Immunreaktionen, Erhöhung

Einleitung

der Inflammation im Gewebe, einem Anstieg des oxidativen Stresses durch eine erhöhte Produktion reaktiver Spezies (RS) und Veränderungen innerhalb der DNA [25–29]. Neben der UV-Strahlung kann auch höher energetische Strahlung, wie die Röntgenstrahlung, bei der Entwicklung eines epithelialen Hautkrebses ein Risikofaktor sein. Insbesondere wenn Personen ionisierender Strahlung, wie bei einer Strahlentherapie, in frühen Phasen ihres Lebens ausgesetzt sind, erhöht sich das Risiko Hautkrebs zu entwickeln [30]. Auch kann eine direkte Beeinflussung des Immunsystems durch immunsuppressive Therapien, wie z. B. bei einer allogenen Organtransplantation, das Risiko um 30 bis 80 % erhöhen, im Laufe des Lebens eine Form von Hautkrebs zu entwickeln [31]. Ebenfalls eine Rolle bei der Entstehung von Hautkrebs können Viren wie HPV spielen. Es wird unter anderem davon ausgegangen, dass HPV bei der frühen Entstehung von PEK eine Rolle spielen kann, in dem der Zellzyklus und die DNA Reparatur beeinflusst werden [32]. Beachtung sollte auch der Tatsache geschenkt werden, dass bestimmte Hautveränderungen über die Jahre entarten können und so Hautkrebs entstehen kann. Ein Beispiel für diese präkanzerösen Hauterkrankungen ist die Aktinische Keratose und die Bowen-Krankheit (Morbus Bowen), die sich zu einem PEK entwickeln können [6]. Beide Krankheitsbilder zeichnen sich durch scharf begrenzte Rötungen aus, können verschuppen und über Jahre oder auch lebenslang unauffällig bleiben. Es kann sich daraus aber auch ein PEK entwickeln [6,33]. Die AK entsteht insbesondere an sonnenexponierten Hautstellen, wohingegen Morbus Bowen auch an anderen Hautstellen auftreten kann, vermutlich im Zusammenhang mit einer HPV Infektion [6].

4.1.3 Diagnostik und Therapie

Wie bei allen Erkrankungen ist es auch beim Hautkrebs vom entscheidenden Vorteil, Veränderungen rechtzeitig erkennen zu können, um einem womöglich destruierenden Wachstum bzw. einer Metastasierung durch eine Resektion entgegenzuwirken. Da die meisten Hautkrebsentitäten epithelialen Ursprungs und auch das MM an der Oberfläche der Haut entstehen, sind sie als solche sehr gut zugänglich für visuelle Untersuchungen. Daher hat sich ein zweistufiges Screening etabliert. Im ersten Schritt werden die Hautoberfläche sowie die daran angrenzenden Schleimhäute oberflächlich untersucht und bei verdächtigen Läsionen vertiefend mit der Auflichtmikroskopie beurteilt [34]. Für eine gesicherte Diagnose ist eine Biopsie, mit

Einleitung

anschließender histologischer Beurteilung, unerlässlich [12,34]. Insbesondere die morphologische Erscheinung vom MM kann stark variieren. Um die makroskopische Beurteilung potentieller maligner Veränderungen eines Pigmentnävus zu erleichtern, findet die ABCDE-Regel Anwendung. "A" wie Asymmetrie (ungleichmäßige Form); "B" wie Begrenzung (die Ränder sind ausgefranst, eingekerbt oder verschwommen); "C" wie colour (Farbe; die Pigmentierung ist nicht einheitlich); "D" wie Durchmesser (breiteste Stelle größer als 5 mm); und "E" wie Erhabenheit (höher als 1mm über Hautniveau) [34,35]. In ungefähr 2 % bis 8 % der Fälle kann das MM auch amelanotisch erscheinen, so dass eine initiale Diagnoseerstellung erschwert wird [35].

Zusätzlich sind in den letzten Jahren für Patienten mit Hautkrebs neue verschiedene bildgebende Verfahren wie Ultraschall, Computertomographie (CT), Magnetresonanztomographie (MRT) oder Positronenemissionstomographie (PET) zu einem festen Bestandteil der Diagnose geworden [36,37]. Um sicherzustellen, dass die Patienten die am besten geeignete und wirksamste Behandlung erhalten, ist es wichtig, das richtige Tumorstadium zu bestimmen. Dafür entscheidend ist unter anderem zu wissen, ob es bereits zu einer Streuung gekommen ist und wenn ja, in welche Körperregionen. Insbesondere das 2-[¹⁸F]fluoro-2-deoxy-D-glucose ([¹⁸F]FDG)-PET ist in den letzten Jahren ein wesentlicher Bestandteil für die Beurteilung späterer Stadien (Stadium III) und des Grades der Metastasierung sowie für die Überwachung des Ansprechens auf die Therapie von epithelialen Hautkrebs und dem MM geworden [36–38]. Zudem profitieren Patienten mit MM davon, dass Fernmetastasen im Gehirn nicht invasiv mittels MRT erfasst werden können [38,39].

Die moderne Therapie besteht je nach Tumorstadium in der Regel aus einer Kombination von Operation, Chemotherapie und Bestrahlung. Soweit sich die Hautläsionen noch in einem frühen Stadium befinden, ist die operative Exzision des betroffenen Areals immer die erste, wichtigste und effektivste Behandlungsmethode. Die Therapie der Wahl bei metastasierten Hauttumoren ist häufig die Behandlung mit Chemotherapeutika [13,40]. Allein im Jahr 2006 wurden in den USA mehr als 2 Millionen Menschen wegen BCC und PEK behandelt [41]. In den letzten zehn Jahren hat ein tieferes Verständnis der molekularen Grundlagen von Krebs zur Entwicklung neuer therapeutischer Optionen geführt. So wurden in den letzten Jahren neue therapeutische Optionen für das metastasierte MM, wie Antikörper gegen Immuncheckpointinhibitoren wie CTLA-4 (Ipilimumab) oder wie PD-1 (Nivolumab und Pembrolizumab) und BRAF-Inhibitoren (Vemurafenib, Encorafenib und Dabrafenib), zugelassen, was zu einem

Einleitung

Rückgang der Mortalität führte [14,34]. Man kann davon ausgehen, dass bei Männern und Frauen im Alter von 20 bis 64 Jahren dadurch die Gesamtmortalität zwischen 2013 und 2017 jährlich um 7 % gesunken ist [14]. Des Weiteren haben antiangiogene Krebstherapien, wie Inhibitoren des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR), sich als vielversprechend für die Behandlung von metastasiertem PEK erwiesen [42,43]. Es ist bekannt, dass eine EGFR Überexpression bei PEK auftreten kann und dies mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist [43,44]. Einige EGFR Inhibitoren wie niedermolekulare Kinaseinhibitoren (Erlotinib, Gefitinib und Dasatinib) und monoklonale Antikörper (Cetuximab und Panitumumab) wurden für die Behandlung von PEK bereits zugelassen [9,43]. Diese neuen Therapiestrategien werden jedoch derzeit häufig noch nicht als Standardbehandlung eingesetzt.

Trotz der etablierten und der neu zugelassenen Therapien werden zusätzliche Therapieoptionen benötigt, um die Überlebenschancen und die Lebensqualität von Patienten mit malignem Hautkrebs weiter zu verbessern.

4.2 Kaltes Atmosphärendruckplasma (KAP)

Kaltes Atmosphärendruckplasma (KAP) ist eine der vielversprechendsten und neuartigsten Behandlungsmethoden der letzten Jahrzehnte gegen Krebs, insbesondere Hautkrebs [45,46]. Physikalisches Plasma, der so genannte vierte Aggregatzustand, wird als ionisiertes Gas definiert, das aus positiv und negativ geladenen Ionen, Elektronen sowie neutralen Teilchen besteht [47,48]. Nach ihrer Temperatur lassen sich Plasmen im Allgemeinen in folgende Gruppen einteilen: Thermische und nichtthermische (kalte) Plasmen. Thermische Plasmen weisen in der Regel Temperaturen auf, die weit über dem liegen, was von biologischen Systemen toleriert werden kann. Im Gegensatz dazu werden bei KAP schwere Teilchen schneller entladen als Elektronen, und es entsteht ein thermisches Ungleichgewicht. Daher erreicht das von KAP Quellen erzeugte Plasma eine Temperatur von 25 bis 45 °C, was eine Anwendung am Menschen ermöglicht [49]. Plasmen können erzeugt werden, indem eine externe Energiequelle, in der Regel ein elektromagnetisches Feld, an ein neutrales Gas angelegt wird, bis ein elektrisch leitfähiges teilionisiertes Plasma entsteht [50]. Die entstehenden Plasmen weisen, auf Grund der erhöhten Energiezufuhr, eine gesteigerte Reaktivität auf. Diese ist durch einen hohen Anteil von RS, Ionen sowie Elektronen und der Emittierung elektromagnetischer Strahlung (UV

Einleitung

und sichtbares Licht) gekennzeichnet [50]. Die unzähligen in der Forschung und in der Wirtschaft eingesetzten verschiedenen Plasma Systeme können hinsichtlich der Entstehung des Plasmas in zwei Kategorien eingeteilt werden: Geräte mit direkter Entladung und Geräte mit indirekter Entladung. Die gebräuchlichsten KAP Geräte im klinischen Einsatz sind die dielektrische Barriereentladung (direkte Plasmaentladung) und der Plasmajet (indirektes System) [51]. Ihnen allen ist gemein, dass sie auf Grund des breiten Spektrums unterschiedlicher Komponenten, die im Plasma enthalten sind, biologisch wirksam sind. KAP wirkt desinfizierend gegen viele Arten von Bakterien und Pilzen, wundheilungsfördernd und antiinflammatorisch [52].

Ein besonderes Augenmerk lag in den letzten Jahren auf einem potentiellen Einsatz von KAP als Therapieoption gegen verschiedene Formen von Tumoren [53]. Mehrere *in vitro* Studien an Dutzenden von Krebszelllinien haben eine signifikante antikanzerogene Wirkung und das therapeutische Potenzial durch die Behandlung mit KAP gezeigt. Diese Ergebnisse konnten in Studien mit subkutanen (s.c.) *in vivo* Xenograft Tumoren, unter anderem an Kopf- und Halstumoren, Hautkrebs, Darmkrebs, Lungenkrebs, Brustkrebs und Blasenkrebs, verifiziert werden [13,49,53–55]. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen wurde die KAP Therapie gegen Krebs bereits vielversprechend im Humanbereich eingesetzt [56,57]. Im Gegensatz zu etablierten Therapieoptionen, wie der chirurgischen Entfernung und Chemotherapeutika, wird vermutet, dass KAP eine selektive Behandlungsmethode gegen Tumorzellen darstellen könnte [49]. Diese Annahme beruht auf der Hypothese, dass eine Behandlung mit KAP in Tumorzellen zu einem deutlich stärkeren intrazellulären Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und reaktiver Stickstoffspezies (RNS), zusammenfassend als RONS bezeichnet, führt als im Vergleich zu gesundem Gewebe [58,59]. Ein weiterer Fokus liegt auf der Kombination von KAP mit weiteren Behandlungsansätzen [53]. Dies würde die einzigartige Möglichkeit bieten, den Einsatz von KAP als Therapieoption durch mögliche synergistische Effekte und einhergehender gesteigerter antikanzerogener Wirkung zu erweitern. Es konnte bereits *in vitro* gezeigt werden, dass die Wirkung von KAP durch den zusätzlichen Einsatz von small molecules zu einem signifikanten Abfall der Zellviabilität von MM und PEK Zellen führte [60].

4.3 Small molecules

Unter small molecules versteht man niedermolekulare Verbindungen, deren Gemeinsamkeit darin besteht, dass sie alle ein niedriges Molekulargewicht von < 900 Da aufweisen [61]. Ansonsten ist die Gruppe der small molecules sehr heterogen aufgestellt, wenn es darum geht, aus welchen biologischen Molekülen sie bestehen. Inkludiert sind unter anderem Aminosäuren, Cholesterin, Fettsäuren und Glucose sowie deren nächst größeren Strukturen wie Alkaloide, Glykoside, Lipide und natürliche Phenole [62,63]. Die Gruppe der small molecules ist jedoch von größeren Molekülen wie Nukleinsäuren, Polysacchariden, Proteinen oder gar Biologicals klar abzugrenzen [63]. Momentan gehört der größte Teil der erhältlichen Arzneimittel noch zu den small molecules (wie Aspirin) [64]. Das Wirkspektrum von small molecules ist vielfältig, so können sie Signalwege und Protein-Protein-Wechselwirkungen inhibieren oder Proteine direkt beeinflussen [65]. Als vorteilhaft für die intestinale Aufnahme von small molecules ist ein Molekulargewicht < 500 Da. In diesem Fall unterliegen niedermolekulare Verbindungen der rule-of-five und sind besonders gut oral bioverfügbar [66]. Sind die chemischen Verbindungen zusätzlich noch sehr lipophil, steigt die Wahrscheinlichkeit, dass sie die Blut-Hirn-Schranke passieren können, wozu aber nur ein sehr geringer Anteil der small molecules befähigt ist [67].

Der Einsatz von small molecules für eine zielgerichtete Therapie gegen die verschiedensten Tumoren hat in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen [68–71]. Die niedermolekularen Verbindungen können eingesetzt werden, um veränderte Signalwege bei Krebs zu inhibieren. Signalwege, die in der Entstehung von Tumoren häufig involviert sind, haben unter anderem Einfluss auf die Angiogenese, Apoptose, Invasion, Metastasierung, Migration und Proliferation [72]. Schon 1967 entdeckte man die Wirksamkeit eines bekannten Rezeptes der traditionellen chinesischen Medizin, Danggui Luhui Wan, welches aus 11 chinesischen Heilkräutern hergestellt wird, gegen die chronisch myeloische Leukämie. Als wirksamer Bestandteil zeichnete sich später das in geringen Konzentrationen im *Indigofera tinctoria* enthaltene small molecule Indirubin [73]. Indirubin und seine Derivate wirken dabei proapoptotisch auf Tumorzellen und sind in der Lage Proteinkinasen, wie Cyclin-abhängige Kinasen und die Glykogensynthase-Kinase 3, zu inhibieren [74]. Ebenfalls vielversprechend sind Indirubin-Derivate bei dem Einsatz gegen Hautkrebs. Es konnte bereits erfolgreich *in vitro* gezeigt werden, dass das Tumorzellwachstum und die Apoptose von MM Zellen positiv beeinflusst werden kann [70]. In einer

Einleitung

anderer Studie zur Tumorprogression konnte gezeigt werden, dass small molecules auf Basis von Chromonen, in Abhängigkeit der Konzentration, in der Lage sind zur Hemmung der vom epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) induzierten neoplastischen Transformation von JB6-Zellen beizutragen [69]. Somit kann gesagt werden, dass small molecules, durch einen direkten Eingriff in Signalwege, ein großes Potenzial als Therapeutikum gegen Krebs und Hautkrebs im Besonderen, versprechen.

Unseres Wissens nach wurde bisher noch keine Kombination von KAP und Chromon-Derivaten in einem *in vivo* Modell für die Behandlung von Tumoren eingesetzt. Somit wurden in dieser Arbeit erstmals Untersuchungen zur kombinatorischen Wirkung der neuartigen small molecules (Chromon-Derivate) und KAP durchgeführt.

5 Ziel

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die Auswirkung von KAP und neu synthetisierter small molecules bzw. eine Kombinationstherapie dieser beiden innovativen Behandlungsansätze auf die Tumorprogression verschiedener Hautkrebsentitäten in einem murinen heterotopen Modell zu evaluieren.

Im Rahmen dieser Promotion wurden nachstehende Fragestellungen untersucht:

1. Führt die Behandlung mit KAP im Tumor zum Anstieg reaktiver Spezies?
2. Wird die Tumorprogression durch KAP beeinflusst und welchen Einfluss hat die Behandlung auf die Zellularität innerhalb des Tumors?
3. Sind Auswirkungen auf das metabolische Tumolvolumen nach der Behandlung mit KAP zu verzeichnen?
4. Inwiefern werden die Proliferation, Angiogenese oder Inflammation durch die Behandlung beeinflusst?
5. Wie verändert sich die Tumorprogression bei alleiniger Gabe von small molecules oder einer Kombination von small molecules und KAP?

6 Material und Methoden

6.1 Subkutanes Mausmodell

6.1.1 Zelllinien

Für die *in vivo* Experimente wurden die humanen PEK-Zelllinien A431 und SCL-2 sowie die MM-Zelllinien A375 und SK-MEL-29 verwendet. Die Zelllinien SCL-2 und SK-MEL-29 wurden von der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Universitätsmedizin Rostock bereitgestellt. Die Zelllinien A431 und A375 wurden ursprünglich von der Firma Cell Lines Service GmbH ((CLS), Eppelheim, Deutschland) erworben. Die Zelllinie A431 wurde vom Leibniz-Institut für Plasmaforschung und Technologie e.V. (INP Greifswald, Greifswald, Deutschland) von Frau Julia Berner, über einen Zeitraum von 8 Wochen, einmal wöchentlich, *in vitro* wiederholt mit Plasma behandelt (WPB) und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden unter Standard-Zellkulturbedingungen bei 37 °C und 5 % CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's serum GlutaMAX™ (DMEM GlutaMAX™, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) kultiviert, zusätzlich wurde dem DMEM 10 % fetales Kälberserum (FCS, Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland), 100 U/mL Penicillin und 100 mg/mL Streptomycin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) zugesetzt. Für die Experimente wurden die Zellen mit 1 % Trypsin/EDTA geerntet und auf Eis gelagert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl der Zellsuspension entnommen, verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer, in jeweils 4 Großquadraten, meanderlinienförmig ausgezählt. Die relative Zellzahl berechnete sich nach der folgenden Formel:

$$\text{Zellen/mL} = \frac{\text{Anzahl der Zellen}}{\text{Anzahl der Großquadrate}} \cdot \text{Verdünnung (10)} \cdot \text{Kammerfaktor (10}^4\text{)}$$

Für die *in vivo* Versuche wurden die Zellen nach der Quantifizierung der Zellzahlen auf Eis mit 1:1 kaltem Dulbecco's Phosphate-Buffered Solution (DPBS)/Matrigel® High Concentration Growth Factor Reduced (Matrigel® HC GFR, Corning, New York, NY, USA) suspendiert. Für die Versuche wurden die Zelllinien A431 und A375 in einer Passage zwischen 35 und 40 verwendet. Für die Zelllinie SCL-2 und SK-MEL-29 lagen keine exakten Informationen über die Passage

Material und Methoden

vor. Ein Mycoplasmentest (MycoAlert™ PLUS Mycoplasma Detection Kit, Lonza Walkersville, Inc., Walkersville, MD, USA) wurde nach Erhalt der Zelllinien von der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Universitätsmedizin Rostock, unter Leitung von Dr. Lars Böckmann, durchgeführt. Alle getesteten Zelllinien waren Mycoplasmen negativ. Die Zelllinie A375 wurde im Verlauf der Versuche einmal positiv auf Mycoplasmen getestet, die betroffene Versuchsgruppe wurde aus den Analysen exkludiert und die Versuche wurden mit negativ getesteten A375 Zellen einer früheren Passage fortgesetzt.

6.1.2 Versuchstiere

Die NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ (NSG) Mäuse wurden ursprünglich vom Jackson Laboratory erworben und danach in der Core Facility Zentrale Versuchstierhaltung des Rudolf-Zenker-Institutes für Experimentelle Chirurgie weiter gezüchtet. Diese Mäuse entwickeln eine Immunschwäche, die auf einen schweren kombinierten Immundefekt (Scid) und ein vollständiges Null-Allel der gemeinsamen gamma-Kette des Interleukin (IL) 2-Rezeptors (Il2rg) zurückzuführen ist [75]. Durch die Scid Mutation reifen in den Mäusen keine T- und B-Zellen aus, wohingegen der knock-out der Il2rg, durch fehlendes Ansprechen auf mehrere Zytokine, dazu führt, dass keine funktionsfähigen natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und Makrophagen vorhanden sind. Die NSG Mäuse wurden bei einem 12-Stunden-Hell-Dunkel-Zyklus und einer Umgebungstemperatur von 21 ± 2 °C mit 60 ± 20 % relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Wasser und Standardfutter wurden *ad libitum* zur Verfügung gestellt. Die Mäuse wurden unter spezifisch keimfreien Bedingungen (mit Ausnahme der folgenden in den letzten zwei Jahren nachgewiesenen Krankheitserregern: Helicobacter sp., Rodentibacter pneumotropicus, Norovirus bei Mäusen und Theilovirus bei Ratten) in einzeln belüfteten Käfigen und mit verschiedenen Beschäftigungsmöglichkeiten gezüchtet und gehalten [76,77]. Die Mäuse wurden während der Aufzucht in Gruppen gehalten. Für die Versuche wurde eine unterschiedliche Anzahl von Mäusen (N = 2-5) in Käfigen gehalten und es wurden verschiedene Würfe verwendet. Vor dem Versuch hatten die Mäuse eine Woche Zeit, um sich an die neue Umgebung zu habituierten. Für alle Versuche wurden männliche NSG Mäuse im Alter von 8 bis 20 Wochen und mit einem Körpergewicht zwischen 20 und 30 g verwendet. Die Studie und die Tierversuche wurden vom

Material und Methoden

Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei in Mecklenburg-Vorpommern (7221.3-1-057/18) genehmigt und in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz (TierSchG) und der EU-Richtlinie 2010/63/EU durchgeführt.

6.1.3 Subkutane Tumorzellinjektion

Für die s.c. Tumorzellinjektion wurden die Mäuse narkotisiert (1,5-2,5 % Isofluran (CP-Pharma, Burgdorf, Deutschland) in Sauerstoff) und auf einer Heizmatte (Temperatur 38 °C) gelagert. Danach wurden beide hinteren Flanken rasiert, und 1×10^6 PEK- (A431 oder SCL-2) bzw. MM- (A375 oder SK-MEL-29) Zellen (in 1:1 kaltem DPBS/Matrigel® HC GFR) jeweils s.c. in die linke bzw. rechte Flanke injiziert. Der Beobachtungszeitraum danach betrug 3 Wochen. In dieser Zeit wurde die Tumorgröße mit einer Schieblehre gemessen. Für eine genauere Bewertung des Tumolvolumens wurden nicht invasive longitudinale multimodale Bildgebungsverfahren eingesetzt. Die Verwendung solcher bildgebender Verfahren ermöglicht nicht nur eine genaue Überwachung z. B. des Tumorwachstums bei einzelnen Tieren, sondern führt auch zu einer erheblichen Verringerung der Anzahl der verwendeten Tiere, was in direkter Übereinstimmung mit dem 3-R-Prinzip (im englischen: replace, reduce and refine) steht. Nach den *in vivo* Versuchen wurden die Mäuse durch intraperitoneale (i.p.) Injektion von Ketamin/Xylazin (Ketaminhydrochlorid (PHARMANAOVO GmbH, Hannover, Deutschland) 100 mg/kg; Xylazinhydrochlorid (Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) 6 mg/kg) betäubt und das Blut durch eine retroorbitale Punktion entnommen. Anschließend wurden die Tiere durch zervikale Dislokation euthanasiert. Danach erfolgte die sofortige Exzidierung und Asservierung der Tumoren. Der Gesundheitszustand wurde während des gesamten Versuchszeitraumes überwacht und bewertet. Die Bewertung der Schwere der Belastung wurde in folgende vier Kategorien unterteilt: Körpergewicht, Allgemeinzustand, Spontanverhalten und verfahrensspezifische Kriterien. Die maximal zu erreichende Punktzahl betrug 17. Tiere mit einer Punktzahl von ≥ 4 in einer der vier Kategorien oder einer Gesamtpunktzahl von ≥ 7 wurden als schwer belastet eingestuft. Dies wurde als humaner Endpunkt definiert und die Tiere, die diese Kriterien erreichten, wurden sofort euthanasiert. Weitere humane Endpunkte waren ein Gewichtsverlust von ≥ 20 % und ein Tumolvolumen von $\geq 2 \text{ cm}^3$ (siehe Tabelle 1).

Material und Methoden

Tabelle 1: Versuchsspezifische Belastungsbeurteilung zur Einstufung des Gesundheitszustandes der Mäuse.

Beobachtung	Punktezahl	Beschreibung
Körpergewicht	0	keine Reduktion
	2	Reduktion um $\geq 10\%$ (vom Ausgangsgewicht)
	4	Reduktion um $\geq 20\%$ (vom Ausgangsgewicht)
Allgemeinzustand	0	glattes und glänzendes Fell, gepflegte Körperöffnungen
	2	Augen trüb, verklebte Körperöffnungen, unnormale Haltung, Dehydratation
	4	Krämpfe, Lähmung, Tier kalt oder moribund
Spontanverhalten	0	Tier ist aktiv, normales Verhalten
	2	Tier ist träge, Isolation
	4	Apathie
	4	Schmerzäußerung
	5	Automutilation
verfahrensspezifische Kriterien	0	keine Auffälligkeiten
	1	Wundheilungsstörung
	4	Ulzeration
	4	Tumolvolumen $\geq 2\text{ cm}^3$

6.2 Therapie der subkutanen Flankentumoren

6.2.1 Therapie mit KAP und Chemilumineszenz Analyse reaktiver Spezies

Der für die Behandlung der s.c. Flankentumoren in den *in vivo* Versuchen verwendete Hochfrequenz-Plasmajet kINPen™ IND (neoplas GmbH, Greifswald, Deutschland) wurde vom Leibniz-Institut für Plasmaforschung und Technologie e.V. (INP Greifswald, Greifswald, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Dieser arbeitet bei Temperaturen zwischen 35 und 50 °C und ähnelt technisch dem kINPen Med, einem CE-zertifiziertem Medizintechnikprodukt der Klasse IIa, welches bereits routinemäßig für die Behandlung von Hauterkrankungen in der Dermatologie eingesetzt wird. Dessen technische, chemische und physikalische Spezifikationen wurden bereits eingehend beschrieben [78]. Für die Behandlung der s.c. Tumoren wurde der Plasmajet mit Argon als Trägergas, bei einer Flussrate von 5 Standard-Liter pro Minute (slm), betrieben. Der Arbeitsabstand zwischen dem Handstück (Pen) und der Hautoberfläche der tumortragenden Maus lag zwischen 0,8 und 1 cm. Die Behandlung erfolgte 5 Minuten lang in horizontaler und vertikaler Richtung, jeweils Zeile für Zeile, auf einer Fläche von mindestens 1

Material und Methoden

cm². Bei größeren Tumoren wurde das gesamte, vom Tumor beanspruchte Areal, eingeschlossen. In den KAP-behandelten Gruppen wurde der potenzielle Schmerz und der Fixierungsstress unter der Behandlung mit Isofluran-Narkose (siehe Abschnitt 6.1.3) reduziert. Um das Risiko einer Wärmeakkumulation auf der Hautoberfläche zu verringern, wurde der Plasmajet in einem Winkel von ungefähr 45° gehalten. Um den Temperaturanstieg unter der KAP Behandlung zu quantifizieren, wurde bei einigen Tieren die lokale Hauttemperatur vor und nach der KAP Therapie mittels eines Infrarot-Thermometers (BodyTemp 478, Dostmann electronic GmbH, Reicholzheim, Deutschland) gemessen. Die Messung der Hauttemperatur wurde durchgeführt, um die Wärmeentwicklung durch die Behandlung zu erfassen und um eventuelle Einflüsse des Temperaturanstiegs auf die Tumorprogression zu beurteilen. Zur Analgesie erhielten die Tiere ab dem Tag der s.c. Tumorzellinjektion bis zur Euthanasie 0,25 mL Metamizol (500 mg/mL, Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) im Trinkwasser (100 mL; das Trinkwasser wurde täglich gewechselt).

6.2.1.1 Chemilumineszenzmessung

Um zu kontrollieren, ob es zu einer Akkumulation von RS unter der Behandlung mit KAP kommt, wurde die Chemilumineszenz (CL) Sonde L-012 (8-Amino-5-chlor-7-phenyl-pyrido [3,4-d] pyridazine-1,4(2H,3H)dione) verwendet. Dabei handelt es sich um ein chemisches Analogon von Luminol. Das L-012 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Neuss, Deutschland) wurde in sterilem Aqua dest. und DPBS (250 mL/L) in einer Konzentration von 10 mg/mL hergestellt. Die Lumineszenzbildgebung der Mäuse wurde mit der NightOWL II, einem Kleintier-Imaging-System, durchgeführt (NightOWL II LB 983 NC100, Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Deutschland). Die NightOWL II hat eine geschlossene, dunkle Kammer und eine CCD-Kamera zur Erfassung von Photonen. Vor der Bildgebung wurde L-012 i.p. in einer Dosis von 50 mg/kg injiziert. Die Lumineszenz-Bildgebung wurde an, mit Isofluran anästhesierten und in Bauchlage positionierten, Mäusen (siehe Abschnitt 6.1.3) durchgeführt. Die Aufnahme für das Lumineszenzsignal wurde 330 s nach der i.p. Injektion von L-012 durchgeführt. Alle Gruppen wurden an den Tagen 4, 8, 12, 16 und 20 gemessen. Bei den mit KAP-behandelten Gruppen wurde an einem Tag zweimal das Lumineszenzsignal gemessen: Einmal, um das basale Niveau der RS innerhalb des Tumors vor der Behandlung zu bestimmen und das zweite Mal, um den Anstieg der RS nach der Behandlung zu messen. Um

Material und Methoden

einer Akkumulation von L-012 und somit des Lumineszenzsignals entgegen zu wirken, lagen zwischen den beiden Messungen mindestens zwei Stunden. Dies gewährleistete eine ausreichende Zeitspanne, damit L-012 metabolisch abgebaut werden konnte. Für die mit KAP-behandelten Gruppen wurde für die CL-Messung als erstes L-012 i.p. injiziert und danach sofort der rechte Tumor für 5 min mit KAP behandelt. Im Anschluss erfolgte die Messung des Lumineszenzsignals. Für die Lumineszenzbildgebung betrug die Belichtungszeiten 60 s mit einem 4×4 Binning. Für alle Bilder wurde eine Hintergrundsignalkorrektur und eine Unterdrückung des kosmischen Signals durchgeführt. Zur Lokalisierung der Tumoren und um den Lumineszenzsignalen anatomische Positionen zuordnen zu können, wurde ein Hellfeldbild mit einer Belichtungszeit von 0,01 s und einer Lichtintensität von 10 % aufgenommen. Die Lumineszenzsignale wurden semiquantitativ analysiert, indem mit der Software indiGO™ (v2.0.5.0, Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Deutschland) manuell eine Region of Interest (ROI) über den Bereich des rechten Tumors gelegt wurde. Die Lumineszenzintensität der ROI wurde als Photonen/Sekunde/cm² quantifiziert.

6.2.2 Therapie mit small molecules

Die small molecules IS112 und SM837 wurden vom Institut für Organische Chemie (Universität Rostock) synthetisiert. Bei beiden Verbindungen handelt es sich um Chromon-Derivate. Die Summenformel von IS112 ist C₁₃H₆ClF₅O₃, die von SM837 C₁₇H₁₁FO₃ (Abbildung 2).

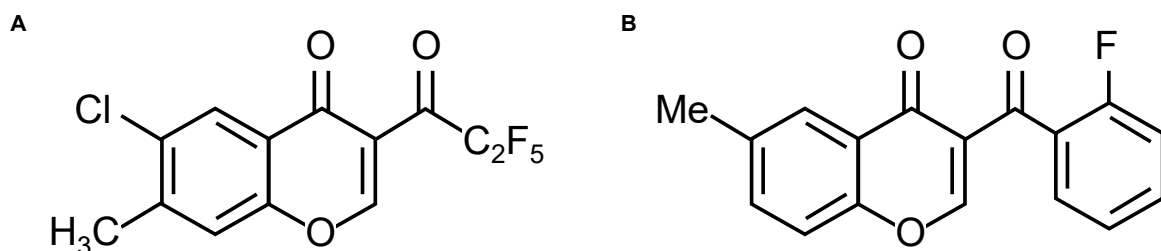


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Strukturformel von IS112 (A) und SM837 (B).

Als Lösungsmittel (LsgM) für IS112 und SM837 wurde Cremophor EL 1:1 verdünnt mit Ethanol verwendet. Nachdem die small molecules gelöst waren, wurde zu der Verdünnung und zum Erreichen der Endkonzentration, dem gelösten Volumen, 2 Teile 0,9 %ige NaCl-Lösung gegeben. Somit ergab sich eine Endkonzentration für IS112 von 3 mg/mL und für SM837 eine

Material und Methoden

Endkonzentration von 1 mg/mL. Die Tiere der Kontrollgruppen erhielten ein Vehikel (Cremophor EL und Ethanol, 1:1, verdünnt mit 2 Teilen steriler 0,9 %iger NaCl-Lösung, Endkonzentration von Cremophor EL und Ethanol: $33.3\bar{3}$ %). Für die *in vivo* Versuche wurden die small molecules oder das Vehikel mit einem Gesamtvolumen von 10 mL/kg Körpergewicht i.p. injiziert. Damit ergab sich für die Tiere, die mit IS112 behandelt wurden, eine Dosis von 30 mg/kg Körpergewicht bzw. für die mit SM837 behandelten Mäuse eine Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht.

6.3 Methoden zur Erfassung des Tumorwachstums und -metabolismus

6.3.1 Caliper

Für das kontinuierliche Monitoring der Tumorgröße über den gesamten Versuchszeitraum wurde das Tumolvolumen mit der Schieblehre gemessen. Dafür wurde mit dem Caliper die Länge und Breite des jeweiligen s.c. gelegenen Flankentumors bestimmt. Danach wurde das Tumolvolumen nach der Formel: Länge \times Breite² \times 0,52 berechnet. Dies ermöglichte eine erste sofortige Beurteilung der Tumorprogression.

6.3.2 Magnetresonanztomographie

Für eine möglichst exakte und nicht invasive, longitudinale Bestimmung des Tumolvolumens wurden MRT Messungen durchgeführt. Zusätzlich zur morphologischen Aussage über das anatomische Tumolvolumen konnte die Zellularität innerhalb des Tumors, durch die Messung des scheinbaren Diffusionskoeffizienten (ADC), bestimmt werden. Die MRT Bildgebung wurde in der Core Facility Multimodale Kleintierbildgebung des Rudolf-Zenker-Institutes für Experimentelle Chirurgie von Mitarbeitern der Core Facility durchgeführt. Die MRT Bildgebung erfolgte mit einem 7-Tesla-Kleintier-MRT-Scanner (BioSpec 70/30, 7,0 T, max. 440 mT/m Gradientenstärke, Bruker BioSpin MRI GmbH, Ettlingen, Deutschland) mit einem 1-H-Sendereceptor (86-mm-Resonator, Bruker) und einem 2-mal-2 Oberflächenspulen-Array (Bruker) für den Empfang, welcher auf dem Rücken der Mäuse positioniert wurde. Während der MRT-Messungen wurden die Mäuse mit einem Isofluran-Sauerstoffgemisch (siehe Abschnitt 6.1.3)

Material und Methoden

in Narkose gehalten und auf einer Wärmematte im MRT gelagert. Die Atemfrequenz wurde dabei kontinuierlich überwacht und für die Triggerung der MRT Messung verwendet (Monitoring and Gating System Modell 1030, SA Instruments, Stony Brook, NY, USA). Die erste MRT Untersuchung fand eine Woche nach der Tumorzellinjektion statt und wurde über einen Zeitraum von drei Wochen jede Woche wiederholt (insgesamt drei MRT Messungen pro Maus). Um die Zeit in Narkose pro Tag für die einzelnen Tiere so kurz wie möglich zu halten, wurden die MRT und PET/CT Messungen an verschiedenen Tagen durchgeführt. Das Protokoll für die Bildgebung umfasste morphologische T2-gewichtete TurboRARE- und diffusionsgewichtete SpinEcho-Bildgebungssequenzen (DWI). Die Tumorgöße wurde in hochaufgelösten T2-gewichteten Bildern in der Transversalebene beurteilt. Die Parameter der T2-gewichteten TurboRARE-Sequenz waren: repetition time (TR): Aufgrund des respiratorischen Aufnahmefensters etwa 4,200 ms; echo time (TE): 26,0 ms; field of view (FoV): 42 mm × 24 mm; Matrix: 351 × 200; Voxelgröße: (0,12 × 0,12 × 0,75) mm³; 35-50 Schichten je nach Tumorgöße; Aufnahmezeit: ca. 10 min. Die Parameter der SpinEcho (SE) DWI-Sequenz waren: TR: 2,000 ms; TE: 25 ms; FoV: 42 mm × 24 mm; Matrix: 192 × 109; Auflösung: 220 × 220 µm, 35-50 Schichten von 0,75 mm pro Schicht in der transversalen Ebene; Diffusionswichtung der vier b-Werte, b₁-b₄: (100, 350, 700, 1.000) s/mm², ein b₀-Bild und drei orthogonale Gradientenrichtungen, Gesamtaufnahmezeit: 30-35 Minuten, abhängig von der Tumorgöße und der Anzahl der Schichten. Der ADC und die entsprechenden Parameterkarten wurden durch einen pixelweisen monoexponentiellen Fit der Signalintensität für die verschiedenen b-Werte der SE-DWI-Sequenz mit Hilfe der Paravision Software (Paravision 6.01, Bruker) berechnet. Das Tumolvolumen und die ADC-Werte wurden mit der Software ITK-SNAP (v3.6.0; 1. April 2017, Penn Image Computing and Science Laboratory, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA) durch schichtweise Einzeichnung von ROIs um den Tumor bestimmt.

6.3.3 Positronen-Emissions- und Computer-Tomographie

Um eine Aussage über die Veränderung der metabolischen Aktivität der Tumoren durch die Behandlung mit KAP treffen zu können, wurden longitudinale PET/CT Messungen durchgeführt. Die PET/CT-Bildgebung wurde von Mitarbeitern der Core Facility Multimodale Kleintierbildgebung der Universitätsmedizin Rostock durchgeführt. Der Radiotracer [¹⁸F]FDG

Material und Methoden

wurde eingesetzt, um das metabolische Tumervolumen (MTV) mittels *in vivo* PET/CT Bildgebung zu bestimmen. Die PET/CT Bildgebung wurde wie die MRT Messungen nach ein, zwei und drei Wochen nach der Tumorzellinjektion durchgeführt. Für die Injektion des Radiotracers und die PET/CT Messung wurden die Anästhesie und die Aufrechterhaltung der Körpertemperatur der Tiere wie in Abschnitt 6.1.3 durchgeführt. Vor der PET/CT Messung wurde der Radiotracer [¹⁸F]FDG über einen Mikrokatheter in die Schwanzvene injiziert. Für die Messungen erhielten die Mäuse eine mittlere Dosis von $15,0 \pm 2,0$ MBq [¹⁸F]FDG. Die Zeit für die Verteilung des Radiotracers im Organismus betrug 60 Minuten, danach erfolgte eine statische PET Aufnahme der Mäuse für 15 Minuten. Die Mäuse wurden in liegender Position auf dem Bauch in einem Kleintier-PET/CT-Scanner (Inveon PET/CT, Siemens Medical Solutions, Knoxville, TN, USA) gemessen. Um die PET-Daten anatomischen Positionen zuordnen zu können und zur Schwächungskorrektur wurde für jede Maus ein Ganzkörper CT-Scan durchgeführt. Korrekturen der PET-Daten wurden für Randoms, Streustrahlung, Totzeit der Detektoren, radioaktiven Zerfall und Schwächung durchgeführt. Zur Rekonstruktion der CT-Bilder wurde ein Feldkamp-Algorithmus verwendet. Die Rekonstruktion von 3D PET-Bildern erfolgte mit einem dreidimensionalen iterativen Ordered Subsets Expectation Maximization Algorithmus (3D-OSEM/OP-MAP) mit 2 Iterationen (OSEM) und 18 Iterationen (MAP), was zu einer räumlichen Auflösung von 1,5 mm führte. Das MTV wurde mit der Inveon Research Workplace Software (v4.2.08, Siemens, Knoxville, TN, USA) bestimmt. Auf fusionierten PET- und CT-Bildern wurde ein Volume of Interest (VOI) um das gesamte Tumorgewebe gelegt. Im Anschluss wurde das MTV durch Anwendung eines Schwellenwerts von 60 % auf den maximalen standardisierten Uptake-Wert (SUV_{max}) ermittelt, somit wurden 40 % der heißesten Voxel im VOI dargestellt und als metabolisch aktives Tumorgewebe gewertet. Auf diese Weise wurden partielle Volumeneffekte, wie z. B. Spill-in- und Spill-out-Effekte, reduziert und nekrotische Teile des Tumors ausgeschlossen [79].

6.4 *Ex vivo* Analysen

6.4.1 Blutbild

Vor der Euthanasie der Tiere wurde den Mäusen unter Narkose (wie in Abschnitt 6.1.3 beschrieben) retroorbital Vollblut entnommen. Für die Blutentnahme wurden EDTA Microvetten (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) verwendet, die nach der Blutentnahme sofort mehrfach gemischt wurden, um eine Agglutination zu vermeiden. Die Proben wurden im Anschluss, bis zur Analyse, auf Eis zwischengelagert. Für die Bestimmung des kleinen Blutbildes wurden die Vollblutproben mehrfach invertiert und an einem Hämatologie-Analysesystem gemessen (Sysmex Kx-21N, Sysmex, Köbe, Japan oder VetScan HM5, Abaxis Inc., Union City, CA, USA). In den Vollblutproben wurde die Anzahl der Leukozyten (LEU), Erythrozyten (ERY) und Thrombozyten (THRO) sowie das Hämoglobin (HB) und der Hämatokrit (HK) bestimmt. Vollblutproben, die Anzeichen von Makro- oder Micro-Gerinnseln aufwiesen, wurden für weitere Analysen oder Auswertungen exkludiert. Um die für spätere Analysen benötigten Plasmaproben zu gewinnen, wurden die Vollblutproben für 10 min, bei 6 °C und 1200 rcf, zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und die Plasmaproben bei -80 °C gelagert.

6.4.2 Multiplex-Zytokinanalyse

Für die Beurteilung der Auswirkung der KAP Therapie auf die Sezernierung pro- und anti-inflammatorischer Zytokine im murinen s.c. Tumormodell wurde eine Multiplex-Zytokin-Analyse mit dem Plasma der NSG Mäuse nach der finalen Blutentnahme unter Verwendung eines Bead basierten Sandwich Assays für mehrere Analyten durchgeführt. Die Multiplex-Zytokinanalyse erfolgte durch das Leibniz-Institut für Plasmaforschung und Technologie e.V. (INP) in Greifswald unter der freundlichen Hilfe von Frau Lea Miebach nach Herstellerangaben. Dafür wurde der LEGENDplex™ Multiplex Assay (BioLegend, San Diego, CA, USA) eingesetzt, der Beads gegen die folgenden Zytokine enthielt: Interferon- γ (INF γ), Tumornekrosefaktor-alpha (TNF α), IL2, IL4, IL5, IL6, IL9, IL10, IL13, IL17A, IL17F, IL21 und IL22. Die Beads wurden im Anschluss mit fluoreszierenden Antikörpern (AK) markiert und die Proben mittels Durchflusszytometrie analysiert. Für die Analyse wurden im Vorfeld vier bis sechs Plasmaproben von Tieren einer Gruppe gepoolt, von diesen gepoolten Plasmen wurden jeweils biologische Replikate

Material und Methoden

einer Gruppe als technische Quadriplikate gemessen. Da für die *in vivo* Versuche NSG Mäuse mit einer ausgeprägten Immundefizienz verwendet wurden, wurden die Ergebnisse bereits im Vorfeld differenziert betrachtet. Da bekannt ist, dass einige Zytokine, wie z. B. IL6, IL10, IL15 und IL17 [80], auch von Fibroblasten, Endothel- und Epithelzellen sezerniert werden können, wurden am ehesten bei diesen IL Veränderungen durch die KAP Behandlung erwartet. Zudem ist bekannt, dass IL2, IL4, IL9 und IL21 bei NSG Mäusen selbst noch vorhanden sind, obwohl die Signalwege durch den Knockout der *Il2rg* unterbunden werden [75].

6.4.3 Histologie und Immunhistochemie

Nach Abschluss der *in vivo* Versuche wurden die Tumoren exzidiert und eine Hälfte eines jeden Tumors wurde im Anschluss für mindestens einen Tag in 4 %igen gepufferten Formafix (stabilisiert mit Methanol; Grimm med. Logistik GmbH, Torgelow, Deutschland) fixiert und in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Danach wurden die Tumore in Paraffin eingebettet. Für die Hämatoxylin- und Eosinfärbung (H&E) und die immunhistochemischen Färbungen wurden die Tumoren in einer Dicke von 4 µm geschnitten und auf Objektträger aufgezogen. Nach der Entparaffinierung wurden die Färbungen durchgeführt und die Gewebeschnitte routinemäßig histologisch untersucht. Apoptotische Zellen wurden mit dem ApopTag[®]-Assay (Merck, Darmstadt, Deutschland) durch enzymatische Markierung der DNA-Fragmente apoptotischer Zellen, basierend auf der TUNEL-Methode, nachgewiesen. Die Färbung erfolgte gemäß der Gebrauchsanweisung des Herstellers, gefolgt von einer Gegenfärbung der Zellkerne mit Mayer's Hämalaun-Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland). Ki-67 als Marker für proliferierende Zellen wurde mit einem polyklonalen Kaninchen-Anti-Ki-67 (1:200, Abcam, Cambridge, UK) und einem sekundären polyklonalen Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG mit alkalischer Phosphatase (AP)-Konjugat (1:100, Agilent Dako, Santa Clara, CA, USA) gefärbt, gefolgt von einer Gegenfärbung der Zellkerne mit einer Permanentrot-Lösung (Agilent Dako). Die Färbung von CD31-positiven Endothelzellen erfolgte mit einem polyklonalen Ratten-Anti-CD31 (PECAM-1, 1:50, Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA), einem sekundären polyklonalen Ziegen-Anti-Ratten-IgG mit Meerrettichperoxidase (HRP)-Konjugat (1:200, Abcam, Cambridge, UK) und dem Chromogen DAB (Agilent Dako), gefolgt von einer Gegenfärbung der Zellkerne mit Mayer's Hämalaun-Lösung (Merck). Makrophagen wurden mit einem monoklo-

Material und Methoden

nenalen Ratten-Anti-F4/80 (1:10, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) und einem sekundärem polyklonalem Ziegen-Anti-IgG mit AP-Konjugat (1:100, Abcam) nachgewiesen. Nach der spezifischen Markierung wurden die Objektträger mit einer Permanentrot-Lösung (Agilent Dako) gegengefärbt. Zum Nachweis von Granulozyten wurden die entparaffinierten Objektträger mit Chloracetat-Esterase (CAE) angefärbt. Dazu wurden die Objektträger mit Naphthol AS-D Chloracetat (Sigma-Aldrich), gemischt mit Diazoniumsalz (Sigma-Aldrich), angefärbt und mit Mayer's Hämalaun-Lösung gegengefärbt. Alle Objektträger wurden in X-TRA Kitt® (MEDITE, Burgdorf, Deutschland) eingebettet. Ki-67, ApopTag®, F4/80 und CAE positiv gefärbte Zellen wurden bei 400 facher Vergrößerung mit dem Mikroskop Axioskop 40 (Zeiss, Jena, Deutschland) quantifiziert. Dafür wurden 5 × 100 Zellkerne pro Tumor in fünf repräsentativen Bereichen entlang der invasiven vitalen Front des Tumors ausgewertet und als positive Zellen [%] angegeben. Die Anzahl der CD31-positiven Gefäße wurde in fünf Gesichtsfeldern gezählt und als Anzahl Gefäße/Feld angegeben.

6.4.4 Molekularbiologie

Für die Analyse der Proteinexpression wurde je eine Hälfte der Tumoren unmittelbar nach der Resektion in flüssigem Stickstoff (N₂; -196 °C) eingefroren und bei -80 °C gelagert. Je Tumor wurden 30 mg Tumorgewebe manuell homogenisiert, um danach die Proteine mittels eines Lysispuffers (1 M Tris pH 7,5, 5 M NaCl, 250 mM EDTA, 10 % Triton-X-100, 4 % NaN₃, 100 mM PMSF (ein Proteaseinhibitorcocktail)) zu isolieren. Nach Auftrennung von 20 µg bzw. 60 µg (für Cleaved-Caspase-3) Protein durch die SDS-PAGE auf einem Tris-Glycin-Gel wurden die Proteine auf Polyvinylidendifluorid-Membranen (Bio-Rad Laboratories) übertragen. Die Membranen wurden mit 1× TBS-T plus 2,5 % BSA bei 4 °C über Nacht blockiert und mit folgenden AK inkubiert: einem monoklonalen Maus-Anti-PCNA-AK (1:5000, Abcam, Cambridge, UK), einem polyklonalen Kaninchen-Anti-Caspase-3-AK (1:1500, Stressgen Biotechnologies, San Diego, CA, USA), einem polyklonalen Kaninchen-Anti-Cleaved-Caspase-3-AK (1:1000, BD Heidelberg, Deutschland) und einem monoklonalen Maus-Anti-β-Aktin-AK (1:20.000; Sigma-Aldrich). Anschließend wurden sekundäre Peroxidase konjugierte Anti-Maus-AK (PCNA; 1:10.000; β-Aktin; 1:60.000) oder Anti-Kaninchen-AK (Caspase-3, 1:8000; Cleaved-Caspase-3, 1:2000) verwendet. Der Proteinnachweis erfolgte durch Luminol verstärkte CL (ECL plus; Thermo Fisher Scientific). Die Darstellung der Proteinexpression wurde mit dem ChemiDoc™ XRS+ System (Bio-

Material und Methoden

Rad Laboratories) erfasst. Die Lumineszenzsignale wurden mit der Image Lab™ Software (v6.0.0 build 25, Bio-Rad Laboratories) ausgewertet, auf β -Aktin normalisiert und anschließend relativ quantifiziert.

6.5 Versuchsablauf

6.5.1 Therapie mit KAP

Die Tiere (NSG, N = 50) wurden in insgesamt vier Gruppen eingeteilt, je Tumorentität eine Gruppe für KAP behandelte und nicht-KAP behandelte (Kontrollgruppe) Mäuse mit jeweils 12 bis 13 Tieren pro Gruppe und Tumorzelllinie. Die Mäuse wurden entsprechend dem Alter und dem Körpergewicht der KAP- und nicht-KAP-behandelten Gruppen alloziert. Die nicht zufällige Zuweisung ergab sich daraus, dass ein Teil der Tiere aus der Kontrollgruppe bereits bei der Auswahl der Tumorzelllinien in den Versuch genommen wurde, sodass für den Hauptversuch mit der KAP Behandlung weniger Kontrolltiere in den Versuch genommen werden mussten.

Die s.c. Injektion von jeweils 1×10^6 humanen Tumorzellen der PEK Zelllinie A431 bzw. der MM Zelllinie A375 in die rechte und linke hintere Flanke erfolgte an Tag null. Die KAP Behandlung begann am vierten Tag nach der Injektion der Tumorzellen und wurde alle vier Tage bis zum Tag 20 wiederholt. An den gleichen Tagen wie der KAP Behandlung wurde die CL-Messung durchgeführt. Die Calipermessung erfolgte ab Tag drei bzw. vier und wurde alle drei bis vier Tage wiederholt. Die MRT und PET/CT Untersuchungen begannen eine Woche nach Tumorzellinjektion und wurden danach jeweils in Woche zwei und drei wiederholt. Am Ende des Tierversuches nach drei Wochen wurden die Mäuse euthanasiert, Vollblut entnommen und die Tumoren für weitere Analysen exzidiert (Abbildung 3).

Tumoren, die nicht s.c. lokalisiert waren, wurden aus der Studie ausgeschlossen (n = 4 in der PEK + KAP-Gruppe und n = 2 in der MM + KAP-Gruppe). Eine Verblindung war aufgrund der KAP Behandlung nicht möglich. Alle nachfolgenden Analysen und Bewertungen der CL-, MRT-, PET/CT-Messungen, immunhistochemischen und molekularbiologischen Proben und der daraus resultierenden Daten wurden verblindet durchgeführt.

Material und Methoden

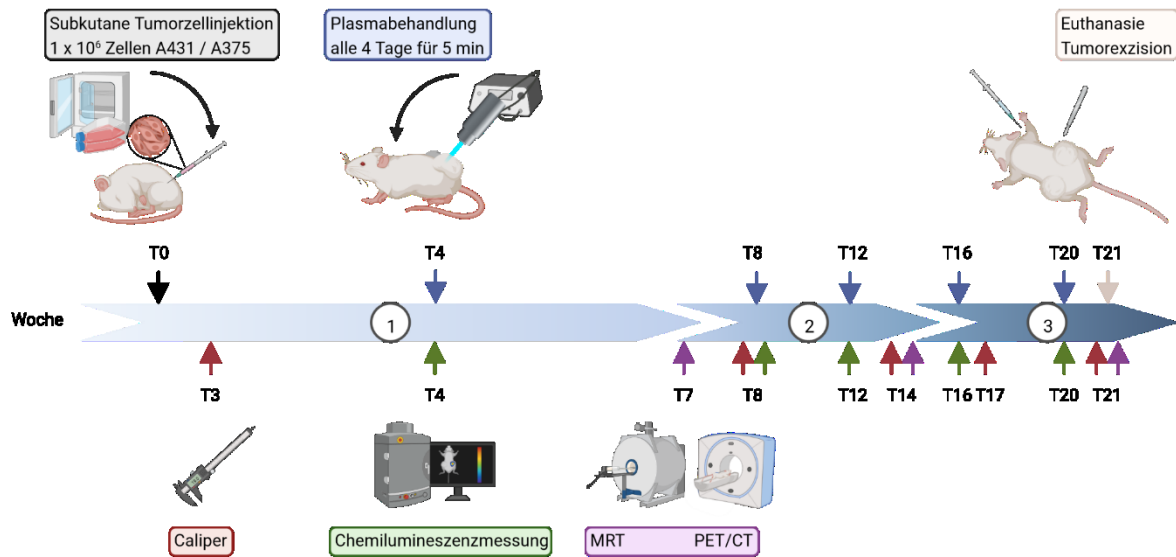


Abbildung 3: Schematischer Versuchsablauf für die Behandlung mit KAP. Bei NSG Mäusen wurden 1×10^6 PEK oder MM Tumorzellen s.c. in die linke und rechte hintere Flanke injiziert. Die NSG Mäuse wurden drei Wochen lang mit oder ohne KAP behandelt. Die KAP Behandlung begann vier Tage nach der Injektion der Tumorzellen und wurde alle vier Tage wiederholt. Die Messung der CL erfolgte an den gleichen Tagen wie die KAP Behandlung. Während der dreiwöchigen Beobachtungszeit wurde das Tumormessgerät alle drei bis vier Tage erfasst, das anatomische Tumormessgerät wurde mittels MRT und das MTV wurde mittels PET/CT bestimmt. Die Messungen wurden eine, zwei und drei Wochen nach der Implantation der Tumorzellen durchgeführt. Nach der *in vivo* Charakterisierung wurden die Tumoren an Tag 21 exzidiert. Grafik erstellt mit BioRender.

Am Ende der Analysen, nach Auswertung und Erhebung der Daten, wurden die Mäuse anhand ihrer individuellen Registrierungsnummer, wieder ihren Gruppen zugeordnet. Um störende Einflussgrößen zu reduzieren, wurden alle Tierversuche mindestens zweimal und zeitunabhängig voneinander durchgeführt.

6.5.2 Therapie von Langzeit KAP stimulierten Zellen

Die NSG Mäuse (N = 31) wurden vor dem Beginn des Tierversuches einer von vier Gruppen zugeordnet. Die Zuordnung in die Gruppen erfolgte durch Generierung von zufälligen Zahlen (Random Number Generator, Stat Trek, <https://stattrek.com/statistics/random-number-generator.aspx>, Zugriff am 7. Mai 2021 um 10:31 Uhr). Für die *in vivo* Versuche wurden die Mäuse entweder der Gruppe mit WPB A431 Zellen zugeordnet oder der Kontrollgruppe mit unbehandelten WT Zellen der PEK Zelllinie A431. Die beiden Zelllinien wurden jeweils aufgeteilt in KAP behandelte oder nicht-KAP behandelte Gruppen mit 7 bis 8 Tieren je Gruppe.

Material und Methoden

An Tag null erfolgte die s.c. Injektion von jeweils 1×10^6 humanen Tumorzellen, entweder WT oder WPB der PEK Zelllinie A431, in die rechte und linke hintere Flanke. Die KAP Behandlung begann am vierten Tag nach der Injektion der Tumorzellen und wurde alle vier Tage bis zum Tag 20 wiederholt. Die Calipermessung erfolgte ab Tag vier und wurde alle drei bis vier Tage wiederholt. Die MRT Messung erfolgte drei Wochen nach Tumorzellimplantation. Am Ende des Tierversuches nach drei Wochen wurden die Mäuse euthanasiert, Vollblut entnommen und die Tumoren für weitere Analysen exzidiert (Abbildung 4).

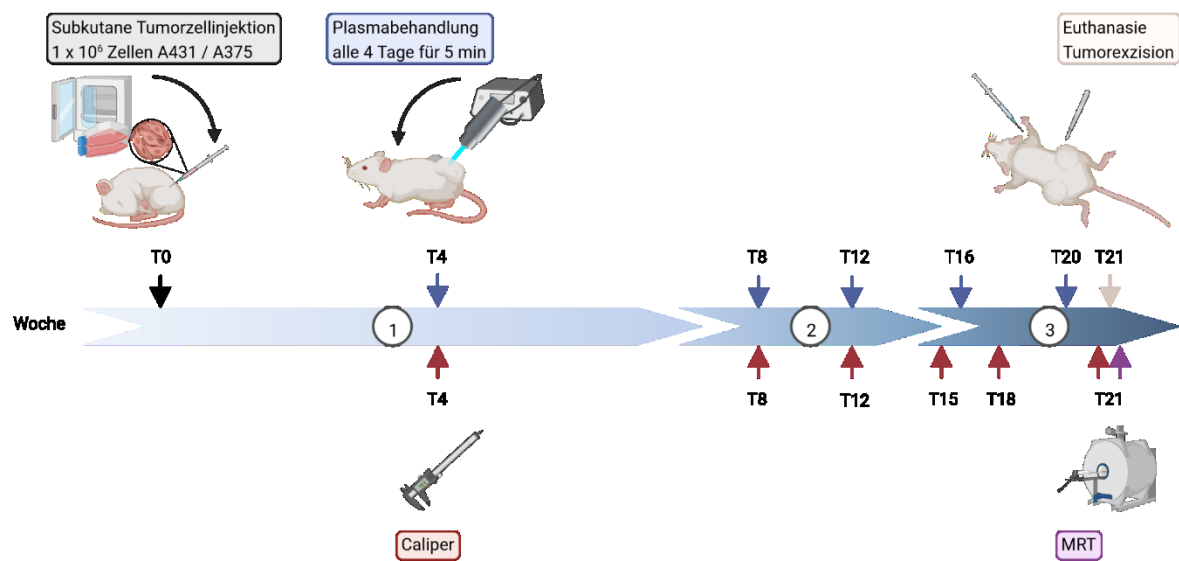


Abbildung 4: Schematischer Versuchsablauf für die Behandlung von Langzeit KAP stimulierten Zellen. Bei NSG Mäusen wurden entweder 1×10^6 WT oder WPB A431 PEK Zellen s.c. in die linke und rechte hintere Flanke injiziert. Die NSG Mäuse wurden drei Wochen lang mit oder ohne KAP behandelt. Die KAP Behandlung begann vier Tage nach der Injektion der Tumorzellen und wurde alle vier Tage wiederholt. Während der dreiwöchigen Beobachtungszeit wurde das Tumolvolumen mittels Caliper alle drei bis vier Tage erfasst. 20 Tage nach Tumorzellimplantation wurde das anatomische Tumolvolumen mittels MRT bestimmt. Nach der *in vivo* Charakterisierung wurden die Tumoren an Tag 21 exzidiert. Grafik erstellt mit BioRender.

Eine Verblindung war aufgrund der KAP Behandlung nicht möglich. Alle nachfolgenden Auswertungen und Analysen wurden verblindet durchgeführt.

6.5.3 Therapie mit small molecules mit und ohne KAP

Für die Behandlung mit small molecules und/oder kaltem Atmosphärendruckplasma wurden insgesamt $N = 48$ NSG Mäuse verwendet. Die Mäuse wurden in sechs Versuchsgruppen

Material und Methoden

zu je 8 Tieren aufgeteilt. Die Tiere wurden den Gruppen durch Generierung von Zufallszahlen zugewiesen (Random Number Generator, Stat Trek, <https://stattrek.com/statistics/random-number-generator.aspx>, Zugriff auf die Website am 7. Mai 2021 um 10:31 Uhr). Damit ergaben sich folgende Gruppen für die small molecules: IS112, SM837 und als Vehikel die Gruppe mit dem LsgM. Die small molecules oder das Vehikel wurden alleine oder in Kombination mit KAP verabreicht.

An Tag null erfolgte die s.c. Injektion von jeweils 1×10^6 humanen A375 MM Tumorzellen in die rechte und linke hintere Flanke. Die KAP Behandlung begann am vierten Tag nach der Injektion der Tumorzellen und wurde alle vier Tage bis zum Tag 20 wiederholt. Die i.p. Injektion der small molecules IS112, SM837 oder dem Vehikel begann eine Woche nach der Implantation der Tumorzellen und wurde jeden zweiten Tag bis zum Tag 21 wiederholt (insgesamt 8 Injektionen pro Tier). Die Calipermessung erfolgte ab Tag drei und wurde alle drei bis vier Tage wiederholt. Am Ende des Tierversuches nach drei Wochen wurden die Mäuse euthanasiert, Vollblut entnommen und die Tumoren für weitere Analysen exzidiert (Abbildung 5).

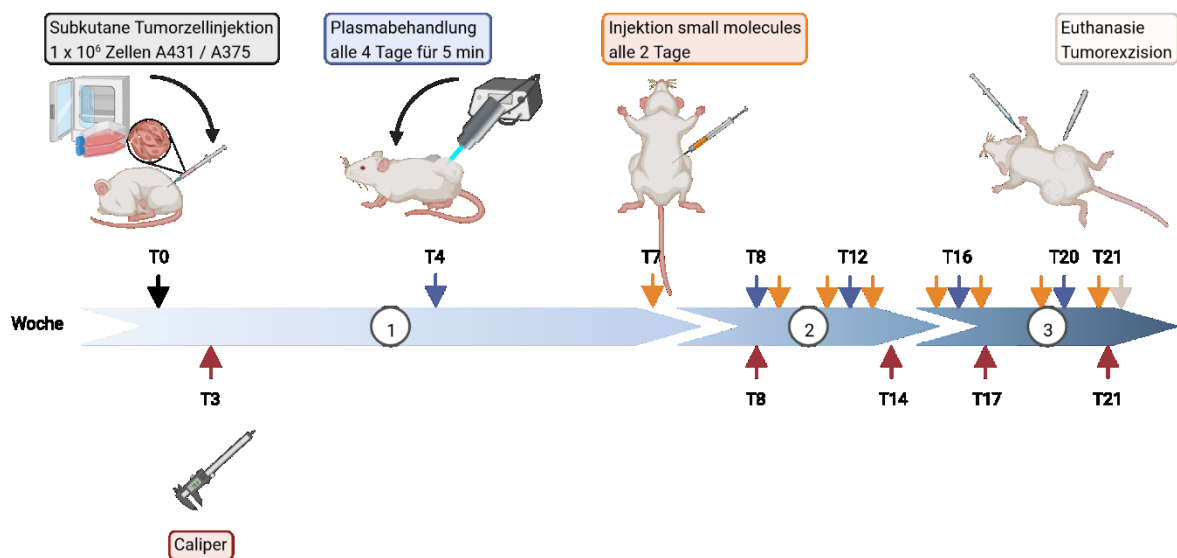


Abbildung 5: Schematischer Versuchsablauf für die Behandlung mit small molecules mit oder ohne Behandlung mit KAP. Bei NSG Mäusen wurden 1×10^6 A375 MM Zellen s.c. in die linke und rechte hintere Flanke injiziert. Die KAP Behandlung begann vier Tage nach der Injektion der Tumorzellen und wurde alle vier Tage wiederholt. An Tag 7 nach Tumorzellimplantation begann die Injektion der small molecules bzw. des LsgM und wurde alle zwei Tage wiederholt. Während der dreiwöchigen Beobachtungszeit wurde das Tumolvolumen mittels Caliper alle drei bis vier Tage erfasst. Nach der *in vivo* Charakterisierung wurden die Tumoren an Tag 21 exzidiert. Grafik erstellt mit BioRender.

Material und Methoden

Eine Verblindung war aufgrund der Behandlung mit KAP und den small molecules nicht möglich. Alle nachfolgenden Auswertungen und Analysen wurden verblindet durchgeführt.

6.6 Statistische Auswertung

Die Werte wurden als Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) für die angegebene Anzahl von Proben angegeben. Datenvisualisierung und Statistik wurden mit GraphPad Prism Software (v8.4.3 (686), GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) durchgeführt. Die Daten wurden mittels Shapiro-Wilk Test auf Normalverteilung analysiert. Für die Bewertung der Veränderungen innerhalb einer Gruppe im Laufe der Zeit wurde eine Zweiweg-Varianzanalyse (ANOVA) für wiederholte Messungen mit anschließender Geisser-Greenhouse Korrektur durchgeführt. Vergleiche zwischen behandelten und unbehandelten Gruppen wurden unter Verwendung der Zweiweg-ANOVA oder des gemischten Modells für Gruppen mit fehlenden Werten durchgeführt, mit einem anschließendem Post-hoc Bonferroni Test, um die p-Werte zu korrigieren. Um behandelte und unbehandelte Gruppen miteinander zu vergleichen, bei denen mindestens für einen Zeitpunkt keine Werte vorlagen, wurde der multiple ungepaarte t-Test verwendet, gefolgt von einem Holm-Sidak Post-hoc Test für Mehrfachvergleiche. Vergleiche mehrerer zeitunabhängiger Gruppen wurden mit Hilfe der Einweg-ANOVA durchgeführt, gefolgt von einem Tukey's Post-hoc Test für Mehrfachvergleiche. Für Gruppen, die nicht normal verteilt waren, wurde der nicht-parametrische Kruskal-Wallis Test mit anschließendem Dunn's Post-hoc Test durchgeführt. Zum Vergleich von zwei Gruppen, wurde der ungepaarte zweiseitige t-Test verwendet bzw. für Gruppen, die nicht normal verteilt waren, wurde der Mann-Whitney U Test verwendet. p-Werte von $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen. Die Signifikanzniveaus werden wie folgt abgekürzt: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$.

7 Ergebnisse

7.1 Auswahl der Tumorzelllinien

Um den Einfluss von KAP und small molecules auf PEK und MM *in vivo* charakterisieren zu können, wurde zu Beginn des Versuchsvorhabens, aus insgesamt vier Tumorzelllinien, jeweils eine PEK und eine MM Zelllinie ausgewählt. Dafür wurden die PEK Zelllinien A431 und SCL-2 sowie die MM Zelllinien A375 und SK-MEL-29 *in vitro* kultiviert. Im Anschluss erfolgte die s.c. Injektion von 1×10^6 Tumorzellen in die rechte und linke hintere Flanke von NSG Mäusen. Nach s.c. Tumorzellinjektion bildeten alle Entitäten innerhalb der folgenden Tage makroskopisch sichtbare Tumoren aus (Anwachsrate = 100 %). Alle Mäuse aus den Gruppen mit MM Zelllinie überlebten den Versuchszeitraum, während zwei Mäuse aus der Gruppe mit der PEK-Zelllinie A431 und zwei Mäuse mit der Zelllinie SCL-2 verstarben. Nach eingehender Untersuchung konnten systemische Metastasen als Todesursache bei allen Mäusen ausgeschlossen werden.

Am Ende der drei wöchigen Versuchsreihe wurde für die Bestimmung des kleinen Blutbildes den NSG Mäusen Vollblut entnommen und dieses an einem Hämatologie-Analysesystem gemessen. Nach drei Wochen zeigte sich bei Mäusen mit Tumoren der PEK Zelllinie A431 ein signifikanter Anstieg der Leukozyten im Vergleich zu Mäusen mit SCL-2 Tumoren. Der Anstieg der Leukozyten fiel im Verhältnis bei der Zelllinie A375 zu der Zelllinie SK-MEL-29 nicht so groß aus (Tabelle 2).

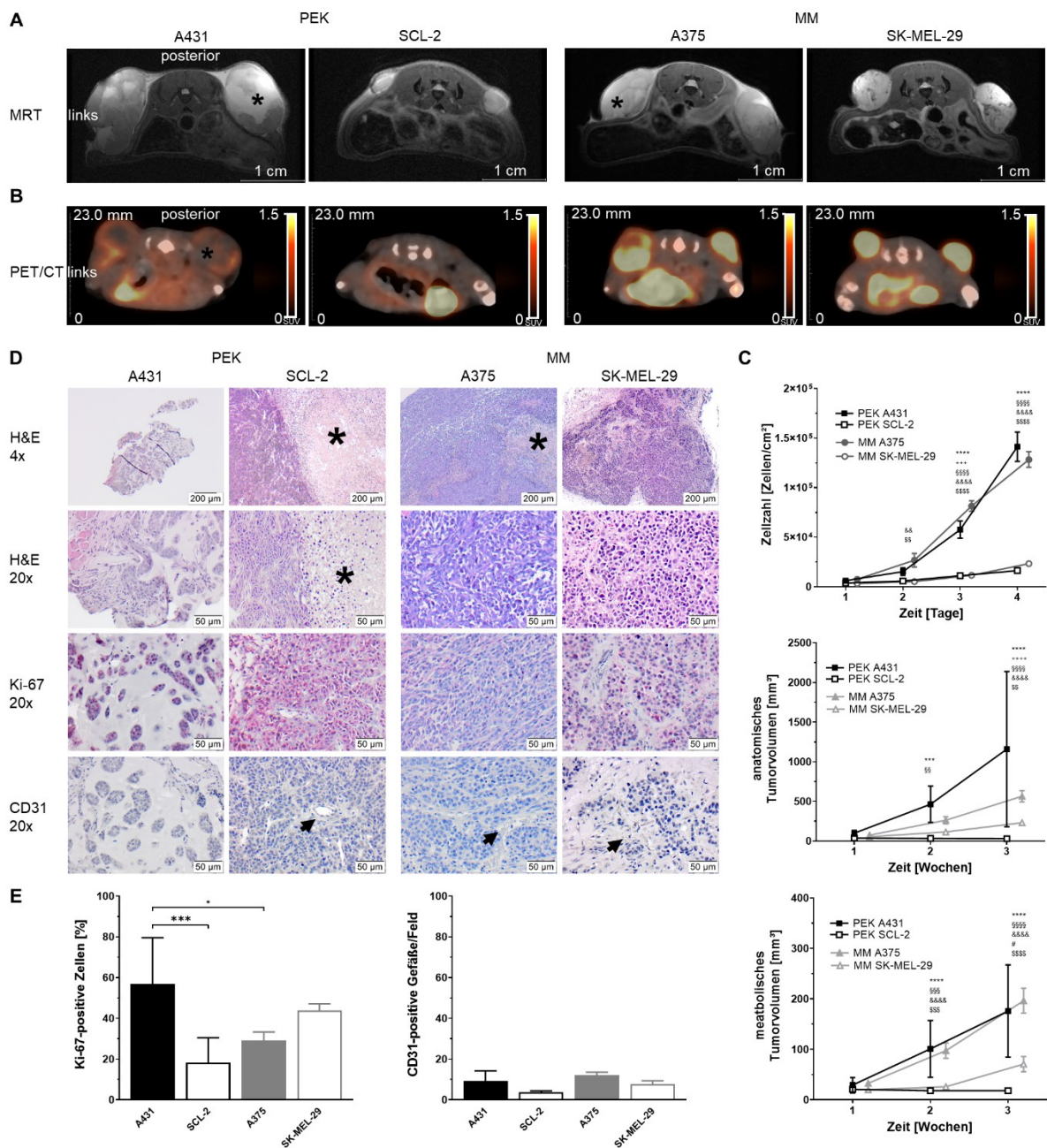
Tabelle 2: Blutbilder für die Auswahl der Tumorzelllinien. NSG Mäuse mit zwei s.c. Flankentumoren, entweder mit der PEK Zelllinie A431 bzw. SCL-2 oder der MM Zelllinie A375 bzw. SK-MEL-29. Die Daten sind als MW \pm SD (n = 7-10) angegeben. Analyse mit ungepaarten zweiseitigem t-Test bzw. Mann-Whitney U Test für nicht-normalverteilte Proben. ** p \leq 0.01; *** p \leq 0.001; **** p \leq 0.0001

		Blutbild (MW \pm SD)				
		LEU [Gpt/L]	ERY [Tpt/L]	HB [mmol/L]	HK	THRO [Gpt/L]
PEK	A431	9,1 \pm 2,9	6,5 \pm 0,5	6,7 \pm 0,6	0,36 \pm 0,03	645 \pm 275
	SCL-2	0,6 \pm 0,6 ****	7,7 \pm 0,6 **	7,8 \pm 0,4 **	0,43 \pm 0,03 ***	652 \pm 253
MM	A375	2,9 \pm 1,3	7,3 \pm 0,4	7,4 \pm 0,3	0,40 \pm 0,02	1044 \pm 148
	SK-MEL-29	1,3 \pm 0,8 **	7,5 \pm 0,5	7,5 \pm 0,5	0,40 \pm 0,02	412 \pm 92 ****

Ergebnisse

Auch zeigten Mäuse, die die Zelllinie A431 s.c. injiziert bekamen, eine Erniedrigung der Erythrozyten, des HB und des HK im Vergleich zu Tieren, die die Zelllinie SCL-2 appliziert bekommen haben. Bei den Tieren mit dem MM als Tumorzellentität kam es nur bei der Zelllinie SK-MEL-29 zu einem signifikanten Abfall der Thrombozyten im Vergleich zu der Zelllinie A375.

Während der dreiwöchigen Beobachtungszeit wurden die Tumoren longitudinal mittels MRT und PET/CT Bildgebung kontrolliert (Abbildung 6 A und B). Ausnahme stellte die Tumorzelllinie SCL-2 dar, bei dieser konnte fast keine Zunahme des Tumolvolumens über den Versuchszeitraum verzeichnet werden.



Ergebnisse

Abbildung 6: Repräsentative MRT, PET/CT und histologische Bilder und quantitative Bestimmung der Zellzahl, des anatomischen und metabolischen Tumorumfangs, sowie immunhistochemische Auswertung. Repräsentative MRT (A; T2-gewichtet, axial, dritte Woche) und PET/CT-Bilder (B; [¹⁸F]FDG; axiale Ebene, dritte Woche) sowie quantitative Bewertung der Zellzahl, des anatomischen und metabolischen Tumorumfangs (C). Repräsentative histologische und immunhistochemische Bilder der H&E-, Ki-67- und CD31-Färbung (D) und quantitative Bewertung (E) zur Charakterisierung der Tumorbiochemie. Bei NSG Mäusen wurden 1×10^6 Tumorzellen entweder der PEK Zelllinie A431 bzw. SCL-2 oder der MM Zelllinie A375 bzw. SK-MEL-29 s.c. in die linke und rechte hintere Flanke injiziert. Während der dreiwöchigen Beobachtungszeit wurden das anatomische Tumorumfang mittels MRT gemessen und das MTV mittels PET/CT bestimmt. Die Messungen wurden eine, zwei und drei Wochen nach der Implantation der Tumorzellen durchgeführt. Nach der *in vivo* Charakterisierung wurden die Tumoren exzidiert und für die histologische Analyse aufbereitet. Sternchen markieren die zentrale Tumornekrose. Pfeile weisen auf CD31-positive Gefäße hin. Die Daten sind als MW \pm SD ((C; Zellzahl) n = 4 Proben pro Zeitpunkt; (C; anatomisches und metabolisches Tumorumfang) n = 16-20 Proben pro Zeitpunkt; (E) n = 6-14 Proben) angegeben. Analyse (C) mit Zweifach-ANOVA gefolgt vom Bonferroni Post-hoc Test für Mehrfachvergleiche. A431 ***p \leq 0.001; ****p \leq 0.0001 vs. SCL-2. A431 +++p \leq 0.001; ****p \leq 0.0001 vs. A375. A431 ^{§§}p \leq 0.01; ^{§§§}p \leq 0.001; ^{§§§§}p \leq 0.0001 vs. SK-MEL-29. SCL-2 &&p \leq 0.01; &&&p \leq 0.0001 vs. A375. SCL-2 #p \leq 0.05 vs. SK-MEL-29. A375 ^{§§}p \leq 0.01; ^{§§§}p \leq 0.001; ^{§§§§}p \leq 0.0001 vs. SK-MEL-29. Analyse (E) mit Kruskal-Wallis Test für nicht-normalverteilte Proben mit Dunn's Post-hoc Test. A431 ***p \leq 0.001 vs. SCL-2. A431 *p \leq 0.05 vs. A375.

Beide bildgebenden Verfahren zeigten, dass es zu einer raschen Vergrößerung des Tumorumfangs kam und die Tumoren teilweise eine inhomogene Struktur ausbildeten. Die einzige Insbesondere die PEK-Zelllinie A431 wies eine eher inhomogene Struktur auf mit einem massiven zentralen Nekrosebereich, wohingegen lebensfähige Tumorzellen eher in der Peripherie auszumachen waren. Im Gegensatz dazu kam es bei der PEK-Zelllinie SCL-2 zu keinerlei solchen Veränderungen.

Um einen Vergleich zwecks des Wachstumsverhaltens der Tumorzelllinien zwischen *in vitro* und *in vivo* Bedingungen vorzunehmen, wurden die zwei PEK Zelllinien A431 und SCL-2 sowie die zwei MM Zelllinien A375 und SK-MEL-29 *in vitro* für vier Tage kultiviert und die Zellzahl an jedem Tag bestimmt. Es zeigte sich, dass die PEK Zelllinie A431 signifikant schneller wuchs als die PEK Zelllinie SCL-2. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der MM Zelllinie A375, diese wuchs ebenfalls innerhalb der vier Tage signifikant schneller als die MM Zelllinie SK-MEL-29 (Abbildung 6 C). Ein ähnliches Bild des Wachstumsverhaltens der verschiedenen Tumorzelllinien konnten mittels der MRT Bildgebung verifiziert werden. Hier zeigte sich, wie schon in der Zellkultur, dass die PEK Zelllinie A431 signifikant der Zelllinie SCL-2 überlegen war. Das anatomische Tumorumfang betrug in Woche drei ca. 1160 mm³ bei A431, bei SCL-2 lediglich ca. 30 mm³. Die MM Tumorzelllinie A375 erreichte in Woche drei ein Volumen von ca. 570 mm³. Somit war das Tumorumfang von A375 ebenfalls signifikant größer als das erreichte Volumen

Ergebnisse

der MM Zelllinie SK-MEL-29 von ca. 230 mm³ (Abbildung 6 C). Dieses überlegene Wachstumsverhalten der Zelllinien A431 und A375, im Vergleich zu ihrem Pendant SCL-2 bzw. SK-MEL-29, konnte mit dem MTV bestätigt werden. Das MTV wurde mittels [18F]FDG PET/CT erhoben. Hier war das MTV von A431 ca. 10 mal so groß wie das von SCL-2. Das von A375 war ungefähr 3 mal so groß wie das von SK-MEL-29 (Abbildung 6 C). Diese Beobachtungen konnten in der H&E-Färbung des Tumorgewebes am Ende der *in vivo* Experimente verifiziert werden (Abbildung 6 D). Dementsprechend fanden sich Ki-67-positive Zellen hauptsächlich in der Peripherie der Tumoren sowie dünne Gefäße mit geringem Durchmesser, die von CD31-positiven Zellen gebildet wurden (Abbildung 6 D). Insbesondere die Zelllinie A431 wies einen signifikant höheren Anteil an Ki-67 positiver Zellen auf im Vergleich zu der Zelllinie SCL-2 und A375. Es konnten bei der Anzahl der CD-31 positiven Gefäße keine Unterschiede zwischen den einzelnen Tumorzelllinien ausgemacht werden (Abbildung 6 E).

Um eine Aussage über die Zellularität der einzelnen Tumoren treffen zu können, wurde zusätzlich zu dem T2 gewichteten MRT ein diffusionsgewichtetes MRT durchgeführt. Als Zeichen der Maturierung nahm bei allen vier Tumorzelllinien die zelluläre Dichte des Tumors über den Versuchszeitraum zu. Dies ist durch eine Reduktion des freien Wassers innerhalb des Tumorgewebes, welches über ein Absinken der ADC Werte über die drei Wochen verifiziert werden konnte, gekennzeichnet (Tabelle 3). Einzig die PEK Zelllinien A431 und SCL-2 zeigten von Woche zwei zu drei keinen weiteren Anstieg der Zelldichte, was bei der Zelllinie A431 auf eine ausgeprägte zentrale Nekrose zurückgeführt werden kann und damit einhergehend mit einem Anstieg des freien Wassers in diesem Bereich sowie bei der Zelllinie SCL-2 auf eine mangelnde Zunahme des Tumolvolumens. Bei den PEK Zelllinien zeigte die Zelllinie SCL-2 lediglich in Woche eins eine geringere Zelldichte als die Zelllinie A431, während bei den MM Zelllinien die Zelllinie SK-MEL-29 nach drei Wochen eine geringere Zellularität innerhalb des Tumorgewebes aufwies im Vergleich zu der Zelllinie A375.

Ergebnisse

Tabelle 3: Diffusionsgewichtete MRT Bildgebung für die Auswahl der Tumorzelllinien. Daten des ADC, bewertet mit diffusionsgewichteter MRT Bildgebung. NSG Mäuse mit zwei s.c. Flankentumoren, entweder mit der PEK Zelllinie A431 bzw. SCL-2 oder der MM Zelllinie A375 bzw. SK-MEL-29, wurden über einem Zeitraum von drei Wochen, einmal die Woche gemessen. Die Daten sind als MW \pm SD (n = 16-20 Proben pro Zeitpunkt) angegeben. Analyse mit gemischten Modell gefolgt vom Bonferroni Post-hoc Test für Mehrfachvergleiche. A431 **** p \leq 0.0001 vs. SCL-2; A375 * p \leq 0.05 vs. SK-MEL-29. ## p \leq 0.01; ### p \leq 0.001; #### p \leq 0.0001.

scheinbarer Diffusionskoeffizient [$\times 10^{-3}$ mm ² /s]					
A431 (MW \pm SD)			SCL-2 (MW \pm SD)		
	Woche 1	1.13 \pm 0.17		1.42 \pm 0.12	****
PEK	Woche 2	1.01 \pm 0.18	zu Woche 1 ##	1.14 \pm 0.23	zu Woche 1 ####
	Woche 3	1.07 \pm 0.26		1.11 \pm 0.11	zu Woche 1 ####
A375 (MW \pm SD)			SK-MEL-29 (MW \pm SD)		
	Woche 1	1.35 \pm 0.23		1.38 \pm 0.12	
MM	Woche 2	1.02 \pm 0.19	zu Woche 1 ####	1.10 \pm 0.18	zu Woche 1 ####
	Woche 3	0.84 \pm 0.09	zu Woche 1 ####; zu Woche 2 ###	0.97 \pm 0.18	zu Woche 1 ####; zu Woche 2 ###; *

Aufgrund der gewonnenen Daten, insbesondere des größeren Tumorzellvolumens nach drei Wochen innerhalb der Zelllinien einer Tumorentität, wurden für die weiteren Versuche mit KAP, small molecules oder einer Kombination dieser beiden Behandlungsoptionen die Zelllinie A431 für das PEK und die Zelllinie A375 für das MM ausgewählt.

7.2 Auswirkung von KAP auf das Tumorwachstum und den -metabolismus

Im ersten Schritt sollte die Wirksamkeit der genutzten KAP Quelle und des gewählten Behandlungszeitraumes verifiziert werden. Davon ausgehend, dass die RS Bildung eine der Hauptwirkmechanismen bei der Vermittlung von antikanzerogenen Effekten bei der Behandlung mit KAP ist [59], sollten diese RS nachgewiesen werden. Dazu wurde getestet, ob es durch die Behandlung der s.c. Tumoren mit KAP zu einem Anstieg von RS innerhalb des Tumorgewebes kommt.

Um die unter der KAP Behandlung entstehenden RS nicht invasiv und *in vivo* im Tumorgewebe indirekt nachweisen zu können, wurde die CL-Sonde L-012 verwendet. Die Lumineszenzintensität wurde sowohl bei unbehandelten als auch bei KAP-behandelten Mäusen gemessen. Bei Letzteren wurde die CL-Intensität sowohl vor als auch nach der KAP Behandlung

Ergebnisse

gemessen (Abbildung 7 A - D). Bei beiden Tumorentitäten führte die KAP Behandlung zu einer signifikanten Erhöhung der RS im Tumor. Im Gegensatz dazu waren unbehandelte Tumoren und Tumoren vor der KAP Behandlung durch ein vernachlässigbares CL-Signal nach Verabreichung von L-012 gekennzeichnet (Abbildung 7 B, D).

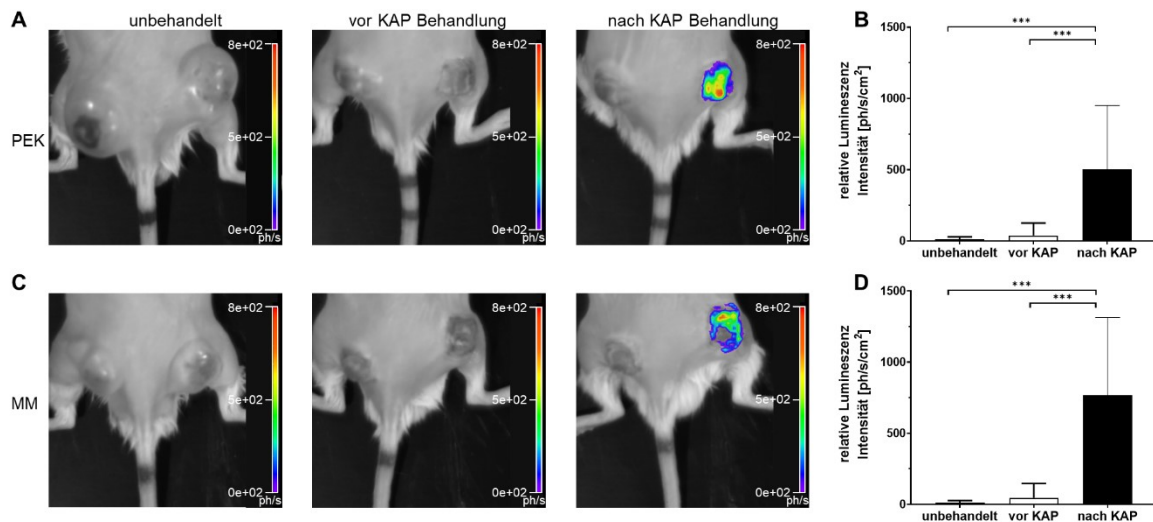


Abbildung 7: Lumineszenzmessung reaktiver Spezies induziert durch KAP Behandlung. Repräsentative Lumineszenzbilder (A, C; Lumineszenzsonde: L-012) und quantitative Bewertung der relativen Lumineszenzintensität (B, D). NSG Mäuse mit zwei s.c. Flankentumoren, entweder PEK oder MM, wurden drei Wochen lang mit oder ohne KAP behandelt. Die KAP Behandlung begann vier Tage nach der Injektion der Tumorzellen und wurde alle vier Tage wiederholt. L-012 wurde i.p. injiziert und die Lumineszenzintensität wurde vor und nach der KAP Behandlung gemessen. Die Messung wurde zwei Stunden vor und unmittelbar nach der KAP Behandlung durchgeführt. Die Daten sind als MW \pm SD (n = 10-15) angegeben. Analyse mit Einweg-ANOVA gefolgt vom Tukey's Post-hoc Test für Mehrfachvergleiche. *** p \leq 0,001 im Vergleich zu unbehandeltem PEK bzw. MM oder vor der KAP Behandlung von PEK bzw. MM.

Um festzustellen, ob die KAP Behandlung die Tumorprogression durch lokale Erwärmung beeinflussen könnte, wurde die Temperatur der Hautoberfläche der Tumoren vor und unmittelbar nach der Behandlung gemessen. Während der KAP Behandlung stieg die mittlere Hauttemperatur um $4,5 \pm 2,0$ °C im Vergleich zur normalen Hauttemperatur von $32,2 \pm 2,5$ °C und erreichte ein Maximum von $37,8 \pm 2,8$ °C. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine leichte Hyperthermie zu der antikanzerogenen Wirkung von KAP beigetragen haben könnte.

Im nächsten Schritt wurde die Tumorprogression der zwei Tumorentitäten unter der Behandlung mit KAP beurteilt. Wie in Abschnitt 6.5.1 beschrieben, begann die KAP Behandlung

Ergebnisse

am vierten Tag nach der s.c. Tumorimplantation und wurde alle vier Tage bis zum Versuchsende nach drei Wochen wiederholt. Um die Wirkung der KAP Therapie auf das Tumorstadium zu beurteilen, wurden die Tumorstadien sowohl mit Caliper, für eine initiale Beurteilung des Tumorstadiums, als auch mit MRT gemessen. Die Caliper Daten sind im Anhang aufgeführt (Abbildung A 1 A, B).

In der T2 gewichteten MRT Bildgebung so wie in der Caliper Messung zeigte sich eine signifikante Zunahme des Tumorstadiums beider Tumorentitäten in der KAP-behandelten und der unbehandelten Gruppe während des Beobachtungszeitraums (jeweils $p \leq 0,05$). Die Behandlung der s.c. gelegenen Tumoren mit KAP bewirkte eine signifikante Verringerung des anatomischen Tumorstadiums in Woche eins, zwei und drei bei beiden Tumorentitäten im Vergleich zu den nicht behandelten Tumoren. Das Tumorstadium war sowohl beim MM als auch beim PEK in Woche drei durch die KAP Behandlung um etwa 50 % verringert (Abbildung 8 A-D).

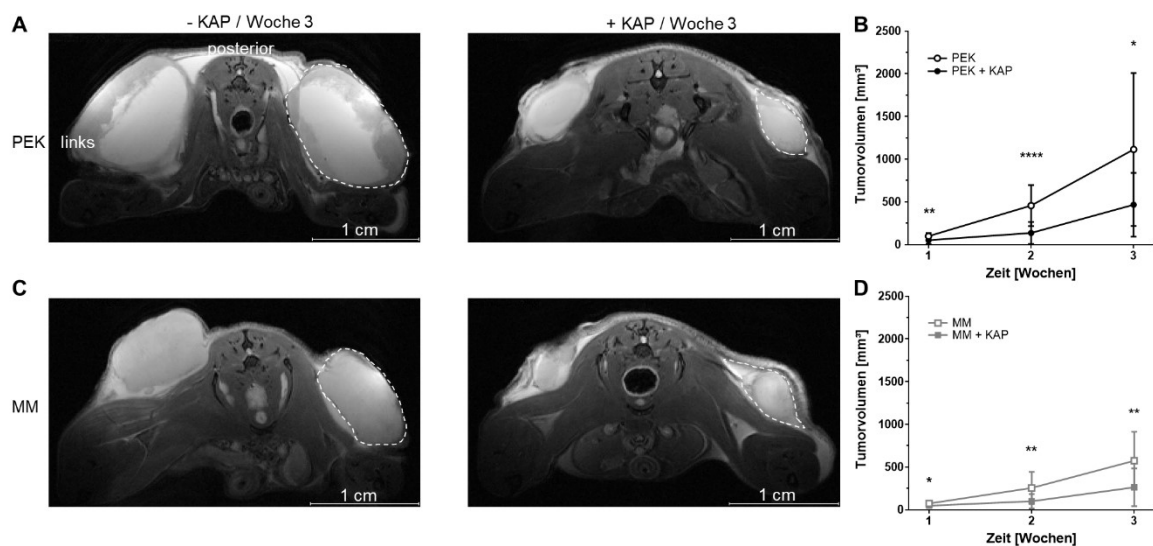


Abbildung 8: Bestimmung des anatomischen Tumorstadiums mittels MRT. Repräsentative MRT-Bilder (A, C; T2-gewichtet, axial) und quantitative Bewertung des Tumorstadiums (B, D). NSG Mäuse mit s.c. Flankentumoren, entweder PEK oder MM, wurden drei Wochen lang mit oder ohne KAP behandelt. Die KAP Behandlung begann vier Tage nach der Injektion der Tumorzellen und wurde alle vier Tage wiederholt. Die KAP Behandlung führte zu einer signifikanten Verringerung des Wachstums von PEK und MM während der dreiwöchigen Beobachtungszeit. Leere Symbole stehen für unbehandelte Tumoren, gefüllte Symbole für KAP behandelte Tumoren. Die Daten sind als MW \pm SD ($n = 20-24$ Proben pro Zeitpunkt) angegeben. Analyse mit Zweifweg-ANOVA gefolgt vom Bonferroni Post-hoc Test für Mehrfachvergleiche. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; **** $p \leq 0,0001$ im Vergleich zu unbehandeltem PEK oder MM. Die gestrichelte Linie markiert das rechte Tumorstadium.

Ergebnisse

Bereits bei der Auswahl der endgültigen Tumorzelllinien (Abschnitt 7.1) für die jeweilige Tumorentität fiel das inhomogene Wachstum, insbesondere die Ausbildung einer zentralen Nekrose, bei einiger der Zelllinien auf. Um einen Einfluss der zentralen Nekrose auf die Bestimmung der Tumorumfänge und somit eine potentielle Verfälschung des Behandlungseffektes mit KAP zu beurteilen, wurden alle Tumoren in der T2 gewichteten MRT Bildgebung jeweils einmal mit zentraler Nekrose und einmal ohne zentrale Nekrose (ozN) ausgewertet. Beim PEK zeigte sich ein deutlicher Unterschied des Tumorumfanges zwischen der Auswertung mit oder ohne zentrale Nekrose sowohl bei unbehandelten als auch bei KAP-behandelten Tumoren (Abbildung 9 A). Signifikant größer war das Tumorumfang durch die Ausbildung einer zentralen Nekrose jedoch nur in Woche 2 bei PEK unbehandelten Tumoren. Beim MM konnten keine Unterschiede bei der Auswertung, hinsichtlich der Ausbildung einer zentralen Nekrose, gemacht werden (Abbildung 9 B). Aufgrund des nicht signifikanten Unterschiedes der Tumorumfänge, mit Ausnahme von Woche 2 beim unbehandelten PEK, wurden das gesamte Tumorumfang, einschließlich der zentralen Nekrose, für die Bewertung des anatomischen Tumorumfanges für alle weiteren Versuche herangezogen.

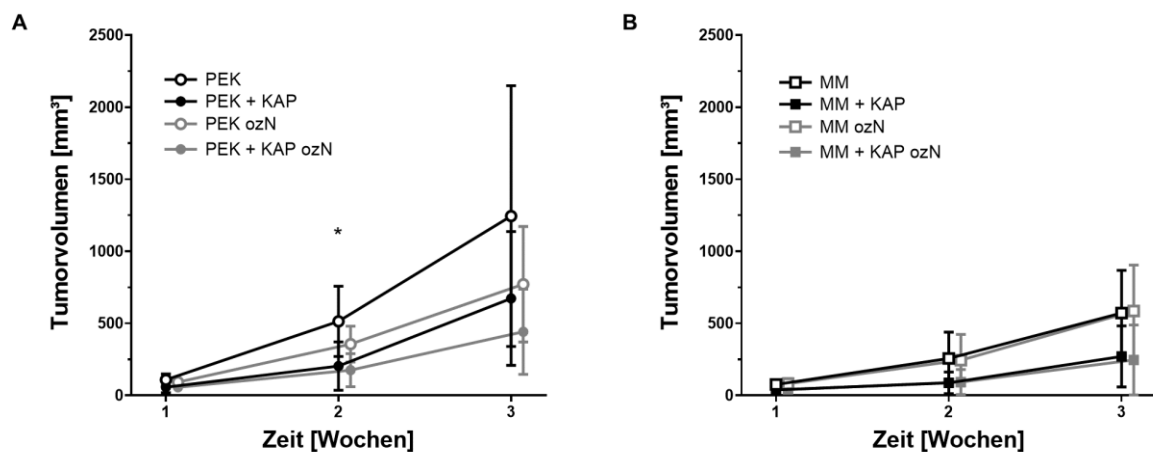


Abbildung 9: Bestimmung des anatomischen Tumorumfanges mittels MRT mit und ohne zentrale Nekrose. Quantitative Bewertung des Tumorumfanges des PEK (A) und des MM (B). NSG Mäuse mit s.c. Flankentumoren, entweder PEK oder MM, wurden drei Wochen lang mit oder ohne KAP behandelt. Die KAP Behandlung begann vier Tage nach der Injektion der Tumorzellen und wurde alle vier Tage wiederholt. Die Auswertung ohne der zentralen Nekrose (ozN) ergab beim PEK einen deutlichen Unterschied zu den Tumoren mit zentraler Nekrose. Leere Symbole stehen für unbehandelte Tumoren, gefüllte Symbole für KAP behandelte Tumoren. Die Daten sind als MW \pm SD (n = 20-27 Proben pro Zeitpunkt) angegeben. Analyse mit Zweiweg-ANOVA gefolgt vom Bonferroni Post-hoc Test für Mehrfachvergleiche. * p \leq 0,05 im Vergleich zu PEK mit zentraler Nekrose.

Ergebnisse

Um die Zelldichte innerhalb der Tumoren zu beurteilen, wurde zusätzlich zu dem T2 gewichteten MRT ein diffusionsgewichtetes MRT durchgeführt. Beide Tumorentitäten zeigten im Laufe der Zeit leicht abnehmende ADC Werte (Tabelle 4), was die Entwicklung zu soliden Tumoren widerspiegelt. Interessanterweise wiesen die mit KAP-behandelten Tumoren zu allen drei Zeitpunkten (Woche eins, zwei und drei) tendenziell höhere ADC Werte auf als die unbehandelten Tumoren (Tabelle 4). Diese Daten deuten auf eine Verringerung der zellulären Dichte bei gleichzeitiger Zunahme des freien Wassers hin, was auf eine therapeutische Wirksamkeit von KAP schließen lässt.

Tabelle 4: Diffusionsgewichtete MRT Bildgebung. Daten des ADC, bewertet mit diffusionsgewichteter MRT Bildgebung. NSG Mäuse mit zwei s.c. Flankentumoren, entweder PEK oder MM, wurden drei Wochen lang mit oder ohne KAP behandelt. Die KAP Behandlung begann vier Tage nach der Injektion der Tumorzellen und wurde alle vier Tage wiederholt. Die Daten sind als MW \pm SD (n = 12-20 Proben pro Zeitpunkt) angegeben. Analyse mit gemischten Modell gefolgt vom Bonferroni Post-hoc Test für Mehrfachvergleiche. **** p \leq 0.0001 vs. unbehandeltes MM. # p \leq 0.05; ## p \leq 0.01; ### p \leq 0.001; #### p \leq 0.0001.

scheinbarer Diffusionskoeffizient [$\times 10^{-3}$ mm ² /s]					
		- KAP (MW \pm SD)		+ KAP (MW \pm SD)	
PEK	Woche 1	1.13 \pm 0.17		1.16 \pm 0.16	
	Woche 2	1.01 \pm 0.18	zu Woche 1 ##	1.07 \pm 0.10	
	Woche 3	1.07 \pm 0.26		1.19 \pm 0.18	
MM	Woche 1	1.35 \pm 0.23		1.44 \pm 0.30	
	Woche 2	1.02 \pm 0.19	zu Woche 1 #####	1.15 \pm 0.19	zu Woche 1 #
	Woche 3	0.84 \pm 0.09	zu Woche 1#####; zu Woche 2 ###	1.03 \pm 0.13	zu Woche 1###; zu Woche 2##; ****

Um die Wirkung von KAP auf das MTV der beiden Tumorentitäten zu beurteilen, wurden als nächstes PET/CT Untersuchungen mit dem Radiotracer [¹⁸F]FDG durchgeführt (Abbildung 10 A-D). Die Untersuchung wurde durchgeführt, weil angenommen werden konnte, dass die Reduktion der Tumorprogression durch die Behandlung mit KAP, wie durch die MRT Bildgebung bestätigt, eventuell auf eine Reduktion von metabolisch aktiven Tumorzellen zurückzuführen ist.

Diese Annahme wurde über den Beobachtungszeitraum falsifiziert. Drei Wochen nach der KAP Behandlung konnte beim PEK keine Wirkung auf das MTV festgestellt werden (Abbildung 10 B). Im Gegensatz dazu reduzierte die KAP Behandlung das MTV tendenziell beim MM im Verlauf des dreiwöchigen Versuchszeitraumes (Abbildung 10 D).

Ergebnisse

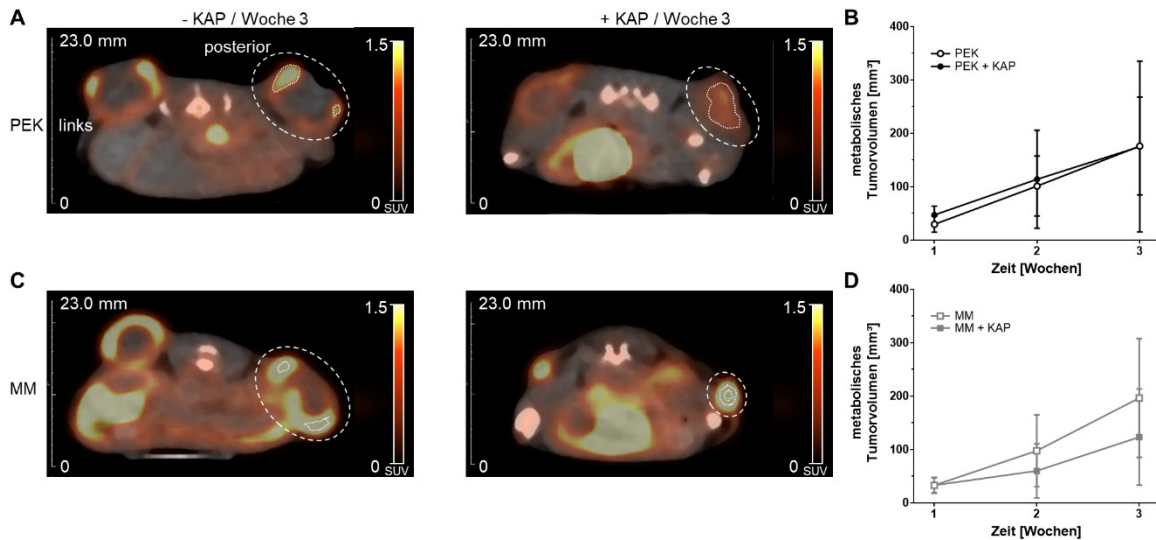


Abbildung 10: Bestimmung des MTV mittels $[^{18}\text{F}]$ FDG PET/CT. Repräsentative PET/CT-Bilder von $[^{18}\text{F}]$ FDG (A,C; axiale Ebene) und quantitative Bewertung des MTV (B,D). NSG Mäuse mit zwei s.c. Flankentumoren, entweder PEK oder MM, wurden drei Wochen lang mit oder ohne KAP behandelt. Die KAP Behandlung begann vier Tage nach der Injektion der Tumorzellen und wurde alle vier Tage wiederholt. Die Daten sind als MW \pm SD (n = 6-20 Proben pro Zeitpunkt) angegeben. Analyse mit gemischtem Modell gefolgt vom Bonferroni Post-hoc Test für Mehrfachvergleiche. Die gepunktete Linie mit den langen Strichen markiert das manuell eingezeichnete VOI. Die gepunktete Linie mit den kurzen Strichen markiert das rechte MTV.

7.3 Auswirkung von KAP auf die Tumorbilogie

Weiterführend sollten die Auswirkungen der Behandlung von heterotopen s.c. Flankentumoren mit KAP, nach der Beendigung der *in vivo* Versuche, hinsichtlich immunhistochemischer, molekularbiologischer Aspekte und unter verschiedenen hämatologischen Gesichtspunkten betrachtet und beurteilt werden.

Dafür wurde wie bereits in Abschnitt 7.1 das kleine Blutbild nach der Vollblutentnahme analysiert. Auch hier zeigte sich, dass es zu einer Erhöhung der Leukozytenzahl im peripheren Blut von Tieren kam, die die PEK Zelllinie A431 trugen (Tabelle 5). Die Anzahl der Leukozyten wurde durch die Behandlung mit KAP zwar tendenziell reduziert, dieses Absinken war aber nicht signifikant. Zudem konnte einem Absinken der Erythrozytenzahl bei Tieren, die mit KAP behandelt wurden, bei beiden Tumorentitäten entgegengewirkt werden. Dies war beim MM auch signifikant ($p \leq 0.001$) mit $9,0 \pm 0,7$ Tpt/L bei KAP-behandelten Tieren im Vergleich zu $7,8 \pm 0,9$ Tpt/L bei unbehandelten Tieren. Ebenfalls wurde das HB bei KAP-behandelten Tieren mit dem MM positiv beeinflusst (** $p \leq 0.01$). Hingegen kam es bei beiden Tumorentitäten nach der Behandlung mit KAP zu einem signifikanten Absinken der Thrombozyten.

Ergebnisse

Tabelle 5: Blutbild nach der Behandlung mit KAP. NSG Mäuse mit zwei s.c. Flankentumoren, entweder PEK oder MM, wurden drei Wochen lang mit oder ohne KAP behandelt. Die KAP Behandlung begann vier Tage nach der Injektion der Tumorzellen und wurde alle vier Tage wiederholt. Die Daten sind als MW \pm SD (n = 13-18) angegeben. Analyse mit ungepaarten zweiseitigem t-Test bzw. Mann-Whitney U Test für nicht-normalverteilte Proben. * p \leq 0.05; ** p \leq 0.01; *** p \leq 0.001; **** p \leq 0.0001.

Blutbild (MW \pm SD)					
	LEU [Gpt/L]	ERY [Tpt/L]	HB [mmol/L]	HK	THRO [Gpt/L]
PEK	9,7 \pm 3,0	7,3 \pm 1,5	7,1 \pm 1,3	0,40 \pm 0,10	559 \pm 220
PEK + KAP	8,8 \pm 4,7	8,2 \pm 0,6	7,3 \pm 0,6	0,38 \pm 0,03	387 \pm 129 *
MM	2,7 \pm 1,1	7,8 \pm 0,9	7,6 \pm 0,4	0,41 \pm 0,02	882 \pm 283
MM + KAP	2,7 \pm 1,0	9,0 \pm 0,7 ***	8,2 \pm 0,6 **	0,42 \pm 0,02	476 \pm 138 ****

Für die Beurteilung des Einflusses von KAP auf die Proliferation, Apoptose, Neoangiogenese und Inflammation wurden nach Beendigung der *in vivo* Experimente die Tumoren exzidiert. Die immunhistochemische Auswertung ergab eine signifikante Verringerung der Ki-67-positiven Zellen nach KAP Behandlung beim PEK (p \leq 0,01 im Vergleich zur unbehandelten Gruppe) (Abbildung 11 A). Im Gegensatz dazu wurden keine Unterschiede in Bezug auf das Vorhandensein von apoptotischen Zellen, CD31-positiven Gefäßen, CAE-positiven Granulozyten und F4/80-positiven Makrophagen zwischen unbehandelten und KAP-behandelten Tumoren festgestellt (Abbildung 11 A, B). Im Einklang mit diesen Ergebnissen zeigte die Analyse der Proteinexpression von PCNA, Caspase-3 und Cleaved-Caspase-3 keine signifikanten Veränderungen zwischen behandelten und unbehandelten Tumoren (Abbildung 11 C-F).

Ergebnisse

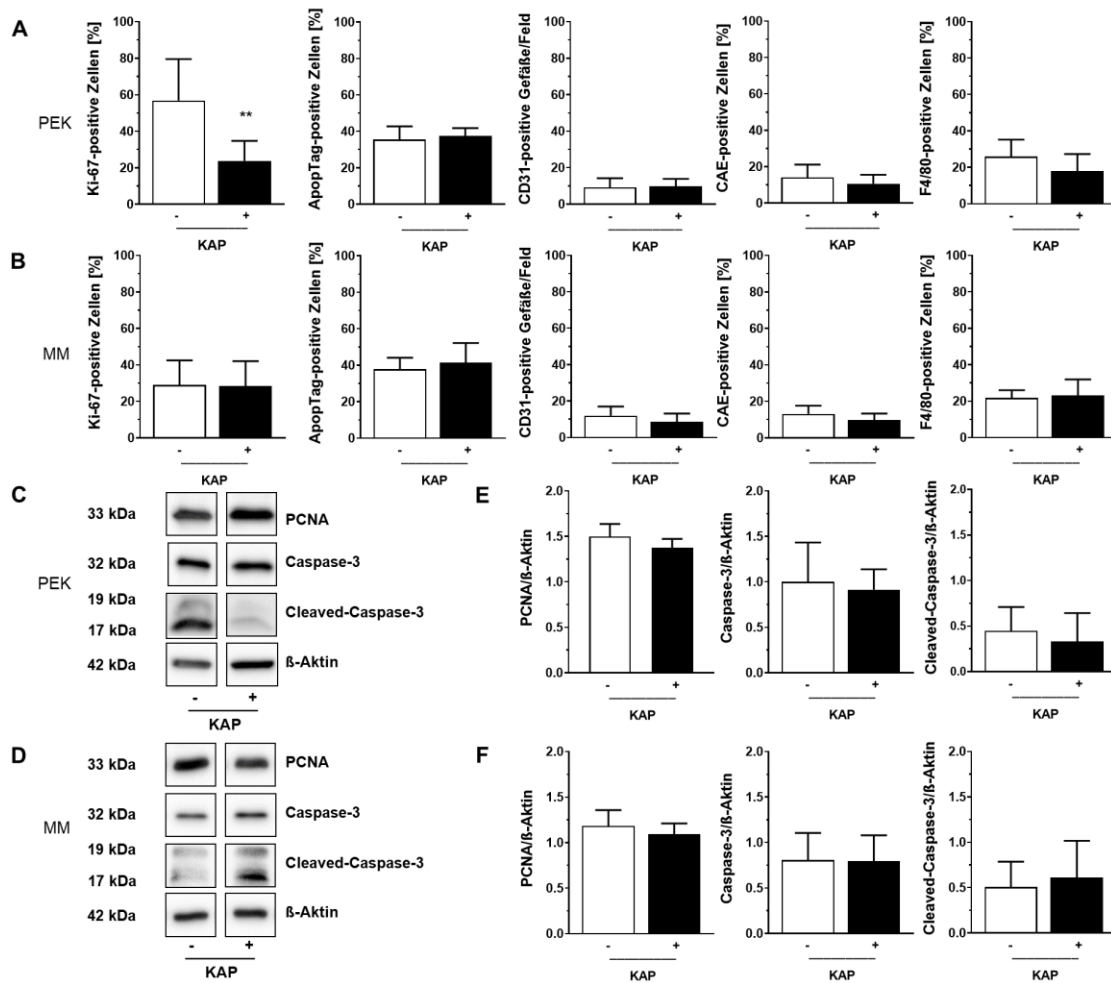


Abbildung 11: Analyse der Tumorbiologie. Quantitative immunohistochemische Bewertung der Ki-67-, Apoptag®, CD31-, CAE- und F4/80 Expression (A, B) sowie repräsentative Bilder (C, D) und quantitative Western-Blot-Analyse von PCNA, Caspase-3 und Cleaved-Caspase-3 (E, F) von PEK bzw. MM Tumoren. NSG Mäuse mit zwei s.c. Flankentumoren, entweder PEK oder MM, wurden drei Wochen lang mit oder KAP behandelt. Die KAP Behandlung begann vier Tage nach der Injektion der Tumorzellen und wurde alle vier Tage wiederholt. Nach drei Wochen wurden die Tumoren exzidiert und für immunohistochemische und molekularbiologische Analysen aufbereitet. Die Daten sind als MW \pm SD angegeben (Immunohistochemie: n = 8-14; Molekularbiologie: n = 5-8). Analyse mit ungepaarten zweiseitigem t-Test. ** $p \leq 0,01$ vs. unbehandeltem PEK.

Mithilfe eines Bead-basierten Multiplex Assays wurde anschließend die Zytokinfreisetzung im Plasma von KAP-behandelten und unbehandelten Tieren gemessen (Abbildung 12 A, B). Es konnte festgestellt werden, dass sowohl die Plasmaspiegel von IL9 und IL17F signifikant bei Tieren der Gruppe mit KAP-behandelten PEK Tumoren erhöht waren. Im Gegensatz dazu war nach der Behandlung mit KAP bei der Gruppe mit den MM Tumoren lediglich IL2 signifikant erhöht, während die Plasmaspiegel der anderen Zytokine nicht durch die KAP Behandlung beeinflusst wurden.

Ergebnisse

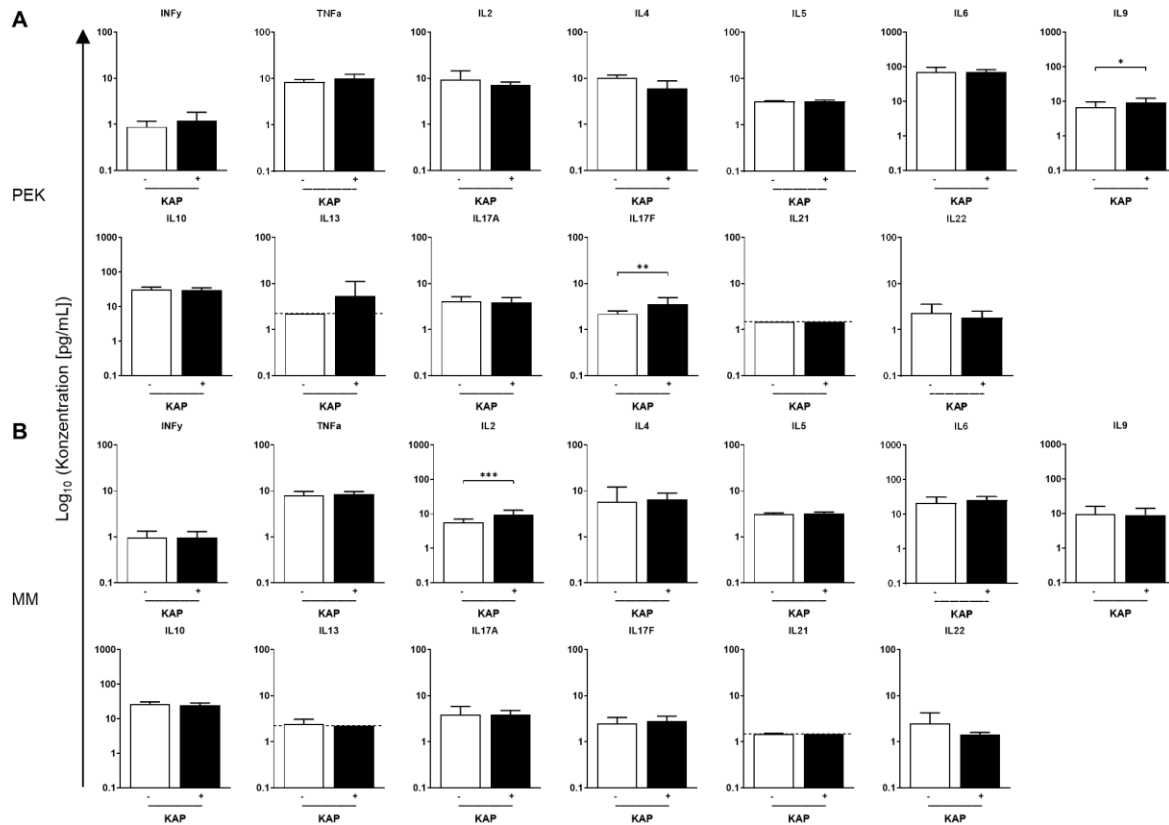


Abbildung 12: Zytokinbestimmung nach der Behandlung mit KAP (A und B). Quantitative Bewertung des Zytokinprofils (A, B) vom Plasma von NSG Mäusen mit PEK bzw. MM Tumoren. NSG Mäuse mit zwei s.c. Flankentumoren, entweder PEK oder MM, wurden drei Wochen lang mit oder ohne KAP behandelt. Die KAP Behandlung begann vier Tage nach der Injektion der Tumorzellen und wurde alle vier Tage wiederholt. Nach drei Wochen wurde Vollblut entnommen und das Plasma mittels Bead-basierter durchflusszytometrischer Multiplex Analyse untersucht. Die Daten sind als MW ± SD angegeben (n = 4-6). Analyse mit ungepaarten zweiseitigem t-Test. * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001 vs. unbehandeltem PEK oder MM. Gestrichelte Linie ist die unterste Detektionsgrenze.

7.4 Auswirkung von KAP auf Langzeit KAP stimulierte Tumorzellen

In einem nächsten Schritt sollte in Kooperation mit dem INP in Greifswald untersucht werden, ob eine wiederholte Behandlung von Tumoren mit KAP zur Ausbildung einer Resistenz gegen die KAP Behandlung führt. Dafür wurden im INP in Greifswald A431 PEK Tumorzellen *in vitro*, über einen Zeitraum von 8 Wochen, einmal wöchentlich mit KAP behandelt.

Um die Behandlungsreaktionen der PEK Tumorzelllinie A431 *in vivo* zu bewerten, wurde wie in Abschnitt 7.1 und 7.2 das Xenograft Modell mit NSG Mäusen für die Experimente verwendet. Dafür wurden den Mäusen 1×10^6 Tumorzellen der WT und der WPB Zelllinie s.c. in beide hintere Flanken injiziert. Die tumortragenden Mäuse wurden alle vier Tage, ab Tag vier, mit KAP behandelt oder blieben für die Kontrolle unbehandelt. Die Tumorprogression wurde

Ergebnisse

anhand des Tumorzvolumens über den gesamten Versuchszeitraum mit dem Caliper erfasst und am Ende der Beobachtungszeit, für eine exakte Bestimmung des anatomischen Tumorzvolumens, mittels der MRT Bildgebung verifiziert (Abbildung 13 A-D).

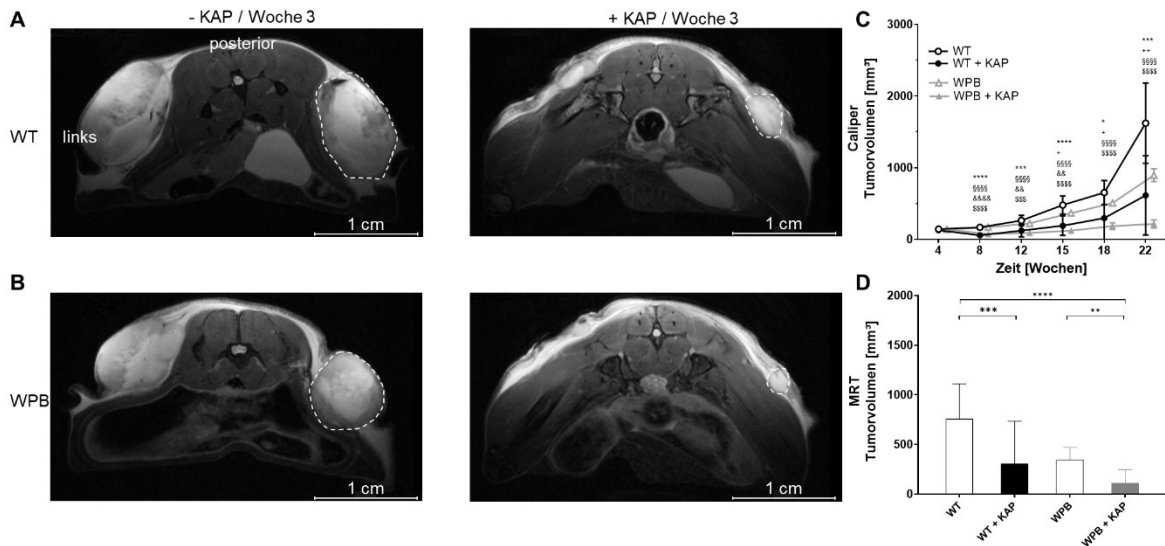


Abbildung 13: Bestimmung des anatomischen Tumorzvolumens mittels MRT und Caliper. Repräsentative MRT-Bilder (A, B; T2-gewichtet, axial) und quantitative Bewertung der Tumorzvolumens bestimmt mit Caliper (C) und MRT (D). NSG Mäuse mit s.c. PEK Flankentumoren, entweder mit WT oder WPB A431 Zellen, wurden drei Wochen lang mit oder ohne KAP behandelt. Die KAP Behandlung begann vier Tage nach der Injektion der Tumorzellen und wurde alle vier Tage wiederholt. Die KAP Behandlung führte zu einer signifikanten Verringerung des Wachstums der WT und WPB Tumoren während der dreiwöchigen Beobachtungszeit. Leere Symbole stehen für unbehandelte Tumoren, gefüllte Symbole für KAP behandelte Tumoren. Die Daten sind als MW \pm SD (n = 14-16 Proben pro Zeitpunkt) angegeben. Analyse (C) mit Zweifweg-ANOVA gefolgt vom Bonferroni Post-hoc Test für Mehrfachvergleiche. WT *p \leq 0,05; ***p \leq 0,001; ****p \leq 0,0001 vs. WT+KAP. WT +p \leq 0,05; ++p \leq 0,01 vs. WPB. WT §§§§p \leq 0,0001 vs. WPB+KAP. WT+KAP &p \leq 0,01 vs. WPB. WBP §§§§p \leq 0,001; §§§§p \leq 0,0001 vs. WPB+KAP. Analyse (D) mit Kruskal-Wallis Test für nicht-normalverteilte Proben mit Dunn's Post-hoc Test. ** p \leq 0,01; *** p \leq 0,001; **** p \leq 0,0001. Die gestrichelte Linie markiert das rechte Tumorzvolumen.

Die KAP Behandlung verringerte das Tumorzwachstum bei Mäusen, die mit WT und WPB Zellen transplantiert wurden, im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen, wobei jedoch kein signifikanter Unterschied in der Wachstumsverringernach der KAP Behandlung zwischen den beiden PEK Zelllinien festgestellt werden konnte (Abbildung 13 C). Interessanterweise zeigten die unbehandelten WPB A431 Zellen eine deutlich verlangsamte Wachstumsrate im Vergleich zu den WT Zellen. Dieses verlangsamte Wachstum war ab Tag 15 signifikant (p \leq 0,05) zwischen den beiden Zelllinien. Ähnliche Ergebnisse lieferte die MRT Bildgebung am Ende der Beobachtungszeit nach drei Wochen (Abbildung 13 A, B und D). Im Unterschied zu

Ergebnisse

den WT A431 Zellen war das Tumolvolumen der WPB A431 Zellen nach drei Wochen um ca. 55 % kleiner bei den Kontrollgruppen und um ca. 64 % geringer bei der *in vivo* KAP-behandelten Gruppe.

Um die Reaktion der KAP Behandlung der WT und WPB PEK Zelllinien auf das Blutbild der NSG Mäuse zu bewerten, wurde dieses am Ende der Beobachtungszeit analysiert. Auch hier zeigte sich, dass es durch die Behandlung mit KAP zu einer Reduktion der Leukozyten im peripheren Blut kam (Tabelle 6). Der Abfall der Leukozyten war durch die KAP Behandlung bei der WT Zelllinie signifikant, wohingegen die Anzahl der Leukozyten durch die Behandlung mit KAP bei WPB Zellen zwar tendenziell reduziert war, aber aufgrund der hohen Daten Varianz und des niedrigen Stichprobenumfangs nicht die statistische Signifikanz erreichte. Zudem konnte einem Absinken des HK bei Tieren, die mit KAP behandelt wurden, bei beiden Zelllinien entgegengewirkt werden. Dies war bei der Zelllinie WPB wieder nur tendenziell sichtbar, bei den WT Zellen hingegen signifikant ($p \leq 0,05$). Interessanterweise kam es, im Gegensatz zu den Versuchen mit KAP und A431 Zellen im Abschnitt 7.3, bei beiden Tumorentitäten nach der Behandlung mit KAP zu einem signifikanten Anstieg der Thrombozyten.

Tabelle 6: Blutbild von WT oder WPB A431 Tumorzellen nach KAP Behandlung. NSG Mäuse mit zwei s.c. Flankentumoren, entweder WT oder WPB A431 Zellen, wurden drei Wochen lang mit oder ohne KAP behandelt. Die Daten sind als MW \pm SD (n = 7-8 Proben) angegeben. Analyse mit ungepaarten zweiseitigem t-Test bzw. Mann-Whitney U Test für nicht-normalverteilte Proben. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

Blutbild (MW \pm SD)					
	LEU [Gpt/L]	ERY [Tpt/L]	HB [mmol/L]	HK	THRO [Gpt/L]
WT	11,2 \pm 3,4	8,9 \pm 0,2	8,0 \pm 0,2	0,41 \pm 0,01	724 \pm 86
WT + KAP	5,3 \pm 1,5 **	9,1 \pm 0,3	8,1 \pm 0,3	0,43 \pm 0,02 *	774 \pm 33 *
WPB	12,9 \pm 3,7	8,2 \pm 0,5	7,2 \pm 0,5	0,38 \pm 0,02	589 \pm 102
WPB + KAP	9,6 \pm 3,7	8,3 \pm 1,0	7,8 \pm 0,7	0,41 \pm 0,03	696 \pm 107 *

7.5 Auswirkung von small molecules und KAP auf das Tumorwachstum

Als letztes wurde in einer weiteren Versuchsreihe untersucht, ob es zu einem synergistischen antikanzerogenen Effekt kommt, wenn die KAP Behandlung durch den zusätzlichen Einsatz von small molecules ergänzt wird. Hierfür wurde die MM Tumorzelllinie A375 verwendet, da das MM, im Vergleich zum PEK, die malignere Tumorzellentität repräsentiert. Bei den zwei

Ergebnisse

eingesetzten small molecules IS112 und SM837 handelt es sich um Chromon-Derivate, die vom Institut für Organische Chemie (Universität Rostock) neu synthetisiert wurden.

Wie bereits in den vorangegangenen Versuchen wurden dafür die MM Tumorzellen heterotop s.c. in die Flanken von NSG Mäusen injiziert. Die Tumorprogression wurde über das Tumolvolumen mit dem Caliper erfasst und bewertet (Abbildung 14 A, B).

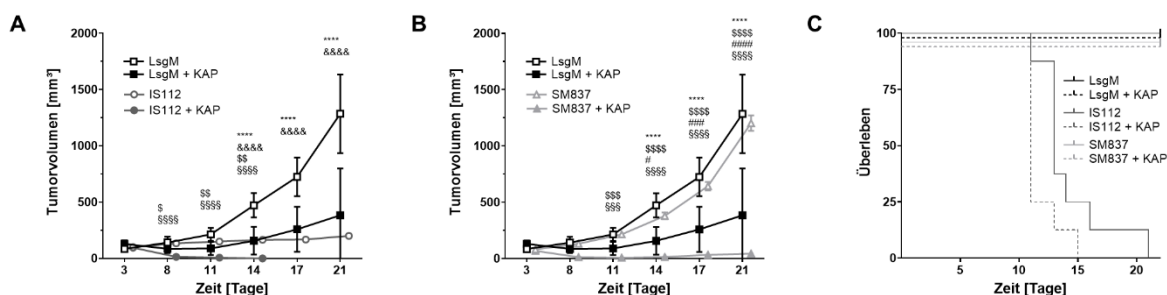


Abbildung 14: Bestimmung des Tumolvolumens mit Caliper und Überleben der Mäuse. Quantitative Bewertung des Tumolvolumens nach Behandlung mit small molecules, KAP oder einer Kombination der beiden mit dem Caliper (A und B) sowie Überleben der Mäuse (C). NSG Mäuse mit s.c. MM Flankentumoren mit der Zelllinie A375 wurden drei Wochen lang mit oder ohne KAP behandelt und erhielten zusätzlich ein LsgM bzw. das small molecule IS112 oder SM837. Die KAP Behandlung begann vier Tage nach der Injektion der Tumorzellen und wurde alle vier Tage wiederholt. An Tag 7 nach Tumorzellimplantation begann die Injektion der small molecules bzw. des LsgM und wurde alle zwei Tage wiederholt. Die KAP Behandlung ebenso wie die Kombinationstherapie mit einem der beiden small molecules führte zu einer signifikanten Verringerung des Wachstums der MM Zelllinie A375 während der dreiwöchigen Beobachtungszeit. Die leeren Symbole stehen für unbehandelte Tumoren, die gefüllten Symbole für KAP behandelte Tumoren. Die Daten sind als MW \pm SD (IS112 n = 2-16 Proben pro Zeitpunkt; LsgM/SM837 n = 16 Proben pro Zeitpunkt). Analyse (A; IS112) mit multiplen ungepaarten t-Test gefolgt vom Holm-Sidak Post-hoc Test für Mehrfachvergleiche. LsgM $^{\$}p \leq 0.05$; $^{\$\$}p \leq 0.01$ vs. IS112+KAP. IS112 $^{\$ \$ \$ \$}p \leq 0.0001$ vs. IS112+KAP. LsgM $^{****}p \leq 0.0001$ vs. KAP. LsgM $^{\&\&\&}p \leq 0.0001$ vs. IS112. Analyse (B; SM837) mit Zweifweg-ANOVA gefolgt vom Bonferroni Post-hoc Test für Mehrfachvergleiche. LsgM $^{\$ \$ \$}p \leq 0.001$; $^{\$ \$ \$ \$}p \leq 0.0001$ vs. SM837+KAP. SM837 $^{\$ \$ \$}p \leq 0.001$; $^{\$ \$ \$ \$}p \leq 0.0001$ vs. SM837+KAP. LsgM $^{***}p \leq 0.0001$ vs. KAP. KAP $^{\#}p \leq 0.05$; $^{\#\#\#}p \leq 0.001$; $^{\#\#\#\#}p \leq 0.0001$ vs. SM837+KAP. Zur besseren Darstellung wurden in (A) IS112 und (B) SM837 dieselben Kontrollen LsgM und LsgM+KAP verwendet.

Die Behandlung der MM Zelllinie A375 mit KAP resultierte in der Gruppe, die das LsgM erhalten hatte, in einer Wachstumsinhibierung, nachweisbar durch eine Größenreduktion des Gesamttumolvolumens um ca. 70 % an Tag 21. Eine alleinige Behandlung mit dem small molecule SM837 führte zu keiner Veränderung der Tumorprogression im Vergleich zu der Kontrollgruppe, welche nur das LsgM erhielt. Interessanterweise kam es zu einer massiven Reduktion des Tumolvolumens um ca. 96 % bei der Gruppe, die eine Kombination von SM837 und

Ergebnisse

KAP erhielt, im Vergleich zu der Gruppe, die nur mit SM837 behandelt wurde. Diese Inhibition des Tumorwachstums könnte auf einen synergistischen Effekt von dem small molecule SM837 und KAP zurückzuführen sein. Der Einsatz von IS112 erwies sich in der alleinigen Verabreichung in der eingesetzten Dosis von 30 mg/kg Körpergewicht bei NSG Mäusen als toxisch. Bis zum Abschluss des Beobachtungszeitraumes überlebte nur eine Maus (Abbildung 14 C). Die Mortalität nahm durch die Behandlung mit KAP zu. In der Gruppe mit IS112 in Kombination mit KAP erreichte kein Tier das geplante Versuchsende und die Tiere verstarben bereits zu einem früheren Zeitpunkt.

7.6 Auswirkung von small molecules und KAP auf Blutbild und Tumorbiologie

Um die Auswirkung der KAP Behandlung und der small molecules bzw. des LsgM auf das Blutbild der NSG Mäuse zu bewerten, wurde dieses am Ende der Beobachtungszeit gemessen und bewertet, zumindest wo dies möglich war. Von Tieren, die IS112 erhalten haben, konnten auf Grund des frühen Versterbens der Tiere keine Vollblutproben gewonnen werden. Wie bereits in den vorangegangenen Abschnitten zeigte sich unter der Behandlung mit KAP bei der Gruppe mit dem LsgM und bei SM837 eine signifikante Reduktion der Leukozyten im Blut (Tabelle 7).

Tabelle 7: Blutbild nach Behandlung mit SM837 oder in Kombination mit KAP. NSG Mäuse mit s.c. MM Flankentumoren mit der Zelllinie A375 wurden drei Wochen lang mit oder ohne KAP behandelt und erhielten zusätzlich ein LsgM bzw. das small molecule IS112 oder SM837. Die Daten sind als MW \pm SD (n = 7-8) angegeben. Analyse mit ungepaarten zweiseitigem t-Test bzw. Mann-Whitney U Test für nicht-normalverteilte Proben. * p \leq 0.05; ** p \leq 0.01.

Blutbild (MW \pm SD)					
	LEU [Gpt/L]	ERY [Tpt/L]	HB [mmol/L]	HK	THRO [Gpt/L]
LSG	6,3 \pm 2,7	8,8 \pm 0,2	8,1 \pm 0,2	0,41 \pm 0,01	758 \pm 70
LSG + KAP	3,4 \pm 1,3 *	8,5 \pm 0,5	7,4 \pm 0,6 **	0,39 \pm 0,02 *	642 \pm 73 **
SM837	5,1 \pm 1,9	9,1 \pm 0,3	8,3 \pm 0,2	0,42 \pm 0,01	702 \pm 49
SM837 + KAP	2,7 \pm 1,5 *	9,3 \pm 0,3	8,7 \pm 0,2 *	0,43 \pm 0,01	665 \pm 67

Interessanterweise kam es in der LsgM Gruppe, die mit KAP behandelt wurde, zu einem Abfall des HB Wertes, wohingegen es in der SM837 Gruppe, die mit KAP behandelt wurde, zu

Ergebnisse

einem Anstieg des HB Wertes kam. Signifikant ($* p \leq 0.05$) fiel auch der HK in der KAP-behandelten LsgM Gruppe ab. Auch kam es bei beiden Gruppen, die zusätzlich mit KAP behandelt wurden, zu einem Abfall der Thrombozyten im peripheren Blut, was bei der KAP-behandelten LsgM Gruppe statistisch signifikant war, bei der SM837 Gruppe, die mit KAP behandelt wurde, nur tendenziell. Nach den *in vivo* Experimenten wurde, wie in vorherigen Abschnitten, eine Hälfte des Tumors für immunhistochemische Untersuchungen entnommen und aufbereitet. In den IS112 Gruppen konnten auf Grund des frühen Versterbens der Tiere keine Tumoren entnommen werden. Die Tumoren wurden unter dem Aspekt der Apoptose aufbereitet und gefärbt, da hier am ehesten Effekte durch die Kombinationsbehandlung von small molecules und KAP zu erwarten waren. Diese Annahme wurde falsifiziert. Es kam zu keinem signifikanten Anstieg der Apoptose innerhalb der behandelten Gruppen mit LsgM oder SM837. Es war lediglich eine Tendenz zwischen den in Kombination mit KAP-behandelten und den LsgM bzw. SM837 Gruppen auszumachen. Nach den drei Wochen zeigte die KAP behandelte Gruppe mit dem LsgM eine signifikant erhöhte Apoptose im Vergleich zu der Gruppe, die mit SM837 alleine behandelt wurde.

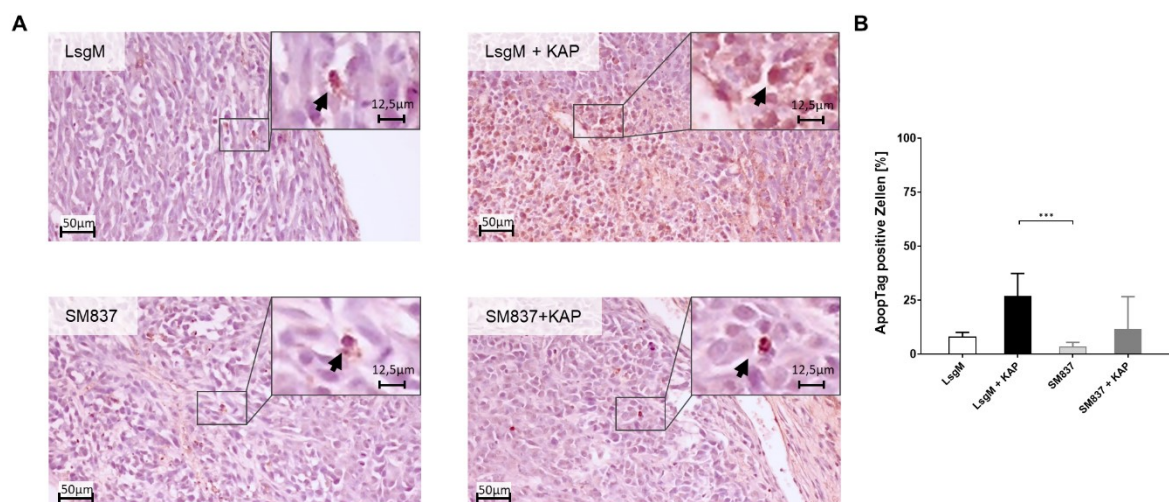


Abbildung 15: Analyse der Apoptose nach Behandlung mit SM837 oder in Kombination mit KAP. Repräsentative immunhistochemische Bilder (A) und quantitative Bewertung der ApoptTag®-Expression (B). NSG Mäuse mit s.c. MM Flankentumoren mit der Zelllinie A375 wurden drei Wochen lang mit oder ohne KAP behandelt und erhielten zusätzlich ein LsgM bzw. das small molecule SM837. Die Daten sind als MW \pm SD (n = 4–8) angegeben. Analyse mit Kruskal-Wallis Test für nicht-normalverteilte Proben mit Dunn's Post-hoc Test. *** $p \leq 0,001$.

8 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die KAP Behandlung die Volumenzunahme bei kutanen Hauttumoren im Verlauf von drei Wochen verringert. Parallel dazu wurde die Tumorzellularität bei MM reduziert. Die durchgeführten Analysen lassen den Schluss zu, dass diese Effekte hauptsächlich durch die Bildung von ROS während der KAP Therapie vermittelt wurden. Durch die Kombination von KAP und des small molecules SM837 konnte das Vermögen von KAP, die Tumorprogression beim MM zu verringern, über das Maß der Monotherapie gesteigert werden. Die wiederholte KAP Behandlung von PEK Zellen *in vitro* führte zu einem verlangsamten Wachstum *in vivo*, wobei das Ansprechen auf KAP erhalten blieb. Trotz einer verringerten Proliferation beim PEK beeinflusste KAP weder die Apoptose, die Entzündung, die Angiogenese noch die Stoffwechselaktivität beim MM bzw. PEK.

8.1 Material und Methoden

Für die Beantwortung der in der Promotionsarbeit adressierten Fragestellungen fiel die Wahl auf ein gut etabliertes Mausmodell für das Anwachsen von xenogenen Tumoren. Die Verwendung von solchen Mausmodellen zur Bewertung der Effektivität von neuen Therapieansätzen sind in der Lage sehr aussagekräftige Informationen zu generieren. Dies lässt sich dadurch begründen, dass die Versuche an intakten Organismen durchgeführt werden und somit das komplexe Zusammenspiel verschiedener physiologischer Prozesse abgebildet werden kann. Im Gegensatz dazu sind *in vitro* Versuche momentan nur in der Lage, Teilaspekte physiologischer Vorgänge darzustellen und können somit nur begrenzte Informationen über die Wirksamkeit von Arzneimitteln vermitteln [81,82]. Bei der Einordnung der Ergebnisse dieser Arbeit muss zudem das Tier „Maus“ als ein individueller Faktor berücksichtigt werden. Bei den hier verwendeten NSG Mäusen liegen gleich zwei Mutationen vor, die die Funktionalität des Immunsystems einschränken. Bei dem gezielten Knockout des Gens, welches für IL2rg kodiert, kommt es zu einer vollständigen Nullmutation des Gens. Da die IL2rg ein integraler Bestandteil mehrerer IL-Rezeptoren ist, werden die Signalwege von IL2, IL4, IL7, IL9, IL15 und IL21 unterbunden [77,83]. Diese Signalwege sind für die Differenzierung und Funktion vieler hämatopoetischer Zellen essentiell. Dies führt unter anderem dazu, dass keine funktionsfähigen NK-Zellen und Makrophagen ausreifen. Als Vorteil der Mutation sei hier genannt, dass insbesondere

Diskussion

die Reduktion der NK-Zellen dazu führt, humane Zellen transplantieren zu können [84]. Die Scid Mutation ist eine Loss-of-Function-Mutation für das Gen, welches normalerweise für ein Protein kodiert was dafür verantwortlich ist während der V(D)J Rekombination in sich entwickelnden T- und B-Lymphozyten DNA Strangbrüche hervorzurufen [85]. In der Folge kommt es zu einer stark reduzierten Anzahl reifer T- und B-Lymphozyten, wodurch die adaptive Immunantwort praktisch zum Erliegen kommt [75,84]. Durch diese beiden Mutationen entwickeln NSG Mäuse keine Immunreaktionen gegen Tumoren [77,86]. Daher ist es auch unmöglich, die möglichen Einflüsse des Immunsystems, wie z. B. Induktion von Apoptose über zytotoxische T-Zellen oder NK-Zellen [87], auf die Tumorentwicklung in diesem Modell zu beurteilen. In einem Modell mit humanisierten NSG Mäusen konnte gezeigt werden, dass es zu einer Infiltration der allogenen Leukozyten in den xenogen Tumoren ohne Einfluss auf die Tumorprogression im Vergleich zu unveränderten NSG Mäusen kam. Bei einer Behandlung mit einem PD-1 Immuncheckpointinhibitor (Pembrolizumab) kam es bei den humanisierten NSG Mäusen zu einer signifikanten Inhibierung der Tumorprogression, während kein Einfluss bei NSG Mäusen zu verzeichnen war. Die Tumordepletion wurde hierbei hauptsächlich durch humane CD8+ zytotoxische T-Zellen vermittelt [88]. Die Verwendung dieser immuninkompetenten Mäuse für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche war jedoch unerlässlich, um humane Tumorzelllinien in einem Fremdorganismus anwachsen zu lassen. Die Fokussierung auf männliche immundefiziente NSG Mäuse hat zwar einerseits den Vorteil, dass eventuelle zyklusbedingte Effekte auf die Tumorprogression bei weiblichen Mäusen entfallen und die Anzahl der benötigten Tiere dadurch verringert wird. Andererseits stellt die Festlegung auf ein Geschlecht auch eine mögliche Einschränkung da, insbesondere wegen der fehlenden Diversität, und sollte deshalb bei der Interpretation der Daten beachtet werden. In diesem Zusammenhang konnte in einem Lungenkarzinom Mausmodell, induziert durch einen adenoviralen Vektor, gezeigt werden, dass die Substitution von Östradiol, bei ovariectomierten und männlichen Mäusen, zu einem Anstieg der Anzahl von Tumoren führte, was in diesem Modell eine Abhängigkeit von Östrogen und Tumorprogression nahelegt [89]. In der vorliegenden Arbeit wurden die Tumorzellen den Mäusen s.c. injiziert, obwohl die Hauttumoren intrakutan wachsen würden. Für das Anwachsen von xenogenen Tumoren ist das s.c. Injektionsmodell weitverbreitet, da es zum einen den Vorteil bietet eine größere Anzahl an Zellen zu applizieren und zum anderen, die Technik der Injektion der Tumorzellen relativ einfach ist, auch wenn in diesem Modell nicht die genaue Tumorstadiumsumgebung wiedergespiegelt werden kann [90]. Für

Diskussion

eine bessere Evaluation der Angiogenese während der Tumorprogression und unter der Behandlung mit KAP hätte auch das Modell der Rückenhautkammer verwendet werden können. Bereits zu Beginn des 19. Jahrhunderts kam die Idee auf, die Mikrozirkulationsprozesse im Kaninchenohr durch eine transparente Kammer zu untersuchen [91]. Diese Methode wurde bis zur Rückenhautkammer weiterentwickelt, die heute in der Forschung weit verbreitet ist [92]. Mit dem Modell der Rückenhautkammer können eine Vielzahl von Forschungsfragen im Bereich der Implantate, Gerinnungsstörungen, Mikrozirkulationsstörungen, Wundheilung und Tumorprogression mittels intravitaler Multi-Fluoreszenz-Mikroskopie analysiert werden [93–98]. Dieses Modell ermöglicht eine kontinuierliche *in vivo* Analyse hämodynamischer Parameter wie Flußgeschwindigkeit und Gefäßdichte über 2 bis 3 Wochen [99,100]. Dieser kurze Zeitraum stellt gleichzeitig eine Limitierung für diese Methode im Vergleich zum s.c. Flankentumor-Modell dar. Im Modell der Rückenhautkammer wurden mit KAP bisher lediglich Versuche zur Wundheilung durchgeführt [101]. Noch nicht veröffentlichte Ergebnisse aus der eigenen Arbeitsgruppe zeigen, dass die Therapie von Tumoren mit KAP im Modell der Rückenhautkammer durch Nekrosen der tumortragenden Haut unter der Behandlung stark limitiert wird.

Die Beurteilung der Tumorprogression in *in vivo* Modellen kann in unterschiedlichen Ansätzen durchgeführt werden. Zum einen könnten zu mehreren definierten Zeitpunkten die Tiere in unterschiedlichen Stadien des Beobachtungszeitraum euthanasiert werden, um die Tumore zu exzidieren, damit unter anderem die Tumorgröße exakt bestimmt werden kann oder, um die Tumore auf ihr Proliferationsverhalten hin zu untersuchen. Dieser Ansatz hat zum Nachteil, dass für die Versuche sehr viele Tiere eingesetzt werden müssten. Zudem sind die erhobenen Ergebnisse für einen Zeitpunkt über den Versuchszeitraum immer von unterschiedlichen Tieren, sodass z. B. von einer Maus, die in Woche drei aufbereitet wird, keine Ergebnisse aus Woche eins vorliegen. Um diese Nachteile zu umgehen, können modernste nicht invasive Bildgebungsverfahren verwendet werden. In dieser Arbeit wurden das erste Mal multimodale Bildgebungsverfahren wie das MRT und das PET/CT eingesetzt, um das Fortschreiten von PEK und MM Tumoren *in vivo* longitudinal und nicht invasiv zu bewerten und die therapeutische Effizienz von KAP zu überwachen. Multimodale Bildgebungsverfahren eignen sich aufgrund ihrer nicht invasiven Natur ideal für die Bewertung der antitumoralen therapeutischen Wirksamkeit in Tiermodellen [102]. Zu den weiteren Vorteilen gehört die longitudinale *in vivo* Bildgebung der Wachstumskinetik, des Metabolismus, der Metastasierung

Diskussion

und der Zellularität von Tumoren. Daher spielen diese Bildgebungsverfahren eine entscheidende Rolle bei der Verringerung der Anzahl der benötigten Tiere und ihrer Belastung, was dem 3-R-Prinzip der internationalen Tierschutzempfehlungen entspricht. Neben den Bildgebungsverfahren wurde auch der Caliper verwendet, um eine initiale Beurteilung des Tumorumfanges vornehmen zu können. Dabei muss beachtet werden, dass durch die Berechnung des Tumorumfanges aufgrund von Messwerten, die mittels Caliper erhoben wurden, zum einen auf Grund der s.c. Lage der Tumoren Abweichungen entstehen können, was zu einem nicht exakten Vermessen führen kann. Zum anderen wird das Volumen nur annäherungsweise anhand einer Formel berechnet und kann deshalb nicht so exakt sein wie Volumen, die durch eine MRT Messung erhoben wurden [102].

Neben dem Anwachsen der Tumoren und der Beurteilung der Tumorprogression ist es von essentieller Bedeutung zu verifizieren, ob die gewählte Behandlungsoption auch wirksam ist. Bei der Behandlung von Tumoren mit KAP wird davon ausgegangen, dass der Haupteffekt durch ROS und RNS vermittelt wird. Um diesen Wirkmechanismus durch den Nachweis der RS *in vivo* zu bestätigen, wurde in der vorliegenden Arbeit die CL-Sonde L-012 verwendet. Durch RS wird die Oxidation von L-012 induziert, was in der Folge zu einem Anstieg der CL führt [103]. Im Vergleich zu anderen Sonden, insbesondere Luminol, weist L-012 eine höhere Sensitivität gegenüber ROS und RNS auf, was bereits in mehreren Studien [104,105] bestätigt werden konnte und auch in verschiedenen *in vivo* Experimenten [106,107] Anwendung fand.

Für die vorliegende Arbeit wurde für die Behandlung der s.c. Flankentumoren der Hochfrequenz-Plasmajet kINPen™ IND verwendet [78], der aufgrund seines Aufbaus zu den indirekten Systemen für die Generierung von Plasma zählt im Gegensatz zu Geräten für die direkte Plasmaentladung wie die dielektrische Barriereentladung [51]. Für die Behandlung der s.c. gelegenen Flankentumoren wurde das Plasma direkt auf die Haut aufgebracht. Alternativ hätte das Plasma auch indirekt, durch sogenannte Plasma-aktivierte Flüssigkeiten (PAF), für die Therapie verwendet werden können. Dabei werden Flüssigkeiten mit KAP behandelt und die PAF s.c. in der unmittelbaren Umgebung der Tumoren oder intratumoral injiziert [108]. Die anti-karzinogene Wirksamkeit der PAF konnte bereits in *in vitro* [109,110] und *in vivo* [108] nachgewiesen werden. Für die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden keine PAF verwendet, um die direkten Effekte der KAP Behandlung auf die Tumorprogression beurteilen zu können.

Diskussion

Auch sollte bei der Interpretation der Ergebnisse von Proliferation, Apoptose, Inflammation und Angiogenese, die mittels Immunhistochemie und Proteinexpression bestimmt wurden, beachtet werden, dass der gesamte Tumor analysiert wurde. Eine Fokussierung auf Tumorabschnitte, die der KAP Behandlung direkt ausgesetzt waren, hätte eventuell ein exakteres Bild der tatsächlichen Situation wiedergegeben. Da insbesondere für die histologische Auswertung relativ viel Tumorgewebe benötigt wurde und die Tumoren durch die Behandlung teilweise ein sehr niedriges Volumen aufwiesen, hätte die Durchflusszytometrie verwendet werden können, um an Einzelzellsuspensionen des verdauten Tumors die Tumorzellen und die Tumorumgebung besser charakterisieren zu können. Da das Auftreten dieser Einschränkungen erst zu einem wesentlich späteren Zeitpunkt der Probenaufbereitung und praktischen Experimente in den Fokus rückte, konnten keine Aufbereitungen der Tumoren für durchflusszytometrische Analysen mehr erfolgen, da kein natives Probenmaterial zur Verfügung stand.

8.2 Ergebnisse

In dieser Arbeit konnte durch den longitudinalen Einsatz der MRT Bildgebung zum einen festgestellt werden, dass das anatomische Tumolvolumen über einen Zeitraum von drei Wochen bei allen Tumorentitäten zunahm. Zum anderen konnte die therapeutische Effektivität der KAP Behandlung durch Nachweis eines reduzierten Tumolvolumens bei behandelten Tumoren und somit eine Wachstumsinhibierung der PEK und MM Tumoren durch Plasma bestätigt werden. Diese Annahme wird durch die konstant höheren, wenn auch nicht signifikanten, ADC Werte in KAP-behandelten Tumoren gestützt. Die therapeutische Wirksamkeit der KAP Behandlung bei MM wurde durch die Verringerung der Zellularität in der dritten Woche belegt, d. h. durch einen signifikanten Anstieg der ADC Werte, während die ADC Werte bei KAP-behandelten PEK Mäusen nur leicht anstiegen. Dies steht im Einklang mit Daten einer Studie, die ebenfalls zeigte, dass eine Tumorthherapie mit BRAF- und CDK 4/6-Inhibitoren die ADC Werte von MM in Mäusen im Vergleich zu unbehandelten Tumoren erhöhte [111]. Darüber hinaus ist eine verringerte Zellularität in Tumoren, d. h. ein Anstieg der ADC Werte, ein etablierter Parameter für die Bewertung eines therapeutischen Ansprechens beim Menschen [112].

Diskussion

In dieser Arbeit zeigte das mittels [¹⁸F]FDG-PET/CT bestimmte MTV unter der KAP Behandlung keine signifikante Abnahme. Eine Reduktion des MTV hätte ein Hinweis auf die therapeutische Wirkung der KAP Behandlung sein können, ähnlich wie der Anstieg der ADC Werte nach der KAP Behandlung. In einer *in vivo* Studie mit MM konnte bereits gezeigt werden, dass das Ansprechen auf die Behandlung durch erhöhte ADC Werte und auch eine verringerte Aufnahme von [¹⁸F]FDG angezeigt wurde [111]. Trotz des Nachweises eines stark reduzierten Tumorumfanges in dieser Arbeit konnte durch die Behandlung kein Effekt auf das MTV nachgewiesen werden. Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass partielle Volumeneffekte oder die begrenzte räumliche Auflösung der PET eine Abnahme der MTV nach der KAP Behandlung überdeckt haben könnten. Um diese partielle Beeinflussung des Volumens, wie z. B. Spill-in- und Spill-out-Effekte, zu minimieren, wurden nur 40 % der hottest Voxel im Tumor VOI miteinbezogen. Zudem konnte durch Anwendung eines SUV_{max} von 60 % potentiell nekrotische Areale des Tumors ausgeschlossen werden. Darüber hinaus könnte die Auswahl der VOI aufgrund der manuellen Platzierung verzerrt gewesen sein. Um eine Verzerrung durch den Beobachter zu vermeiden, wurden für die VOI Platzierung jedoch fusionierte PET- und CT-Bilder verwendet. Zudem fand für die Positionierung der VOI eine visuelle Inspektion in allen drei Ebenen statt.

Gleichwohl die KAP Behandlung nicht zu einer Tumorremission führte, war das Wachstum von MM und PEK nach einer, zwei bzw. drei Wochen deutlich reduziert. Es ist anzunehmen, dass diese Wachstumshemmung mit der ROS und RNS Bildung im Tumor nach der KAP Behandlung zusammenhängt, was durch einen deutlichen Anstieg des Lumineszenzsignals von L-012 bestätigt wurde. Tatsächlich kam es direkt nach der KAP Behandlung zu einem massiven RS Anstieg innerhalb des behandelten Tumorgewebes, indirekt nachgewiesen durch einen Anstieg des CL-Signales, wohingegen in unbehandelten Tumoren und Tumoren direkt vor der KAP Behandlung fast keine RS nachgewiesen werden konnten. Interessanterweise konnte hierdurch auch bestätigt werden, dass die gebildeten RS sich über einen Zeitraum von vier Tagen komplett abbauten, da das CL-Signal auf fast dasselbe Basallevel wieder abfiel wie bei den unbehandelten Tumoren. Unter Umständen hätte ein höheres Basallevel der RS bei Tumoren direkt vor der KAP Behandlung erwartet werden können, als im Vergleich zu unbehandelten Tumoren. Diese Annahme stützte sich darauf, dass postuliert wird, L-012 imitiert auch bei Gewebe Lumineszenz, welches durch Inflammation gekennzeichnet ist [104,106]. Somit konnte unseres Wissens nach in dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass die CL-

Diskussion

Sonde L-012 ideal für den nicht invasiven Nachweis von RS im Tumorgewebe während der KAP Behandlung in lebenden Mäusen ist. Darüber hinaus konnte die vorliegende Arbeit durch den Nachweis von RS bestätigen, dass RS, die aus der KAP Behandlung resultieren, befähigt sind, Gewebearrrieren zu überwinden und zur Tumorkontrolle beitragen. Dies deckt sich mit Ergebnissen einer Studie, die *in vitro* zeigen konnte, dass ROS und RNS befähigt sind, einen 1 mm dicken Gelatinefilm zu penetrieren [113], während *in vivo* gezeigt wurde, dass vom KAP stammende ROS und RNS in der Lage sind, das Stratum corneum zu oxidieren und zu passieren, um anschließend intrakutane Reaktionen hervorzurufen [114,115]. Zum jetzigen Zeitpunkt der Forschung besteht die allgemein anerkannte Hypothese, dass Tumorzellen, aufgrund eines basal erhöhten Spiegels von ROS [116], welche sich unter anderem auf einen erhöhten Stoffwechsel und eine relative Hypoxie zurückführen lassen, wesentlich sensibler und selektiver auf eine Behandlung mit KAP ansprechen als gesunde Zellen. Dies erklärt, warum besonders Tumorzellen empfindlich auf eine zusätzliche Exposition durch KAP generierte ROS reagieren [13,116,117]. Im Gegensatz dazu besitzen gesunde Zellen sehr wirkungsvolle antioxidative Mechanismen, wie die Katalase, Superoxiddismutase und Peroxidase, um mit oxidativen Stress umzugehen [118,119]. Neben dem Stoffwechsel und dem antioxidativen System werden auch Unterschiede hinsichtlich der Aquaporine und dem Cholesterin für die gesteigerte Sensitivität von Tumorzellen gegenüber ROS diskutiert [46,118]. Bei dem Einsatz von RS sollte immer bedacht werden, dass eine langanhaltende erhöhte Exposition von Hautzellen gegenüber ROS zur Entstehung von Hautkrebs beitragen kann [120], wohingegen kurzfristig erhöhte ROS Spiegel, wie bei der photodynamischen Therapie, bereits heute zugelassen sind und eingesetzt werden, um oberflächlich gelegene Hauttumoren schonend zu behandeln [121]. Es besteht die Hypothese, dass für die Vermittlung der antikanzerogenen Wirkung bei der Behandlung mit KAP sich am ehesten H_2O_2 und NO_2^- unter den RS dafür verantwortlich zeichnen [122], obwohl eine *in vitro* Studie zeigen konnte, dass der alleinige Einsatz von H_2O_2 , im Vergleich zur KAP Behandlung, eine geringere antikanzerogene Wirkung auf Tumorzellen vermittelte. Dieses Ergebnis legt nahe, dass neben H_2O_2 , sich noch andere RS für die Wirkvermittlung verantwortlich zeichnen müssen oder diese zusammen synergistisch wirken [123]. Um zu verifizieren, dass tatsächlich ROS und RNS die antikanzerogene Wirkung von KAP herbeiführen, konnte in einer Studie gezeigt werden, dass die Behandlung von MM mit KAP in Gegenwart eines Glycerin und Natriumbicarbonat-Geles, welches RS, Radikale und Ionen binden kann, die Fähigkeit des Plasmas hemmt, Tumoren zu depletieren, was wiederum zu einer

Diskussion

Tumorremission führte [123]. Es wird weithin davon ausgegangen, dass die Toxizität auf Tumorzellen während der KAP Behandlung hauptsächlich durch ROS vermittelt wird und dies zur Apoptose der Tumorzellen führt [124,125]. In einer Studie konnte nachgewiesen werden, dass es nach der KAP Behandlung von humanem Melanomgewebe zu einer erhöhten Anzahl apoptotischer Zellen kam [126]. Eine weitere Studie bestätigte einen Zellzyklusarrest nach KAP Behandlung [127]. Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit, da hier, durch die eingesetzten Methoden, keine apoptotischen Effekte auf die Tumorzellen nachgewiesen werden konnten. Diese widersprüchlichen Ergebnisse hätten eventuell, wie bereits erwähnt, durch die Analyse von Tumormaterial, welches der KAP Behandlung direkt ausgesetzt war oder durch den Einsatz von alternativer Methoden, wie der Durchflusszytometrie, umgangen werden können.

Es wird postuliert, dass bei dem Einsatz von KAP nicht nur RS entstehen, sondern unter anderem auch Ionen, Elektronen und elektromagnetischer Strahlung sowie Wärme freigesetzt wird [50]. Hierbei kann das Plasma durchschnittliche Temperaturen von 25 bis 45 °C erreichen [49] und somit eventuell die Tumorprogression durch Hyperthermie beeinflussen. Da die Hyperthermie *in vitro* und *in vivo* eine direkte krebshemmende Wirkung bei lokalen Temperaturen zwischen 41 °C und 47 °C gezeigt hat [128], wurde auch die durch die KAP Behandlung induzierte Erwärmung der Haut untersucht. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass der leichte Temperaturanstieg nach der Behandlung mit KAP, der in dieser Arbeit nachgewiesen wurde, zu der beschriebenen Hemmung des Tumorwachstums beigetragen haben könnte. Des Weiteren könnten die Tumorzellen durch die kumulative Wirkung von ROS/RNS, UV-Strahlung sowie elektrischen Feldern, die unter der Behandlung mit KAP generiert wurden, beeinflusst worden sein und eine Vielzahl von Zelltodformen wie Nekrose oder regulierte Zelltodformen wie intrinsische oder extrinsische Apoptose, Nekroptose, Pyroptose und andere durchlaufen haben [129], die durch das methodische Spektrum in dieser Arbeit aber nicht explizit erfasst wurden. In Bezugnahme auf die Apoptose wurde gezeigt, dass die Lebensfähigkeit von mesenchymalen Stammzellen der Maus, nach einer Behandlung mit KAP, *in vitro* verringert wurde. Hier wurde die Zelllyse durch das Einwirken von RS und geladene Partikel durch die Behandlung als einer der primären Mechanismen für den Zelltod angesehen [130]. Ferner besteht die Vermutung, dass die Behandlung mit KAP den Zellzyklus von Tumorzellen stärker beeinträchtigt als den von gesunden Zellen, da die Reporter für oxidativen Stress in der S-

Diskussion

Phase verstärkt werden [131]. Eine Erklärung für diese scheinbare Diskrepanz in der vorliegenden Arbeit und anderen Studienergebnissen könnte in der Eindringtiefe von ROS begründet sein. In diesem Zusammenhang konnte bereits gezeigt werden, dass RS, die durch KAP erzeugt wurden, nur eine kurze Distanz von Gewebearrrieren überwinden können [132]. Somit könnte das s.c. heterotope Tumormodell in dieser Arbeit und die nicht intrakutane orthotopie Lokalisation der Tumorzellen erklären, dass typische ROS-assoziierte Effekte, wie eine erhöhte Apoptose der Tumorzellen, nicht nachgewiesen werden konnten. Eine gezielte Analyse von Tumorbereichen, die direkt von der KAP Behandlung betroffen waren, hätte womöglich umfassendere Informationen über die tatsächlichen Auswirkungen der Behandlung auf das Tumorgewebe liefern können als die Beurteilung der potentiell KAP-vermittelten Effekte auf den gesamten Tumor.

Obwohl das Immunsystem und damit einhergehend die Immunantwort von NSG Mäusen sehr stark eingeschränkt ist, konnte in der vorliegenden Arbeit, im peripheren Blut der tumortragenden Mäuse mit der Zelllinie A431 und A375, wider Erwarten ein Anstieg der Gesamtleukozytenzahl nachgewiesen werden. Die Anzahl der Leukozyten beträgt normalerweise bei NSG Mäusen $1,23 \pm 0,5$ Gpt/L [133]. In Übereinstimmung mit diesen Referenzwerten konnte eine ähnliche Anzahl an Leukozyten bei Tieren nachgewiesen werden, die die PEK Zelllinie SCL-2 bzw. die MM Zelllinie SK-MEL-29, welche beide durch ein stark reduziertes Tumolvolumen im Vergleich zu den Tumorzelllinien A431 und A375, gekennzeichnet waren. Bei PEK-tragenden Tieren kam es unter der Behandlung mit KAP tendenziell zu einer Reduktion der Leukozyten, ebenso bei Tieren mit dem MM, die mit dem small molecule SM837 und KAP behandelt wurden. Dies könnte darauf hindeuten, dass das reduzierte Tumolvolumen durch die Behandlung zu einer Normalisierung der Leukozytenzahl im peripheren Blut führt und - trotz der Immunsuppression - die humanen Tumorzellen die vermehrte Proliferation von Leukozyten induzierten. Welche Leukozytensubpopulationen expandierten konnte mit unserem verwendeten Hämatologie-Analysesystem nicht diskriminiert werden. Trotz des Nachweises einer erhöhten Anzahl von Leukozyten im Blut konnte kein Anstieg von Granulozyten oder Makrophagen im Tumorgewebe nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang befasste sich eine klinische Studie mit dem immunvermittelten Zelltod und die Involvierung von myeloischen Zellen bei der Behandlung von Tumoren mit KAP. Es wurde festgestellt, dass die Anzahl der CD11b+ myeloischen Zellen in einer Biopsie von Patienten mit plasmabehandeltem Tumorgewebe im Vergleich zu unbehandelten Patienten abnimmt, was mit einem besseren Ergebnis verbunden

Diskussion

war [45]. Dies führte zu der Hypothese, dass es zusätzlich zu den direkten antikanzerogenen Wirkmechanismen der KAP Behandlung eine Beteiligung des Immunsystems geben muss, wobei die adaptive Antitumorimmunität durch myeloische Antigenpräsentierende Zellen forciert wird [134,135]. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese konnte *in vivo* eine erhöhte Infiltration mit myeloischen und lymphoiden Zellen in einem mit KAP-behandelten syngenem MM-Modell nachgewiesen werden [136], während eine Checkpoint-Immuntherapie die therapeutische Wirksamkeit in einem ähnlichen Tumormodell, jedoch unter Verwendung einer anderen Plasmaquelle, verstärkte [137]. Eine *in vitro* Studie zeigte, dass auch angeborene Immunzellen, wie NK-Zellen und nicht nur das adaptive Immunsystem, nach einer KAP Behandlung antikanzerogene Wirkungen vermitteln kann und dies zu einer gesteigerten Apoptose von Tumorzellen führte, was wiederum auf einer Modulation der Expression von aktivierenden und hemmenden Rezeptoren von Tumorzellen nach der Behandlung mit KAP zurückzuführen war [138].

Ungeachtet der vielversprechenden Erfolge eines potentiellen Einsatzes von KAP in der onkologischen Therapie dürfen mögliche zukünftige Herausforderungen nicht außer Acht gelassen werden. Eines der größten Probleme bei der Therapie von Krebserkrankungen stellt die Ausbildung von Resistenzen gegen die verwendete Behandlung dar [139]. Dies führt zu einem mangelhaften Ansprechen zuvor wirksamer Arzneimittel und ist meist mit einer erhöhten Rate an Rezidiven, Ausbildung von Metastasen und damit einhergehend einer höheren Mortalität verbunden [140]. Ein Tumorrezidiv aufgrund einer erworbenen Resistenz bei einem ursprünglichen Ansprechen kann somit in einigen Fällen eine große Herausforderung für die betroffenen Patienten und ihre behandelnden Ärzte darstellen. Eine Erforschung der dafür zugrundeliegenden Mechanismen ist daher unerlässlich, um Strategien zu entwickeln, damit man letztlich den möglichen Anpassungsprozessen entgegenwirken kann. In den letzten Jahren haben sich mehrere verschiedene mögliche Mechanismen abgezeichnet, die zu einer Resistenzbildung beitragen können, wie die Inaktivierung des Arzneimittels, Multi Drug Resistance, Unterdrückung der Apoptose, spezifische genetische oder epigenetische Veränderungen, epitheliale-mesenchymale Transition sowie Tumorstammzellen [139–141]. Für die Behandlung von multiresistenten Krebsentitäten haben sich ROS vermittelte Therapieansätze, wie unter anderem die Behandlung mit KAP, als sehr vielversprechend abgezeichnet [116]. Allerdings ist bereits bekannt, dass chronischer oxidativer Stress oder hohe Spiegel von ROS die Ausbildung eines Tumorphänotyps begünstigen können [120,142], sowie die Resistenz gegen Arzneimittel

Diskussion

auslösen oder verstärken [143]. Bei onkologischen Therapiestrategien, wie der Bestrahlung, die ebenfalls ein Teil ihres antikanzerogenen Wirkspektrums über einen Anstieg von RS in den Tumorzellen vermitteln, konnte festgestellt werden, dass ruhende Tumorstammzellen eine erhöhte Resistenz gegenüber der Behandlung haben und sehr wahrscheinlich mitverantwortlich sind für Rezidive und die Bildung von Metastasen nach der Behandlung [144,145]. Dieser ruhende Charakter, der unter anderem durch ein langsames Proliferationsverhalten, einen latenten Metabolismus und die Fähigkeit der Selbsterneuerung gekennzeichnet ist, ermöglicht im Vergleich zu stark proliferierenden Tumorzellen eine höhere Resistenz gegen verschiedene Behandlungen und einem Wiederauftreten nach der Behandlung [140,144]. Ähnliche Beobachtungen konnten in dieser Arbeit gemacht werden: Die WPB A431 Zellen zeigten *in vivo* ein verlangsamtes Wachstumsverhalten im Vergleich zu den WT A431 PEK-Zellen. Das reduzierte Wachstum zeigte sich sowohl bei unbehandelten als auch bei KAP-behandelten WPB A431 in Gegenüberstellung mit den WT A431 Zellen, wobei die Empfindlichkeit gegenüber der KAP Behandlung während des dreiwöchigen Versuchszeitraumes erhalten blieb. Dies könnte darauf hindeuten, dass die kumulative Plasmabehandlung und damit einhergehender chronischer oxidativer Stress *in vitro* einen Stammzellähnlichen Charakter induzierte [145,146]. Um die Akkumulation und Ausprägung der Veränderungen durch die wiederholten Plasmabehandlungen besser verstehen und einordnen zu können, werden weiterführende Untersuchungen benötigt, um mögliche Resistenzmechanismen der Tumorzellen gegenüber RS aufzudecken.

Um der Entwicklung von Resistenzen vorzubeugen oder um die Wirkung einer Behandlung zu verstärken, können in der Medizin Kombinationen verschiedener Therapien eingesetzt werden. Durch den Einsatz verschiedener Medikamente, wie die Kombination unterschiedlicher Immuncheckpointinhibitoren oder dieser mit Chemotherapeutika, konnte beim MM gezeigt werden, dass das Ansprechen auf die Therapie erhöht wurde und somit auch das progressionsfreie Überleben [147]. Durch die Kombination verschiedener Arzneimittel können aber nicht nur die gewollten Effekte überwiegen, es kann auch zu einer Steigerung der Nebenwirkungen kommen, so geschehen bei der Kombination von Antikörpern gegen die Immuncheckpointinhibitoren CTLA-4 (Ipilimumab) und PD-1 (Nivolumab) [148]. Das Gesamtüberleben wurde gegenüber der Ipilimumab Monotherapie verbessert, gleichzeitig aber die Toxizität gesteigert. Patienten mit einer BRAF-V600 Mutation profitieren durch den Einsatz von BRAF

Diskussion

Inhibitoren [149]. Die Monotherapie wird jedoch durch die Ausbildung von sekundären Resistenzen gegen BRAF Inhibitoren limitiert. Eine Kombination von BRAF und MEK Inhibitoren kann das Ansprechen, das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben der Patienten verbessern [147]. Trotz dieser vielversprechenden neuen Therapieansätze besteht weiter ein Bedarf an effektiven Behandlungsoptionen, da insbesondere bei vorgeschrittenen Stadien beim MM oder Auftreten von Metastasen, die Mortalität nach wie vor sehr hoch ist. In diesem Zusammenhang konnten experimentelle Arbeiten durch die Kombination von Nanopartikeln und KAP bereits vielversprechende Ergebnisse erzielen. Der Einsatz von KAP erhöhte die Aufnahme von Goldnanopartikeln in Glioblastom und MM-Zellen, was zu einer gesteigerten Apoptose der Tumorzellen, induziert durch die Nanopartikel, führte [150–152]. Ein Ansatz um einer potentiellen Resistenzbildung gegenüber einer Monotherapie mit KAP zu umgehen, wäre die Kombination mit anderen Therapieoptionen wie der chirurgischen Resektion, des gemeinsamen Einsatzes mit Chemotherapeutika oder wie in dieser Arbeit erörtert, die Kombination von KAP mit small molecules.

Synergistische Effekte bei der Kombination von KAP und small molecules konnten in der vorliegenden Arbeit bei der MM Zelllinie A375 *in vivo* verzeichnet werden. Eine Kombination der beiden Monotherapien führte zu einer Verlangsamung der Tumorwachstumskinetik, nachgewiesen durch eine Verringerung des Tumolvolumens im Vergleich zu der jeweiligen Monotherapie. Bei dem Einsatz der beiden Chromon-Derivate als Monotherapeutikum zeigten die Tumoren ein sehr unterschiedliches Ansprechen auf IS112 und SM837. Es konnte nachgewiesen werden das SM837 als Monotherapeutikum keinen Einfluss auf die Tumorprogression hatte, wohingegen IS112 auch alleine das Tumolvolumen reduzieren konnte. Neben dem unterschiedlichen Ansprechen der Tumoren auf die Chromon-Derivate zeigten IS112 und SM837 zudem ein konträres Toxizitätsprofil. Bei der eingesetzten Dosis von IS112 zeigte sich eine letale Toxizität bei der kumulativen Verabreichung, gesteigert durch die Kombination mit Plasma. Die Verbindung SM837 erwies sich in der Monotherapie und in Kombination mit KAP als nicht toxisch im Tiermodell. Chromone und seine Derivate sind für ihre antikanzerogenen Eigenschaften bekannt. Daneben weisen sie ein breites Wirkspektrum verschiedener biologischer Aktivitäten auf. Sie können antimikrobiell, antiviral, antiinflammatorisch und antioxidativ wirken [153,154]. Ihre onkologischen Effekte können sie entfalten, in dem sie als Alkylierungsmittel, Topoisomerase-Inhibitoren, RNA/DNA-Antimetabolite oder antimitotische Mittel wirken [153]. Chromone sind in der Natur weit verbreitete Verbindungen, zeichnen sich z. B. für

Diskussion

die Pigmentierung von einigen Pflanzen verantwortlich und sind heterozyklisch aufgebaut [154]. Es ist bekannt, dass Chromone eine antikanzerogene Wirkung gegen multiresistente Krebszelllinien aufweisen [155–157]. Ein Chromon-Derivat war in der Lage bei resistenten K562 Zellen die Multi Drug Resistance *in vitro* zu modulieren und somit die Zytotoxizität von Daunorubicin zu verstärken [158]. Neben der Möglichkeit Chromone und seine Derivate in Kombination mit bereits bekannten Arzneimitteln zu verwenden, können diese ihre antikanzerogene Wirkung als Monotherapie über Vermittlung von Zytotoxizität, Anti-Metastasierung, Anti-Angiogenese und Immunregulation entfalten [159]. Welche Wirkmechanismen den in dieser Arbeit verwendeten Chromon-Derivaten zugrunde lag, wurde nicht tiefergehend evaluiert. Insbesondere für die Aufklärung der synergistischen Wirkungsweise von SM837 und KAP in Kombination, da sehr vielversprechend, sind weiterführende Arbeiten notwendig. Eine *ex vivo* Analyse der Apoptose in den behandelten Tumoren ergab kein Unterschied zwischen SM837 und KAP-behandelten Tumoren im Vergleich zu unbehandelten Tumoren. Dies könnte eventuell auf eine Inhibierung der Proliferation hindeuten.

8.3 Ausblick und potentielle klinische Anwendungsfelder

Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass KAP eine vielversprechende Behandlungsoption für die Krebstherapie darstellt und die Möglichkeit bietet, topisch lokalisierte Tumoren zu behandeln. Ferner bietet die Kombinationstherapie von KAP und small molecules das Potential, der Entstehung von sekundären Therapieresistenzen durch synergistische Wirkverstärkung entgegen zu wirken. Die gewonnenen Daten zeigen auch, dass die Bildung RS in Tumoren nach KAP Behandlung mit der CL-Sonde L-012 direkt *in vivo* nachgewiesen werden kann. Aufgrund der reduzierten Wachstumskinetik beider Tumorentitäten kann davon ausgegangen werden, dass die Wirkung von KAP lokal vermittelt wird, so dass diese Technologie als Behandlungsoption für oberflächliche Tumoren oder, was eher wahrscheinlich wäre, als adjuvante Therapie zusätzlich zu etablierten Standardtherapien, wie der lokalen Resektion von Hautkrebs, eingesetzt werden könnte. Zudem wäre vorstellbar, dass nach der Resektion entsprechender Tumorareale KAP auch zur Behandlung des Resektionsrandes eingesetzt werden könnte, um eine vollständige lokale Entfernung der malignen Zellen zu erreichen. Eine weitere potentielle Einsatzmöglichkeit von KAP wäre die Behandlung von Präkanzerosen des Hautkrebses, wie die aktinische Keratose, die in ihrem Verlauf zu einem Plattenepithelkarzinom

Diskussion

entarten kann. In diesem Zusammenhang konnte bereits in einer Patientenstudie gezeigt werden, dass es nach der mehrmaligen KAP Behandlung der betroffenen Areale zu einer positiven Abnahme des Krankheitsbildes ohne Auftreten von Nebenwirkungen kam [160].

Um KAP als Behandlungsoption zu den bestehenden Krebstherapien hinzuzufügen, müssen jedoch weitere präklinische und klinische Studien durchgeführt werden. Ein erster Schritt könnte darin bestehen, orthotope Mausmodelle mit intaktem Immunsystem und lokalen Hauttumoren zu verwenden, um den Einfluss der Behandlung auf die durch das Immunsystem vermittelte antikanzerogene Wirkung besser zu untersuchen und zu verstehen. Eine Möglichkeit hierfür wäre die Humanisierung von NSG Mäusen mit Zellen der lymphoiden und myeloiden Reihe. In Anbetracht des immerwährenden Bedarfs an neuartigen, innovativen Therapien zur Behandlung von Hautkrebs, insbesondere mit Blick auf mögliche Resistenzen bei Monotherapien, müssen die zugrundeliegenden synergistischen Mechanismen der vielversprechenden Wirkstoffkombination von SM837 und KAP in weiterführenden Arbeiten evaluiert werden.

9 Literaturverzeichnis

1. Roser, M.; Ritchie, H. Burden of Disease Available online: <https://ourworldindata.org/burden-of-disease> (accessed on Oct 27, 2021).
2. World Health Organization (WHO) Global Health Estimates 2020: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2019 Available online: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/gh-leading-causes-of-death> (accessed on Oct 28, 2021).
3. Global Burden of Disease Collaborative Network. Global Burden of Disease Study 2019 (GBD 2019) Results. Deaths - Neoplasms - Sex: Both - Age: All Ages (Number) Available online: <http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool?params=gbd-api-2019-permalink/ce0527d525d00d632fae4d5cdb780daf> (accessed on Oct 29, 2021).
4. Linares, M.A.; Zakaria, A.; Nizran, P. Skin Cancer. *Prim. Care - Clin. Off. Pract.* **2015**, *42*, 645–659, doi:10.1016/j.pop.2015.07.006.
5. Gordon, R. Skin cancer: An overview of epidemiology and risk factors. *Semin. Oncol. Nurs.* **2013**, *29*, 160–169, doi:10.1016/j.soncn.2013.06.002.
6. American Cancer Society What are basal and squamous cell skin cancers? Available online: <https://www.cancer.org/cancer/basal-and-squamous-cell-skin-cancer/about/what-is-basal-and-squamous-cell.html> (accessed on Aug 3, 2022).
7. Reichrath, J. *Sunlight, Vitamin D and Skin Cancer*; Springer New York, 2014;
8. Rogers, H.W.; Weinstock, M.A.; Feldman, S.R.; Coldiron, B.M. Incidence estimate of nonmelanoma skin cancer (keratinocyte carcinomas) in the us population, 2012. *JAMA Dermatology* **2015**, *151*, 1081–1086, doi:10.1001/jamadermatol.2015.1187.
9. Corchado-Cobos, R.; García-Sancha, N.; González-Sarmiento, R.; Pérez-Losada, J.; Cañueto, J. Cutaneous squamous cell carcinoma: From biology to therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, doi:10.3390/ijms21082956.
10. Ferlay, J.; Colombet, M.; Soerjomataram, I.; Parkin, D.M.; Piñeros, M.; Znaor, A.; Bray, F. Cancer statistics for the year 2020: an overview. *Int. J. Cancer* **2021**, 1–12, doi:10.1002/ijc.33588.
11. Katalinic, A. *Update-Zahlen zu Hautkrebs in Deutschland*; 2019;
12. Augustin, M.; Glaeske, G. *Hautkrebsreport 2019*; 2019;
13. Guerrero-Preston, R.; Ogawa, T.; Uemura, M.; Shumulinsky, G.; Valle, B.L.; Pirini, F.;

- Ravi, R.; Sidransky, D.; Keidar, M.; Trink, B. Cold atmospheric plasma treatment selectively targets head and neck squamous cell carcinoma cells. *Int. J. Mol. Med.* **2014**, *34*, 941–946, doi:10.3892/ijmm.2014.1849.
14. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer statistics, 2020. *CA. Cancer J. Clin.* **2020**, *70*, 7–30, doi:10.3322/caac.21590.
15. Que, S.K.T.; Zwald, F.O.; Schmults, C.D. Cutaneous squamous cell carcinoma: Incidence, risk factors, diagnosis, and staging. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2018**, *78*, 237–247, doi:10.1016/j.jaad.2017.08.059.
16. Eigentler, T.K.; Leiter, U.; Häfner, H.M.; Garbe, C.; Röcken, M.; Breuninger, H. Survival of Patients with Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: Results of a Prospective Cohort Study. *J. Invest. Dermatol.* **2017**, *137*, 2309–2315, doi:10.1016/j.jid.2017.06.025.
17. Brougham, N.D.L.S.; Dennett, E.R.; Cameron, R.; Tan, S.T. The incidence of metastasis from cutaneous squamous cell carcinoma and the impact of its risk factors. *J. Surg. Oncol.* **2012**, *106*, 811–815, doi:10.1002/jso.23155.
18. Burton, K.A.; Ashack, K.A.; Khachemoune, A. Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: A Review of High-Risk and Metastatic Disease. *Am. J. Clin. Dermatol.* **2016**, *17*, 491–508, doi:10.1007/s40257-016-0207-3.
19. Apalla, Z.; Nashan, D.; Weller, R.B.; Castellsagué, X. Skin Cancer: Epidemiology, Disease Burden, Pathophysiology, Diagnosis, and Therapeutic Approaches. *Dermatol. Ther. (Heidelb)*. **2017**, *7*, 5–19, doi:10.1007/s13555-016-0165-y.
20. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research Skin cancer | World Cancer Research Fund International Available online: <https://www.wcrf.org/dietandcancer/skin-cancer/> (accessed on Nov 1, 2021).
21. Didona, D.; Paolino, G.; Bottoni, U.; Cantisani, C. Non melanoma skin cancer pathogenesis overview. *Biomedicines* **2018**, *6*, 1–15, doi:10.3390/biomedicines6010006.
22. De Vries, E.; Trakatelli, M.; Kalabalikis, D.; Ferrandiz, L.; Ruiz-De-Casas, A.; Moreno-Ramirez, D.; Sotiriadis, D.; Ioannides, D.; Aquilina, S.; Apap, C.; et al. Known and potential new risk factors for skin cancer in European populations: A multicentre case-control study. *Br. J. Dermatol.* **2012**, *167*, 1–13, doi:10.1111/j.1365-2133.2012.11081.x.
23. Benjamin, C.L.; Ananthaswamy, H.N. p53 and the pathogenesis of skin cancer. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2007**, *224*, 241–248.

Literaturverzeichnis

24. Brenner, M.; Hearing, V.J. The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochem. Photobiol.* 2008, *84*, 539–549.
25. Narayanan, D.L.; Saladi, R.N.; Fox, J.L. Ultraviolet radiation and skin cancer. *Int. J. Dermatol.* 2010, *49*, 978–986.
26. Schwarz, A.; Noordegraaf, M.; Maeda, A.; Torii, K.; Clausen, B.E.; Schwarz, T. Langerhans cells are required for UVR-induced immunosuppression. *J. Invest. Dermatol.* **2010**, *130*, 1419–1427, doi:10.1038/jid.2009.429.
27. Rittié, L.; Fisher, G.J. UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Res. Rev.* **2002**, *1*, 705–720, doi:10.1016/S1568-1637(02)00024-7.
28. López-Camarillo, C.; Ocampo, E.A.; Casamichana, M.L.; Pérez-Plasencia, C.; Álvarez-Sánchez, E.; Marchat, L.A. Protein kinases and transcription factors activation in response to UV-radiation of skin: Implications for carcinogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 142–172, doi:10.3390/ijms13010142.
29. Ouhtit, A.; Konrad Muller, H.; Gorny, A.; Ananthaswamy, H.N. UVB-induced experimental carcinogenesis: Dysregulation of apoptosis and p53 signalling pathway. *Redox Rep.* **2000**, *5*, 128–129, doi:10.1179/135100000101535447.
30. Karagas, M.R.; McDonald, J.A.; Greenberg, E.R.; Stukel, T.A.; Weiss, J.E.; Baron, J.A.; Stevens, M.M. Risk of basal cell and squamous cell skin cancers after ionizing radiation therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* **1996**, *88*, 1848–1853, doi:10.1093/jnci/88.24.1848.
31. Moloney, F.J.; Comber, H.; O’Lorcain, P.; O’Kelly, P.; Conlon, P.J.; Murphy, G.M. A population-based study of skin cancer incidence and prevalence in renal transplant recipients. *Br. J. Dermatol.* **2006**, *154*, 498–504, doi:10.1111/j.1365-2133.2005.07021.x.
32. Bavinck, J.N.B.; Plasmeijer, E.I.; Feltkamp, M.C.W. β -Papillomavirus Infection and Skin Cancer. *J. Invest. Dermatol.* **2008**, *128*, 1355–1358, doi:10.1038/JID.2008.123.
33. Glogau, R.G. The risk of progression to invasive disease. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2000**, *42*, doi:10.1067/mjd.2000.103339.
34. Deutsche Krebsgesellschaft Das Maligne Melanom: „Schwarzer Hautkrebs“ | DKG Available online: <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/hautkrebs/malignes-melanom-schwarzer-hautkrebs.html> (accessed on Aug 4, 2022).
35. Cummins, D.L.; Cummins, J.M.; Pantle, H.; Silverman, M.A.; Leonard, A.L.; Chanmugam,

- A. Cutaneous malignant melanoma. *Mayo Clin. Proc.* 2006, *81*, 500–507.
36. Dinnes, J.; Di Ruffano, L.F.; Takwoingi, Y.; Cheung, S.T.; Nathan, P.; Matin, R.N.; Chuchu, N.; Ann Chan, S.; Durack, A.; Bayliss, S.E.; et al. Ultrasound, CT, MRI, or PET-CT for staging and re-staging of adults with cutaneous melanoma. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2019, 2019.
37. Duncan, J.R.; Carr, D.; Kaffenberger, B.H. The utility of positron emission tomography with and without computed tomography in patients with nonmelanoma skin cancer. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2016**, *75*, 186–196, doi:10.1016/j.jaad.2016.01.045.
38. Hoge, J.C.; Schadendorf, D. Update der S3-Leitlinie zum malignen Melanom: Aktuelle Empfehlungen für das fortgeschrittene Melanom. *Best Pract. Onkol.* **2017**, *12*, 110–119, doi:10.1007/s11654-017-0015-0.
39. Cagney, D.N.; Martin, A.M.; Catalano, P.J.; Redig, A.J.; Lin, N.U.; Lee, E.Q.; Wen, P.Y.; Dunn, I.F.; Bi, W.L.; Weiss, S.E.; et al. Incidence and prognosis of patients with brain metastases at diagnosis of systemic malignancy: A population-based study. *Neuro. Oncol.* **2017**, *19*, 1511–1521, doi:10.1093/neuonc/nox077.
40. Padma, V.V. An overview of targeted cancer therapy. *Biomed.* **2015**, *5*, 1–6, doi:10.7603/s40681-015-0019-4.
41. American Cancer Society Cancer Facts & Figures 2010. *Atlanta Am. Cancer Soc.* **2010**, 68.
42. Li, T.; Kang, G.; Wang, T.; Huang, H. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic gene therapy for cancer (Review). *Oncol. Lett.* **2018**, *16*, 687–702, doi:10.3892/ol.2018.8733.
43. Stratigos, A.; Garbe, C.; Lebbe, C.; Malvehy, J.; Del Marmol, V.; Pehamberger, H.; Peris, K.; Becker, J.C.; Zalaudek, I.; Saiag, P.; et al. Diagnosis and treatment of invasive squamous cell carcinoma of the skin: European consensus-based interdisciplinary guideline. *Eur. J. Cancer* **2015**, *51*, 1989–2007, doi:10.1016/j.ejca.2015.06.110.
44. Maubec, E.; Duvillard, P.; Velasco, V.; Crickx, B.; Avril, M.F. Immunohistochemical analysis of EGFR and HER-2 in patients with metastatic squamous cell carcinoma of the skin. *Anticancer Res.* **2005**, *25*, 1205–1210.
45. Metelmann, H.-R.; Seebauer, C.; Miller, V.; Fridman, A.; Bauer, G.; Graves, D.B.; Pouvesle, J.-M.; Rutkowski, R.; Schuster, M.; Bekeschus, S.; et al. Clinical experience with cold plasma in the treatment of locally advanced head and neck cancer. *Clin. Plasma Med.* **2018**, *9*, 6–13, doi:10.1016/j.cpme.2017.09.001.

Literaturverzeichnis

46. Bekeschus, S.; Liebelt, G.; Menz, J.; Berner, J.; Sagwal, S.K.; Wende, K.; Weltmann, K.D.; Boeckmann, L.; von Woedtke, T.; Metelmann, H.R.; et al. Tumor cell metabolism correlates with resistance to gas plasma treatment: The evaluation of three dogmas. *Free Radic. Biol. Med.* **2021**, *167*, 12–28, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2021.02.035.
47. Tendero, C.; Tixier, C.; Tristant, P.; Desmaison, J.; Leprince, P. Atmospheric pressure plasmas: A review. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **2006**, *61*, 2–30, doi:10.1016/j.sab.2005.10.003.
48. Annemie, B.; Neyts, E.; Gijbels, R.; Mullen, J. Van der Gas Discharge Plasmas and Their Applications, *Spectrochimica Acta Part B* 57. *Spectrochim. Acta Part B* **2002**, *57*, 609–658.
49. Yan, D.; Sherman, J.H.; Keidar, M. Cold atmospheric plasma, a novel promising anti-cancer treatment modality. *Oncotarget* **2017**, *8*, 15977–15995, doi:10.18632/oncotarget.13304.
50. Gerling, T.; Weltmann, K.D. Einführung in Atmosphärendruck-Plasmaquellen für plasmamedizinische Anwendungen. In *Plasmamedizin*; Springer, Berlin, Heidelberg, 2016; pp. 3–15.
51. Gay-Mimbrera, J.; García, M.C.; Isla-Tejera, B.; Rodero-Serrano, A.; García-Nieto, A.V.; Ruano, J. Clinical and Biological Principles of Cold Atmospheric Plasma Application in Skin Cancer. *Adv. Ther.* **2016**, *33*, 894–909, doi:10.1007/s12325-016-0338-1.
52. Tiede, R.; Helmke, A.; Wandke, D.; Viöl, W.; Emmert, S. PlasmaDerm®: kaltes Atmosphärendruckplasma als Spitzeninnovation. *Spitzenforsch. der Dermatologie* **2015**, 70–80.
53. Bernhardt, T.; Semmler, M.L.; Schäfer, M.; Bekeschus, S.; Emmert, S.; Boeckmann, L. Plasma Medicine: Applications of Cold Atmospheric Pressure Plasma in Dermatology. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**, *2019*, 10–13, doi:10.1155/2019/3873928.
54. Gandhirajan, R.K.; Rödder, K.; Bodnar, Y.; Pasqual-Melo, G.; Emmert, S.; Griguer, C.E.; Weltmann, K.-D.; Bekeschus, S. Cytochrome C oxidase Inhibition and Cold Plasma-derived Oxidants Synergize in Melanoma Cell Death Induction. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 12734, doi:10.1038/s41598-018-31031-2.
55. Keidar, M.; Walk, R.; Shashurin, A.; Srinivasan, P.; Sandler, A.; Dasgupta, S.; Ravi, R.; Guerrero-Preston, R.; Trink, B. Cold plasma selectivity and the possibility of a paradigm shift in cancer therapy. *Br. J. Cancer* **2011**, *105*, 1295–1301, doi:10.1038/bjc.2011.386.

Literaturverzeichnis

56. Metelmann, H.R.; Nedrelow, D.S.; Seebauer, C.; Schuster, M.; von Woedtke, T.; Weltmann, K.D.; Kindler, S.; Metelmann, P.H.; Finkelstein, S.E.; Von Hoff, D.D.; et al. Head and neck cancer treatment and physical plasma. *Clin. Plasma Med.* **2015**, *3*, 17–23, doi:10.1016/j.cpme.2015.02.001.
57. Metelmann, H.R.; Seebauer, C.; Rutkowski, R.; Schuster, M.; Bekeschus, S.; Metelmann, P. Treating cancer with cold physical plasma: On the way to evidence-based medicine. *Contrib. to Plasma Phys.* **2018**, *58*, 415–419, doi:10.1002/ctpp.201700085.
58. Ishaq, M.; Kumar, S.; Varinli, H.; Han, Z.J.; Rider, A.E.; Evans, M.D.M.; Murphy, A.B.; Ostrikov, K. Atmospheric gas plasma-induced ROS production activates TNF-ASK1 pathway for the induction of melanoma cancer cell apoptosis. *Mol. Biol. Cell* **2014**, *25*, 1523–1531, doi:10.1091/mbc.E13-10-0590.
59. Kaushik, N.K.; Kaushik, N.; Park, D.; Choi, E.H. Altered antioxidant system stimulates dielectric barrier discharge plasma-induced cell death for solid tumor cell treatment. *PLoS One* **2014**, *9*, 1–11, doi:10.1371/journal.pone.0103349.
60. Rebl, H.; Sawade, M.; Hein, M.; Bergemann, C.; Wende, M.; Lalk, M.; Langer, P.; Emmert, S.; Nebe, B. Synergistic effect of plasma-activated medium and novel indirubin derivatives on human skin cancer cells by activation of the AhR pathway. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 1–15, doi:10.1038/s41598-022-06523-x.
61. Dougherty, T.; Pucci, M. *Antibiotic Discovery and Development (Google eBook)*; 2011; ISBN 1461414008.
62. Wishart, D.S. Chapter 3: Small Molecules and Disease. *PLoS Comput. Biol.* **2012**, *8*, e1002805, doi:10.1371/journal.pcbi.1002805.
63. Calderwood, S.K.; Khaleque, M.A.; Sawyer, D.B.; Ciocca, D.R. Heat shock proteins in cancer: Chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem. Sci.* **2006**, *31*, 164–172, doi:10.1016/j.tibs.2006.01.006.
64. Scaltriti, M.; Dawood, S.; Cortes, J. Molecular pathways: Targeting Hsp90 - Who benefits and who does not. *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 4508–4513, doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-2138.
65. Arkin, M.M.R.; Wells, J.A. Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: Progressing towards the dream. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 301–317, doi:10.1038/nrd1343.
66. Lipinski, C.A. Lead- and drug-like compounds: The rule-of-five revolution. *Drug Discov.*

- Today Technol.* 2004, *1*, 337–341.
67. Pardridge, W.M. The blood-brain barrier: Bottleneck in brain drug development. *NeuroRx* **2005**, *2*, 3–14, doi:10.1602/neurorx.2.1.3.
68. McArthur, G.A.; Chapman, P.B.; Robert, C.; Larkin, J.; Haanen, J.B.; Dummer, R.; Ribas, A.; Hogg, D.; Hamid, O.; Ascierto, P.A.; et al. Safety and efficacy of vemurafenib in BRAFV600E and BRAFV600K mutation-positive melanoma (BRIM-3): Extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study. *Lancet Oncol.* **2014**, *15*, 323–332, doi:10.1016/S1470-2045(14)70012-9.
69. Nomura, M.; Tsukada, H.; Ichimatsu, D.; Ito, H.; Yoshida, T.; Miyamoto, K.I. Inhibition of epidermal growth factor-induced cell transformation by tannins. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 2038–2046, doi:10.1016/j.phytochem.2005.01.018.
70. Kunz, M.; Driller, K.M.; Hein, M.; Libnow, S.; Hohensee, I.; Ramer, R.; Hinz, B.; Berger, A.; Eberle, J.; Langer, P. Synthesis of thia-analogous indirubin n-glycosides and their influence on melanoma cell growth and apoptosis. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 534–539, doi:10.1002/cmdc.200900506.
71. Schäfer, M.; Semmler, M.L.; Bernhardt, T.; Fischer, T.; Kakkassery, V.; Ramer, R.; Hein, M.; Bekeschus, S.; Langer, P.; Hinz, B.; et al. Small Molecules in the Treatment of Squamous Cell Carcinomas: Focus on Indirubins. *Cancers* 2021, Vol. 13, Page 1770 **2021**, *13*, 1770, doi:10.3390/CANCERS13081770.
72. Yip, H.Y.K.; Papa, A. Signaling pathways in cancer: Therapeutic targets, combinatorial treatments, and new developments. *Cells* **2021**, *10*, 1–30, doi:10.3390/cells10030659.
73. Xiao, Z.; Hao, Y.; Liu, B.; Qian, L. Indirubin and Meisoindigo in the treatment of chronic myelogenous leukemia in China. *Leuk. Lymphoma* **2002**, *43*, 1763–1768, doi:10.1080/1042819021000006295.
74. Beauchard, A.; Ferandin, Y.; Frère, S.; Lozach, O.; Blairvacq, M.; Meijer, L.; Thiéry, V.; Besson, T. Synthesis of novel 5-substituted indirubins as protein kinases inhibitors. *Bioorganic Med. Chem.* **2006**, *14*, 6434–6443, doi:10.1016/j.bmc.2006.05.036.
75. The Jackson Laboratory NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ NSG Strain Details The Jackson Laboratory Available online: <https://www.jax.org/strain/005557> (accessed on Jun 22, 2022).
76. Tang, G.; Seume, N.; Häger, C.; Kumstel, S.; Abshagen, K.; Bleich, A.; Vollmar, B.; Talbot, S.R.; Zhang, X. Comparing distress of mouse models for liver damage. *Sci. Rep.* **2020**, 1–

- 12, doi:10.1038/s41598-020-76391-w.
77. Shultz, L.D.; Lyons, B.L.; Burzenski, L.M.; Gott, B.; Chen, X.; Chaleff, S.; Kotb, M.; Gillies, S.D.; King, M.; Mangada, J.; et al. Human Lymphoid and Myeloid Cell Development in NOD/LtSz- scid IL2R γ null Mice Engrafted with Mobilized Human Hemopoietic Stem Cells . *J. Immunol.* **2005**, *174*, 6477–6489, doi:10.4049/jimmunol.174.10.6477.
78. Reuter, S.; Von Woedtke, T.; Weltmann, K.D. The kINPen - A review on physics and chemistry of the atmospheric pressure plasma jet and its applications. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2018**, *51*, doi:10.1088/1361-6463/aab3ad.
79. Schwarzenböck, S.M.; Stenzel, J.; Otto, T.; Helldorff, H. V.; Bergner, C.; Kurth, J.; Polei, S.; Lindner, T.; Rauer, R.; Hohn, A.; et al. [68Ga]pentixafor for CXCR4 imaging in a PC-3 prostate cancer xenograft model - comparison with [18F]FDG PET/CT, MRI and ex vivo receptor expression. *Oncotarget* **2017**, *8*, 95606–95619, doi:10.18632/oncotarget.21024.
80. Lothar, T. Labor und Diagnose 2020 | Kapitel 20: Zytokine und Zytokinrezeptoren Available online: <https://www.labor-und-diagnose-2020.de/k20.html> (accessed on Jun 22, 2022).
81. Gamboa, J.M.; Leong, K.W. In vitro and in vivo models for the study of oral delivery of nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 800–810, doi:10.1016/j.addr.2013.01.003.
82. Xu, Y.; Shrestha, N.; Pr at, V.; Beloqui, A. An overview of in vitro, ex vivo and in vivo models for studying the transport of drugs across intestinal barriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2021**, *175*, 113795, doi:10.1016/j.addr.2021.05.005.
83. Cao, X.; Shores, E.W.; Hu-Li, J.; Anver, M.R.; Kelsail, B.L.; Russell, S.M.; Drago, J.; Noguchi, M.; Grinberg, A.; Bloom, E.T.; et al. Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor γ chain. *Immunity* **1995**, *2*, 223–238, doi:10.1016/1074-7613(95)90047-0.
84. Greiner, D.L.; Hesselton, R.A.; Shultz, L.D. SCID mouse models of human stem cell engraftment. *Stem Cells* **1998**, *16*, 166–177, doi:10.1002/stem.160166.
85. Blunt, T.; Finnie, N.J.; Taccioli, G.E.; Smith, G.C.M.; Demengeot, J.; Gottlieb, T.M.; Mizuta, R.; Varghese, A.J.; Alt, F.W.; Jeggo, P.A.; et al. Defective DNA-dependent protein kinase activity is linked to V(D)J recombination and DNA repair defects associated with the murine scid mutation. *Cell* **1995**, *80*, 813–823, doi:10.1016/0092-8674(95)90360-7.

86. Okada; Vaeteewoottacharn; Kariya Application of Highly Immunocompromised Mice for the Establishment of Patient-Derived Xenograft (PDX) Models. *Cells* **2019**, *8*, 889, doi:10.3390/cells8080889.
87. Wang, B.; Qin, L.; Ren, M.; Sun, H. Effects of Combination of Anti-CTLA-4 and Anti-PD-1 on Gastric Cancer Cells Proliferation, Apoptosis and Metastasis. *Cell. Physiol. Biochem.* **2018**, *49*, 260–270, doi:10.1159/000492876.
88. Wang, M.; Yao, L.C.; Cheng, M.; Cai, D.; Martinek, J.; Pan, C.X.; Shi, W.; Ma, A.H.; De Vere White, R.W.; Airhart, S.; et al. Humanized mice in studying efficacy and mechanisms of PD-1-targeted cancer immunotherapy. *FASEB J.* **2018**, *32*, 1537–1549, doi:10.1096/fj.201700740R.
89. Hammoud, Z.; Tan, B.; Badve, S.; Bigsby, R.M. Estrogen promotes tumor progression in a genetically defined mouse model of lung adenocarcinoma. *Endocr. Relat. Cancer* **2008**, *15*, 475–483, doi:10.1677/ERC-08-0002.
90. Mollo, M.R.; Antonini, D.; Cirillo, L.; Missero, C. Research Techniques Made Simple: Skin Carcinogenesis Models: Xenotransplantation Techniques. *J. Invest. Dermatol.* 2016, *136*, e13–e17.
91. Sandison, J.C. A new method for the microscopic study of living growing tissues by the introduction of a transparent chamber in the rabbit's ear. *Anat. Rec.* **1924**, *28*, 281–287, doi:10.1002/ar.1090280403.
92. Algire, G.H.; Legallais, F.Y. Recent Developments in the Transparent-Chamber Technique as Adapted to the Mouse. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **1949**, *10*, 225–253, doi:10.1093/jnci/10.2.225.
93. Doyle, M.E.; Perley, J.P.; Skalak, T.C. Bone marrow-derived progenitor cells augment venous remodeling in a mouse dorsal skinfold chamber model. *PLoS One* **2012**, *7*, 1–11, doi:10.1371/journal.pone.0032815.
94. Aubin, K.; Vincent, C.; Proulx, M.; Mayrand, D.; Fradette, J. Creating capillary networks within human engineered tissues: Impact of adipocytes and their secretory products. *Acta Biomater.* **2015**, *11*, 333–345, doi:10.1016/j.actbio.2014.09.044.
95. Ho-Tin-Noé, B.; Boulaftali, Y.; Lamrani, L.; Rouzaud, M.C.; Loyau, S.; Jandrot-Perrus, M.; Bouton, M.C. The mouse dorsal skinfold chamber as a model for the study of thrombolysis by intravital microscopy. *Thromb. Haemost.* **2012**, *107*, 962–971, doi:10.1160/TH11-10-0705.

96. Reeves, K.J.; Hurrell, J.E.; Cecchini, M.; Van Der Pluijm, G.; Down, J.M.; Eaton, C.L.; Hamdy, F.; Clement-Lacroix, P.; Brown, N.J. Prostate cancer cells home to bone using a novel in vivo model: Modulation by the integrin antagonist GLPG0187. *Int. J. Cancer* **2015**, *136*, 1731–1740, doi:10.1002/ijc.29165.
97. Baron, V.T.; Welsh, J.; Abedinpour, P.; Borgström, P. Intravital microscopy in the mouse dorsal chamber model for the study of solid tumors. *Am. J. Cancer Res.* **2011**, *1*, 674–86.
98. Dahmke, I.N.; Ampofo, E.; Menger, M.D.; Laschke, M.W. The dorsal skinfold chamber: A valuable model for the in vivo evaluation of topical formulations. *Exp. Dermatol.* **2019**, *28*, 940–947, doi:10.1111/exd.13983.
99. Schreiter, J.; Meyer, S.; Schmidt, C.; Schulz, R.M.; Langer, S. Dorsal skinfold chamber models in mice. *GMS Interdiscip. Plast. Reconstr. Surg. DGPW* **2017**, *6*, Doc10, doi:10.3205/iprs000112.
100. Laschke, M.W.; Menger, M.D. The dorsal skinfold chamber: A versatile tool for preclinical research in tissue engineering and regenerative medicine. *Eur. Cells Mater.* **2016**, *32*, 202–215, doi:10.22203/eCM.v032a13.
101. Yu, Z.; Ren, W.; Gan, Q.; Li, J.; Li, X.; Zhang, S.; Jin, F.; Cheng, C.; Ting, Y.; Xu, R.X. Image-guided cold atmosphere plasma (CAP) therapy for cutaneous wound. *Adv. Biomed. Clin. Diagnostic Surg. Guid. Syst. XIV* **2016**, *9698*, 96980K, doi:10.1117/12.2212516.
102. Rohde, S.; Lindner, T.; Polei, S.; Stenzel, J.; Borufka, L.; Achilles, S.; Hartmann, E.; Lange, F.; Maletzki, C.; Linnebacher, M.; et al. Application of in vivo imaging techniques to monitor therapeutic efficiency of PLX4720 in an experimental model of microsatellite instable colorectal cancer. *Oncotarget* **2017**, *8*, 69756–69767, doi:10.18632/oncotarget.19263.
103. Zielonka, J.; Lambeth, J.D.; Kalyanaraman, B. On the use of L-012, a luminol-based chemiluminescent probe, for detecting superoxide and identifying inhibitors of NADPH oxidase: A reevaluation. *Free Radic. Biol. Med.* **2013**, *65*, 1310–1314, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.09.017.
104. Imada, I.; Sato, E.F.; Miyamoto, M.; Ichimori, Y.; Minamiyama, Y.; Konaka, R.; Inoue, M. Analysis of reactive oxygen species generated by neutrophils using a chemiluminescence probe L-012. *Anal. Biochem.* **1999**, *271*, 53–58, doi:10.1006/abio.1999.4107.

105. Ichibangase, T.; Ohba, Y.; Kishikawa, N.; Nakashima, K.; Kuroda, N. Evaluation of lophine derivatives as L-012 (luminol analog)-dependent chemiluminescence enhancers for measuring horseradish peroxidase and H₂O₂. *Luminescence* **2014**, *29*, 118–121, doi:10.1002/bio.2513.
106. Kielland, A.; Blom, T.; Nandakumar, K.S.; Holmdahl, R.; Blomhoff, R.; Carlsen, H. In vivo imaging of reactive oxygen and nitrogen species in inflammation using the luminescent probe L-012. *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, *47*, 760–766, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.06.013.
107. Schwenck, J.; Mehling, R.; Thaiss, W.M.; Kramer, D.; Menendez, I.G.; Öz, H.H.; Hartl, D.; Schulze-Osthoff, K.; Hailfinger, S.; Ghoreschi, K.; et al. Temporal Dynamics of Reactive Oxygen and Nitrogen Species and NF- κ B Activation During Acute and Chronic T Cell–Driven Inflammation. *Mol. Imaging Biol.* **2020**, *22*, 504–514, doi:10.1007/s11307-019-01412-8.
108. Solé-Martí, X.; Espona-Noguera, A.; Ginebra, M.P.; Canal, C. Plasma-conditioned liquids as anticancer therapies In Vivo: Current state and future directions. *Cancers (Basel)*. **2021**, *13*, 1–17, doi:10.3390/cancers13030452.
109. Kaushik, N.K.; Ghimire, B.; Li, Y.; Adhikari, M.; Veerana, M.; Kaushik, N.; Jha, N.; Adhikari, B.; Lee, S.-J.; Masur, K.; et al. Biological and medical applications of plasma-activated media, water and solutions. *Biol. Chem.* **2018**, *400*, 39–62, doi:10.1515/hsz-2018-0226.
110. Yan, D.; Sherman, J.H.; Keidar, M. The Application of the Cold Atmospheric Plasma-Activated Solutions in Cancer Treatment. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **2017**, *18*, 769–775, doi:10.2174/1871520617666170731115233.
111. Eschbach, R.S.; Kazmierczak, P.M.; Heimer, M.M.; Todica, A.; Hirner-Eppeneder, H.; Schneider, M.J.; Keinrath, G.; Solyanik, O.; Olivier, J.; Kunz, W.G.; et al. 18F-FDG-PET/CT and diffusion-weighted MRI for monitoring a BRAF and CDK 4/6 inhibitor combination therapy in a murine model of human melanoma. *Cancer Imaging* **2018**, *18*, 1–11, doi:10.1186/s40644-018-0135-y.
112. Galbán, C.J.; Hoff, B.A.; Chenevert, T.L.; Ross, B.D. Diffusion MRI in early cancer therapeutic response assessment. *NMR Biomed.* **2017**, *30*, doi:10.1002/nbm.3458.
113. Gaur, N.; Szili, E.J.; Oh, J.S.; Hong, S.H.; Michelmore, A.; Graves, D.B.; Hatta, A.; Short, R.D. Combined effect of protein and oxygen on reactive oxygen and nitrogen species in the plasma treatment of tissue. *Appl. Phys. Lett.* **2015**, *107*, 103703,

- doi:10.1063/1.4930874.
114. Schmidt, A.; Liebelt, G.; Striesow, J.; Freund, E.; von Woedtke, T.; Wende, K.; Bekeschus, S. The molecular and physiological consequences of cold plasma treatment in murine skin and its barrier function. *Free Radic. Biol. Med.* **2020**, *161*, 32–49, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2020.09.026.
115. Schmidt, A.; Liebelt, G.; Nießner, F.; von Woedtke, T.; Bekeschus, S. Gas plasma-spurred wound healing is accompanied by regulation of focal adhesion, matrix remodeling, and tissue oxygenation. *Redox Biol.* **2021**, *38*, doi:10.1016/j.redox.2020.101809.
116. Trachootham, D.; Alexandre, J.; Huang, P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: A radical therapeutic approach? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 579–591, doi:10.1038/nrd2803.
117. Yan, D.; Talbot, A.; Nourmohammadi, N.; Sherman, J.H.; Cheng, X.; Keidar, M. Toward understanding the selective anticancer capacity of cold atmospheric plasma—A model based on aquaporins (Review). *Biointerphases* **2015**, *10*, 040801, doi:10.1116/1.4938020.
118. Pressure, A.; Cap, P.; Semmler, M.L.; Bekeschus, S.; Schäfer, M.; Bernhardt, T.; Fischer, T.; Witzke, K.; Seebauer, C.; Rebl, H.; et al. Molecular Mechanisms of the Efficacy of Cold Cancer Treatment. *Cancers (Basel)*. **2020**, 1–19.
119. Perillo, B.; Di Donato, M.; Pezone, A.; Di Zazzo, E.; Giovannelli, P.; Galasso, G.; Castoria, G.; Migliaccio, A. ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. *Exp. Mol. Med.* **2020**, *52*, 192–203.
120. Narendhirakannan, R.T.; Hannah, M.A.C. Oxidative stress and skin cancer: An overview. *Indian J. Clin. Biochem.* **2013**, *28*, 110–115.
121. Hamblin, M.R. Photodynamic Therapy for Cancer: What's Past is Prologue. *Photochem. Photobiol.* **2020**, *96*, 506–516.
122. Keidar, M.; Walk, R.; Shashurin, A.; Srinivasan, P.; Sandler, A.; Dasgupta, S.; Ravi, R.; Guerrero-Preston, R.; Trink, B. Cold plasma selectivity and the possibility of a paradigm shift in cancer therapy. *Br. J. Cancer* **2011**, *105*, 1295–1301, doi:10.1038/bjc.2011.386.
123. Chernets, N.; Kurpad, D.S.; Alexeev, V.; Rodrigues, D.B.; Freeman, T.A. Reaction Chemistry Generated by Nanosecond Pulsed Dielectric Barrier Discharge Treatment is Responsible for the Tumor Eradication in the B16 Melanoma Mouse Model. In *Proceedings of the Plasma Processes and Polymers*; NIH Public Access, 2015; Vol. 12,

- pp. 1400–1409.
124. Privat-Maldonado, A.; Schmidt, A.; Lin, A.; Weltmann, K.D.; Wende, K.; Bogaerts, A.; Bekeschus, S. ROS from Physical Plasmas: Redox Chemistry for Biomedical Therapy. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**, *2019*, doi:10.1155/2019/9062098.
 125. Saadati, F.; Moritz, J.; Berner, J.; Freund, E.; Miebach, L.; Helfrich, I.; Stoffels, I.; Emmert, S.; Bekeschus, S. Patient-derived human basal and cutaneous squamous cell carcinoma tissues display apoptosis and immunomodulation following gas plasma exposure with a certified argon jet. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, doi:10.3390/ijms222111446.
 126. Bekeschus, S.; Moritz, J.; Helfrich, I.; Boeckmann, L.; Weltmann, K.D.; Emmert, S.; Metelmann, H.R.; Stoffels, I.; von Woedtke, T. Ex vivo exposure of human melanoma tissue to cold physical plasma elicits apoptosis and modulates inflammation. *Appl. Sci.* **2020**, *10*, 1–8, doi:10.3390/app10061971.
 127. Vandamme, M.; Robert, E.; Lerondel, S.; Sarron, V.; Ries, D.; Dozias, S.; Sobilo, J.; Gosset, D.; Kieda, C.; Legrain, B.; et al. ROS implication in a new antitumor strategy based on non-thermal plasma. *Int. J. Cancer* **2012**, *130*, 2185–2194, doi:10.1002/ijc.26252.
 128. Hildebrandt, B.; Wust, P.; Ahlers, O.; Dieing, A.; Sreenivasa, G.; Kerner, T.; Felix, R.; Riess, H. The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2002**, *43*, 33–56.
 129. Galluzzi, L.; Vitale, I.; Aaronson, S.A.; Abrams, J.M.; Adam, D.; Agostinis, P.; Alnemri, E.S.; Altucci, L.; Amelio, I.; Andrews, D.W.; et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* **2018**, *25*, 486–541, doi:10.1038/s41418-017-0012-4.
 130. Lin, A.; Chernets, N.; Han, J.; Alicea, Y.; Dobrynin, D.; Fridman, G.; Freeman, T.A.; Fridman, A.; Miller, V. Non-Equilibrium Dielectric Barrier Discharge Treatment of Mesenchymal Stem Cells: Charges and Reactive Oxygen Species Play the Major Role in Cell Death. *Plasma Process. Polym.* **2015**, *12*, 1117–1127, doi:10.1002/ppap.201400232.
 131. Volotskova, O.; Hawley, T.S.; Stepp, M.A.; Keidar, M. Targeting the cancer cell cycle by cold atmospheric plasma. *Sci. Rep.* **2012**, *2*, doi:10.1038/srep00636.
 132. Duan, J.; Lu, X.; He, G. On the penetration depth of reactive oxygen and nitrogen species generated by a plasma jet through real biological tissue. *Phys. Plasmas* **2017**, *24*, doi:10.1063/1.4990554.

133. Layssol-Lamour, C.J.; Sarry, J.E.; Braun, J.P.D.; Trumel, C.; Bourgès-Abella, N.H. Reference values for hematology, plasma biochemistry, bone marrow cytology and bone histology of NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ Immunodeficient Mice. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* **2021**, *60*, 4–17, doi:10.30802/AALAS-JAALAS-20-000020.
134. Witzke, K.; Seebauer, C.; Jesse, K.; Kwiatek, E.; Berner, J.; Semmler, M.L.; Boeckmann, L.; Emmert, S.; Weltmann, K.D.; Metelmann, H.R.; et al. Plasma medical oncology: Immunological interpretation of head and neck squamous cell carcinoma. *Plasma Process. Polym.* **2020**, *17*, doi:10.1002/ppap.201900258.
135. Bekeschus, S.; Clemen, R.; Metelmann, H.R. Potentiating anti-tumor immunity with physical plasma. *Clin. Plasma Med.* **2018**, *12*, 17–22, doi:10.1016/j.cpme.2018.10.001.
136. Bekeschus, S.; Clemen, R.; Nießner, F.; Sagwal, S.K.; Freund, E.; Schmidt, A. Medical Gas Plasma Jet Technology Targets Murine Melanoma in an Immunogenic Fashion. *Adv. Sci.* **2020**, *7*, doi:10.1002/advs.201903438.
137. Chen, G.; Chen, Z.; Wen, D.; Wang, Z.; Li, H.; Zeng, Y.; Dotti, G.; Wirz, R.E.; Gu, Z. Transdermal cold atmospheric plasma-mediated immune checkpoint blockade therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2020**, *117*, 3687–3692, doi:10.1073/pnas.1917891117.
138. Clemen, R.; Heirman, P.; Lin, A.; Bogaerts, A.; Bekeschus, S. Physical plasma-treated skin cancer cells amplify tumor cytotoxicity of human natural killer (NK) cells. *Cancers (Basel)*. **2020**, *12*, 1–17, doi:10.3390/cancers12123575.
139. Mansoori, B.; Mohammadi, A.; Davudian, S.; Shirjang, S.; Baradaran, B. The different mechanisms of cancer drug resistance: A brief review. *Adv. Pharm. Bull.* **2017**, *7*, 339–348.
140. Esmatabadi, M.J.D.; Bakhshinejad, B.; Motlagh, F.M.; Babashah, S.; Sadeghizadeh, M. Therapeutic resistance and cancer recurrence mechanisms: Unfolding the story of tumour coming back. *J. Biosci.* **2016**, *41*, 497–506, doi:10.1007/s12038-016-9624-y.
141. Okon, I.S.; Zou, M.H. Mitochondrial ROS and cancer drug resistance: Implications for therapy. *Pharmacol. Res.* **2015**, *100*, 170–174.
142. Toyokuni, S. Molecular mechanisms of oxidative stress-induced carcinogenesis: From epidemiology to oxygenomics. *IUBMB Life* **2008**, *60*, 441–447.
143. Okon, I.S.; Coughlan, K.A.; Zhang, M.; Wang, Q.; Zou, M.H. Gefitinib-mediated reactive oxygen specie (ROS) instigates mitochondrial dysfunction and drug resistance in lung cancer cells. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 9101–9110, doi:10.1074/jbc.M114.631580.

144. Liu, Y.; Yang, M.; Luo, J.; Zhou, H. Radiotherapy targeting cancer stem cells “awakens” them to induce tumour relapse and metastasis in oral cancer. *Int. J. Oral Sci.* **2020**, *12*, 1–12.
145. Diehn, M.; Cho, R.W.; Lobo, N.A.; Kalisky, T.; Dorie, M.J.; Kulp, A.N.; Qian, D.; Lam, J.S.; Ailles, L.E.; Wong, M.; et al. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature* **2009**, *458*, 780–783, doi:10.1038/nature07733.
146. Dando, I.; Cordani, M.; Pozza, E.D.; Biondani, G.; Donadelli, M.; Palmieri, M. Antioxidant mechanisms and ROS-related MicroRNAs in cancer stem cells. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2015**, *2015*, doi:10.1155/2015/425708.
147. Terheyden, P.; Krackhardt, A.; Eigentler, T. The Systemic Treatment of Melanoma. *Dtsch. Arztebl. Int.* **2019**, *116*, 497–504, doi:10.3238/arztebl.2019.0497.
148. Wolchok, J.D.; Chiarion-Sileni, V.; Gonzalez, R.; Rutkowski, P.; Grob, J.-J.; Cowey, C.L.; Lao, C.D.; Wagstaff, J.; Schadendorf, D.; Ferrucci, P.F.; et al. Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *377*, 1345–1356, doi:10.1056/nejmoa1709684.
149. Chapman, P.B.; Hauschild, A.; Robert, C.; Haanen, J.B.; Ascierto, P.; Larkin, J.; Dummer, R.; Garbe, C.; Testori, A.; Maio, M.; et al. Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *364*, 2507–2516, doi:10.1056/nejmoa1103782.
150. He, Z.; Liu, K.; Manaloto, E.; Casey, A.; Cribaro, G.P.; Byrne, H.J.; Tian, F.; Barcia, C.; Conway, G.E.; Cullen, P.J.; et al. Cold Atmospheric Plasma Induces ATP-Dependent Endocytosis of Nanoparticles and Synergistic U373MG Cancer Cell Death. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–11, doi:10.1038/s41598-018-23262-0.
151. Cheng, X.; Murphy, W.; Recek, N.; Yan, D.; Cvelbar, U.; Vesel, A.; Mozetič, M.; Canady, J.; Keidar, M.; Sherman, J.H. Synergistic effect of gold nanoparticles and cold plasma on glioblastoma cancer therapy. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2014**, *47*, 335402, doi:10.1088/0022-3727/47/33/335402.
152. Kim, G.C.; Kim, G.J.; Park, S.R.; Jeon, S.M.; Seo, H.J.; Iza, F.; Lee, J.K. Air plasma coupled with antibody-conjugated nanoparticles: A new weapon against cancer. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2009**, *42*, 032005, doi:10.1088/0022-3727/42/3/032005.
153. Khatana, K.; Gupta, A. An Update on Natural Occurrence and Biological Activity of

- Benzofurans. *Acta Sci. Med. Sci.* **2020**, *4*, 114–123, doi:10.31080/asms.2020.04.0748.
154. Duan, Y. di; Jiang, Y. yan; Guo, F. xia; Chen, L. xiao; Xu, L. lu; Zhang, W.; Liu, B. The antitumor activity of naturally occurring chromones: A review. *Fitoterapia* **2019**, *135*, 114–129.
155. Xu, J.; Kjer, J.; Sendker, J.; Wray, V.; Guan, H.; Edrada, R.A.; Lin, W.; Wu, J.; Proksch, P. Chromones from the endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. isolated from the Chinese mangrove plant *Rhizophora mucronata*. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 662–665, doi:10.1021/np800748u.
156. Tanaka, N.; Kashiwada, Y.; Nakano, T.; Shibata, H.; Higuchi, T.; Sekiya, M.; Ikeshiro, Y.; Takaishi, Y. Chromone and chromanone glucosides from *Hypericum sikokumontanum* and their anti-*Helicobacter pylori* activities. *Phytochemistry* **2009**, *70*, 141–146, doi:10.1016/j.phytochem.2008.11.006.
157. An, R.B.; Jeong, G.S.; Beom, J.S.; Sohn, D.H.; Kim, Y.C. Chromone glycosides and hepatoprotective constituents of *Hypericum erectum*. *Arch. Pharm. Res.* **2009**, *32*, 1393–1397, doi:10.1007/s12272-009-2008-1.
158. Hadjeri, M.; Barbier, M.; Ronot, X.; Mariotte, A.M.; Boumendjel, A.; Boutonnat, J. Modulation of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by flavonoid derivatives and analogues. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2125–2131, doi:10.1021/jm021099i.
159. Gamal-Eldeen, A.M.; Djemgou, P.C.; Tchuendem, M.; Ngadjui, B.T.; Tane, P.; Toshifumi, H. Anti-cancer and immunostimulatory activity of chromones and other constituents from *Cassia petersiana*. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* **2007**, *62*, 331–338, doi:10.1515/znc-2007-5-622.
160. Wirtz, M.; Stoffels, I.; Dissemond, J.; Schadendorf, D.; Roesch, A. Actinic keratoses treated with cold atmospheric plasma. *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.* **2018**, *32*, e37–e39, doi:10.1111/jdv.14465.

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Versuchsspezifische Belastungsbeurteilung zur Einstufung des Gesundheitszustandes der Mäuse. 20

Tabelle 2: Blutbilder für die Auswahl der Tumorzelllinien..... 34

Tabelle 3: Diffusionsgewichtete MRT Bildgebung für die Auswahl der Tumorzelllinien..... 38

Tabelle 4: Diffusionsgewichtete MRT Bildgebung. 42

Tabelle 5: Blutbild nach der Behandlung mit KAP. 44

Tabelle 6: Blutbild von WT oder WPB A431 Tumorzellen nach KAP Behandlung. 48

Tabelle 7: Blutbild nach Behandlung mit SM837 oder in Kombination mit KAP. 50

11 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Übersicht über Exposition mit ultraviolettem (UV) Licht und Hautkrebsformen.	9
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Strukturformel von IS112 (A) und SM837 (B)...	22
Abbildung 3: Schematischer Versuchsablauf für die Behandlung mit KAP.	30
Abbildung 4: Schematischer Versuchsablauf für die Behandlung von Langzeit KAP stimulierten Zellen.	31
Abbildung 5: Schematischer Versuchsablauf für die Behandlung mit small molecules mit oder ohne Behandlung mit KAP.....	32
Abbildung 6: Repräsentative MRT, PET/CT und histologische Bilder und quantitative Bestimmung der Zellzahl, des anatomischen und metabolischen Tumorumfanges, sowie immunhistochemische Auswertung.....	36
Abbildung 7: Lumineszenzmessung reaktiver Spezies induziert durch KAP Behandlung.....	39
Abbildung 8: Bestimmung des anatomischen Tumorumfanges mittels MRT.	40
Abbildung 9: Bestimmung des anatomischen Tumorumfanges mittels MRT mit und ohne zentrale Nekrose.	41
Abbildung 10: Bestimmung des MTV mittels [¹⁸ F]FDG PET/CT.	43
Abbildung 11: Analyse der Tumorbiologie.....	45
Abbildung 12: Zytokinbestimmung nach der Behandlung mit KAP (A und B).	46
Abbildung 13: Bestimmung des anatomischen Tumorumfanges mittels MRT und Caliper....	47
Abbildung 14: Bestimmung des Tumorumfanges mit Caliper und Überleben der Mäuse.....	49
Abbildung 15: Analyse der Apoptose nach Behandlung mit SM837 oder in Kombination mit KAP.	51
Abbildung A 1: Quantitative Bewertung des Tumorumfanges mit dem Caliper (A und B).	88

12 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Thema: „*In vivo Charakterisierung der antitumorigenen Effizienz von kaltem Atmosphärendruckplasma und small molecules am Modell des menschlichen Hautkrebses*“ selbstständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen benutzt habe. Die Stellen, die anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, habe ich in jedem einzelnen Fall durch Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

Ich erkläre hiermit weiterhin, dass ich meine wissenschaftlichen Arbeiten nach den Prinzipien der guten wissenschaftlichen Praxis gemäß der gültigen „Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zur Vermeidung wissenschaftlichen Fehlverhaltens“ an der Universität Rostock angefertigt habe.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Ort, Datum

Unterschrift

13 Wissenschaftlicher Lebenslauf

Schulischer und Akademischer Werdegang

1993 bis 1997	Grundschule Werner Lindemann, Rostock
1997 bis 2000	Realschule Heinrich Schütz, Rostock
2000 bis 2003	Realschule Gelbensande
06/2013	Zugangsprüfung Universität Rostock
10/2013 bis 07/2016	Bachelor Medizinische Biotechnologie
akademischer Grad	Bachelor of Science
10/2016 bis 09/2018	Master Medizinische Biotechnologie
akademischer Grad	Master of Science
10/2018 bis 04/2022	wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universitätsmedizin Rostock mit Ziel der Promotion
Ab 05/2022	wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universitätsmedizin Rostock

Ausbildung

09/2003 bis 07/2006	med. Fachschule der Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald, Anstalt öffentlichen Rechts, Greifswald
Ausbildungsberuf:	Medizinisch-technischer Laboratoriumsassistent

Beruflicher Werdegang

09/2006 bis 01/2008	DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen gGmbH
02/2008 bis 12/2008	Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin Rostock
01/2009 bis 09/2013	Seracell Stammzelltechnologie GmbH

Teile der Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:

Kordt M, Trautmann I, Schlie C, Lindner T, Stenzel J, Schildt A, Boeckmann L, Bekeschus S, Kurth J, Krause BJ, Vollmar B, Grambow E. Multimodal Imaging Techniques to Evaluate the Anticancer Effect of Cold Atmospheric Pressure Plasma. *Cancers*. 2021; 13(10):2483. <https://doi.org/10.3390/cancers13102483>

14 Danksagung

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. Vollmar für die Vergabe meines Themas, der Unterstützung bei der Umsetzung von diesem, ihrem kompetenten Rat und die Möglichkeit meine Arbeit in ihrem Institut durchzuführen.

Herr PD Dr. med. habil. Grambow für die Betreuung und Unterstützung bei der Umsetzung meines Themas, für hilfreiche Worte und schnelle Antworten.

Mein besonderer Dank gilt Frau Christin Schlie, die immer ein offenes Ohr für mich hatte, mich immer unterstützte wo sie konnte, stets konstruktive Kritik äußerte, Vorschläge für Verbesserungen gab und immer aufmunternde Worte finden konnte, wenn Versuche doch mal nicht glückten. Die Zusammenarbeit hat jeden Tag aufs Neue Spaß gemacht.

Ich danke dem gesamten Team des Institutes für Experimentelle Chirurgie für die unglaublich tolle Zusammenarbeit und die wunderschöne, unvergessliche Zeit, die ich dort verbringen durfte. Ohne diese Unterstützung hätte ich mein Thema nicht umsetzen können. Ich danke insbesondere Anne, Joanna, Doro, Berit, Maren, Eva, Mareike, Ilona, Chantal, Petra und Karin für die unglaublich tolle Arbeit, die sie geleistet haben und für die freundliche Hilfe, die sie mir stets haben zukommen lassen.

Herrn Dr. Bekeschus und seinem Team vom INP in Greifswald, danke ich für die Einweisung und für die Bereitstellung der Geräte und Materialien für meine Arbeit, sowie für die schnellen Antworten, für die ständige Unterstützung und die sehr gute Zusammenarbeit.

Der Dermatologie danke ich für die Bereitstellung der Tumorzellen und die Unterstützung für meine Arbeit.

Ich danke weiterhin der Organischen Chemie für die Bereitstellung der small molecules für meine Arbeit.

Der Pharmakologie danke ich für die gute Zusammenarbeit bei einer Versuchsreihe.

15 Anhang

15.1 Abbildungen

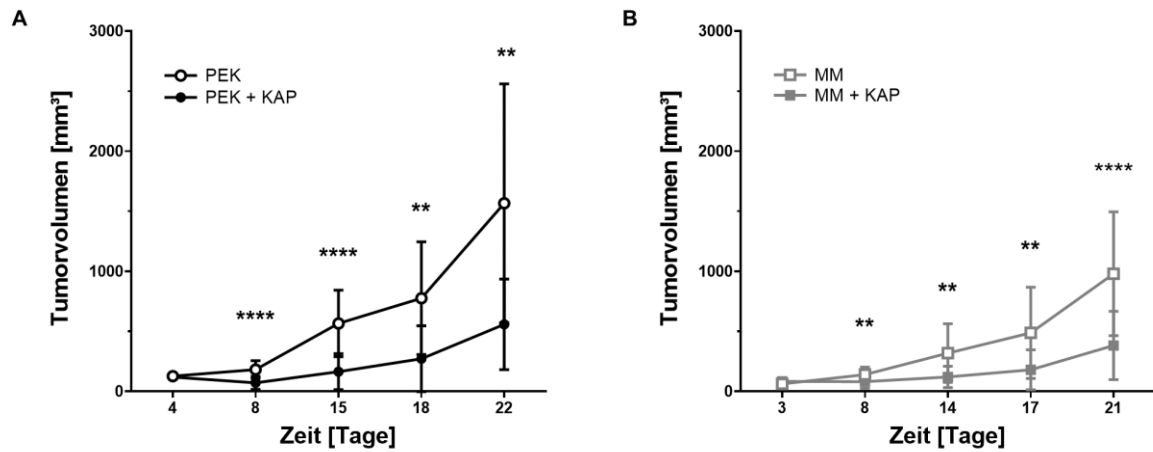


Abbildung A 1: Quantitative Bewertung des Tumorzvolumens mit dem Caliper (A und B). NSG Mäuse mit s.c. Flankentumoren, entweder PEK oder MM, wurden drei Wochen lang mit oder ohne KAP behandelt. Die KAP Behandlung begann vier Tage nach der Injektion der Tumorzellen und wurde alle vier Tage wiederholt. Die KAP Behandlung führte zu einer signifikanten Verringerung des Wachstums von PEK und MM während der dreiwöchigen Beobachtungszeit. Die leeren Symbole stehen für unbehandelte Tumoren, die gefüllten Symbole für KAP behandelte Tumoren. Die Daten sind als MW \pm SD (n=20-24 Proben pro Zeitpunkt) angegeben. Zweiweg-ANOVA gefolgt vom Bonferroni Post-hoc Test für Mehrfachvergleiche. **p \leq 0,01; ****p \leq 0,0001 im Vergleich zu unbehandeltem PEK bzw. MM.