

Aus dem

Department für Frauengesundheit Tübingen
Universitäts-Frauenklinik

**Charakterisierung dosisabhängiger Effekte auf
Proliferation, Zytotoxizität, Apoptoseinduktion und
Zellzyklusregulation einer Behandlung humaner
peritonealer Fibroblasten und Mesothelzellen mit
Plasma-aktiviertem Medium**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Holl, Myriam Johanna

2024

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Weiss

2. Berichterstatter: Professor Dr. B. Munz

3. Berichterstatter: Professor Dr. B. Aydeniz

Tag der Disputation: 25.01.2023

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Biomedicines - 02/2021

Holl M, Becker L, Keller AL, Feuerer N, Marzi J, Carvajal Berrio DA, Jakubowski P, Neis F, Pauluschke-Fröhlich J, Brucker SY, Schenke-Layland K, Krämer B, Weiss M. Laparoscopic Peritoneal Wash Cytology-Derived Primary Human Mesothelial Cells for In Vitro Cell Culture and Simulation of Human Peritoneum.

Biomedicines - 04/2022

Holl M, Rasch ML, Becker L, Keller AL, Schulze-Rhonhoff L, Ruoff F, Templin M, Keller S, Neis F, Keßler F, Andress J, Bachmann C, Krämer B, Schenke-Layland K, Brucker SY, Marzi J, Weiss M. Cell Type-Specific Anti-Adhesion Properties of Peritoneal Cell Treatment with Plasma-Activated Media (PAM).

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Peritoneale Adhäsionen	1
1.1.1 Entität und Epidemiologie.....	1
1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren.....	2
1.1.3 Das Peritoneum.....	3
1.1.4 Physiologische Wundheilung, Entstehung und Behandlung peritonealer Adhäsionen.....	4
1.2 Plasmamedizin	6
1.2.1 Nichtinvasives physikalisches Plasma und Plasma-aktiviertes Medium.....	6
1.2.2 NIPP-spezifische Wirkansätze	7
1.3 Zielsetzung	10
2 Material und Methoden	11
2.1 Material.....	11
2.1.1 Laborgeräte	11
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	12
2.1.3 Chemikalien.....	13
2.1.4 Gase.....	14
2.1.5 Kommerzielle Puffer und Lösungen	14

2.1.6 Kommerzielle Kits und Reagenzien	14
2.1.7 Zellkulturmedien und -zusätze	15
2.1.8 Softwares	16
2.2 Methoden	17
2.2.1 Isolation humaner Mesothelzellen aus Spülzytologien des Douglasraums	17
2.2.2 Isolation humaner peritonealer Fibroblasten	19
2.2.3 Kultivierung, Ernte und Passagieren von Zellen	19
2.2.4 Kryokonservierung, Rekultivierung und Zellzahlbestimmung.....	20
2.2.5 Immunfluoreszenz-Färbung	20
2.2.6 Durchflusszytometrie - Zytokeratin-Färbung	22
2.2.7 Raman Mikrospektroskopie.....	23
2.2.8 Generierung von PAM und PAM-Behandlung.....	25
2.2.9 Analyse der zellulären Konfluenz	27
2.2.10 Analyse von DNA-Doppelstrangbrüchen.....	27
2.2.11 Zellzyklusanalyse	28
2.2.12 Caspase 3/7 Assay	30
2.2.13 Annexin V Assay	31
2.2.14 Nekrose Assay	32
2.2.15 Viability Assay	33
2.2.16 Statistische Auswertung	34
3 Ergebnisse	35
3.1 Isolation peritonealer Mesothelzellen	35
3.1.1 Etablierung der Isolationsmethodik	35
3.1.2 Patientinnen-spezifische Eigenschaften.....	36
3.1.3 Biomolekulare Charakterisierung isolierter Mesothelzellen.....	38
3.1.4 Mesothelzell-identifizierende Marker.....	41

3.1.5 Bestimmung der Reinheit der isolierten Mesothelzellpopulation...	42
3.1.6 Spektroskopischer Vergleich der molekularen Strukturen von primär isolierten und in situ Mesothelzellen.....	44
3.2 PAM-Behandlung von Fibroblasten und Mesothelzellen.....	49
3.2.1 Dosisabhängige Effekte auf die Zellkonfluenz und Bestimmung des therapeutischen PAM-Dosisfensters	49
3.2.2 Dosisabhängiges Zellwachstum und morphologische Effekte im zeitlichen Verlauf	55
3.2.3 Dosisabhängige Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen	56
3.2.4 Dosisabhängiger Einfluss auf die Zellzyklusregulation	58
3.2.5 Dosisabhängige Induktion von Apoptose	63
3.2.6 Dosisabhängige Induktion von Nekrose	64
3.2.7 Dosisabhängige Reduktion der zellulären Viabilität	66
3.2.8 Effekte einer PAM-Behandlung auf Nuklei, Lipide und Proteine ...	67
4 Diskussion	75
4.1 Aktuelle Möglichkeiten Patienten/innen-spezifischer In-vitro-Modelle.....	76
4.2 PAM-Behandlung zur Prophylaxe intraperitonealer Adhäsionen	79
5 Zusammenfassung.....	89
6 Anhang	90
7 Literaturverzeichnis	99
8 Erklärung zum Eigenanteil	111
9 Veröffentlichungen.....	112

Danksagung..... 113

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Peritoneale Adhäsionen und PAM-Behandlung
- Abbildung 2: Laparoskopische Gewinnung von Spülzytologien und Isolation der Mesothelzellen
- Abbildung 3: Gating Strategie der Durchflusszytometrie von gegen Zytokeratin gefärbten Fibroblasten und Mesothelzellen
- Abbildung 4: Herstellung von PAM
- Abbildung 5: Gating-Strategie zur Zellzyklusanalyse von Fibroblasten und Mesothelzellen per Durchflusszytometrie
- Abbildung 6: Morphologie der Mesothelzellkultur nach der Isolation aus Spülzytologie
- Abbildung 7: Biomolekulare Charakterisierung peritonealer Mesothelzellen und Fibroblasten
- Abbildung 8: Mesothelzellidentifikation über Zytokeratin-, Calretinin- und WT-1-Expression
- Abbildung 9: Bestimmung der Reinheit der isolierten Mesothelzellpopulation anhand der Expression von Zytokeratin
- Abbildung 10: Molekulare Analyse primär isolierter Mesothelzellen im Vergleich zu Mesothelzellen in peritonealen Gewebeschnitten mittels Raman Mikrospektroskopie
- Abbildung 11: Dosisabhängige Zellkonfluenz nach PAM-Behandlung
- Abbildung 12: Bestimmung des therapeutischen PAM-Dosisfensters
- Abbildung 13: PAM-abhängiges Zellwachstum und morphologische Veränderungen im zeitlichen Verlauf
- Abbildung 14: Dosisabhängige Induktion von Doppelstrangbrüchen
- Abbildung 15: Dosisabhängiger absoluter Einfluss der PAM-Behandlung auf die Zellzyklusregulation
- Abbildung 16: Dosisabhängiger relativer Einfluss von PAM auf die Zellzyklusregulation
- Abbildung 17: Dosisabhängige Induktion von Apoptose nach PAM-Behandlung
-

-
- Abbildung 18: Dosisabhängige Induktion von Nekrose nach PAM-Behandlung
- Abbildung 19: Dosisabhängige Reduktion der zellulären Viabilität nach PAM-Behandlung
- Abbildung 20: Molekulare Analyse der Nuklei nach einer PAM-Behandlung mittels Raman Mikrospektroskopie
- Abbildung 21: Molekulare Analyse der Lipide nach einer PAM-Behandlung mittels Raman Mikrospektroskopie
- Abbildung 22: Molekulare Analyse der Proteine nach einer PAM-Behandlung mittels Raman Mikrospektroskopie
-

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Verwendete Geräte
Tabelle 2:	Verwendete Verbrauchsmaterialien
Tabelle 3:	Verwendete Chemikalien
Tabelle 4:	Verwendete Gase
Tabelle 5:	Verwendete Puffer und Lösungen
Tabelle 6:	Verwendete Kits und Reagenzien
Tabelle 7:	Verwendete Zellkulturmedien und -zusätze
Tabelle 8:	Verwendete Programme
Tabelle 9:	Kulturmedien und Zusätze
Tabelle 10:	IF-Antikörper
Tabelle 11:	PAM-Verdünnungen
Tabelle 12:	Charakterisierung der Patientinnen

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AF	Alexa Fluor
ANOVA	Analysis of variance (Einfaktorielle Varianzanalyse)
BSA	Bovines Serumalbumin
CMC	Carboxymethylzellulose
ctrl	Kontrolle
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMEM/F-12	Dulbecco's Modified Eagle Medium / Nährstoffmischung F-12
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
DSB	Doppelstrangbruch
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EZM	Extrazelluläre Matrix
F	Fibroblasten
FCS	Fetales Kälberserum
FI	Fluoreszenzintensität
IF	Immunfluoreszenz
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
MEM	Minimal Essential Media
MZ	Mesothelzellen
NIPP	Nichtinvasives physikalisches Plasma
ns	Nicht signifikant
P/S	Penicillin-Streptomycin
PAM	Plasma-aktiviertes Medium
PC	Principal Component (Hauptkomponente)
PCA	Principal Component Analysis (Hauptkomponenten-Analyse)
PEG	Polyethylenglykol
PEO	Polyethylenoxid
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid

RNS	Reaktive Stickstoffspezies
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
t-PA	gewebespezifischer Plasminogenaktivator
TCA	True Component Analysis
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
u-PA	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator
ZK	Zytokeratin
μm	Mikrometer

1 Einleitung

1.1 Peritoneale Adhäsionen

1.1.1 Entität und Epidemiologie

Postoperative peritoneale Adhäsionen treten bei 60 - 90 % der Patientinnen nach gynäkologischen Eingriffen auf [1, 2]. Neben vielen Errungenschaften in der modernen minimalinvasiven und offenen Chirurgie, stellen Adhäsionen immer noch eine ernste Komplikation und Limitation des postoperativen Outcomes und der Lebensqualität von Patientinnen dar. Die Ovarien präsentieren sich aufgrund ihrer anatomischen Nähe zum Peritoneum, unabhängig der Art des operativen Eingriffes, als häufigster Ort der Entstehung von Adhäsionen [2, 3]. Infertilität, in 15 - 20 % der Fälle dadurch bedingt [4], ist nur eine der zahlreichen Komplikationen, deren Risiko mit zunehmender Anzahl an Adhäsionen steigt [5].

Das Auftreten von peritonealen Adhäsionen stellt nicht nur ein Problem des gynäkologischen Fachbereichs dar. Verschiedene Studien zeigten das Auftreten von Verwachsungen mit einer Prävalenz von 67 - 93 % nach gängigen chirurgischen Routineeingriffen im Bauchraum [1, 6, 7]. Zu den häufigsten ursächlichen Operationen zählen die laparoskopische Cholezystektomie, die Appendektomie, das Reponieren von Hernien, onkologische Eingriffe und Operationen im Bereich der reproduktiven Organe im Becken [2, 3]. Aber auch offene Eingriffe an Darm und Rektum führen zu einem erhöhten Risiko der Entstehung von Adhäsionen [8, 9]. Die definitive Diagnosestellung und mögliche Therapieoptionen benötigen häufig Reoperationen, welche sich bedeutend schwieriger und zeitintensiver darstellen. Studien in den USA und Schweden schätzten die finanzielle Belastung durch hospitalisierte Patientinnen und Patienten, bedingt durch peritoneale Adhäsionen, auf 5.695 US-\$ pro Kopf in Schweden [10] und auf über eine Milliarde US-\$ jährlich für das US-amerikanische Gesundheitssystem [11, 12]. Die summierten Kosten sind aber noch deutlich höher, rechnet man die ambulante Versorgung, Behandlung von

Komplikationen (z.B. Infertilität) und den beruflichen Ausfall der Patientinnen und Patienten mit ein [13].

1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Peritoneale Adhäsionen sind Verwachsungen aus Bindegewebe, die sich zwischen verschiedenen intraperitonealen Strukturen entwickeln können. Die fibrösen Bänder bilden sich zwischen Organen, dem Omentum oder dem Peritoneum selbst aus [14-16]. Die überwiegende Zahl der Adhäsionen entsteht dabei sekundär in Folge von Manipulationen, Verletzungen oder Entzündungen im Bauchraum. Angeborene kongenitale Formen stellen eine Seltenheit dar [17]. Die zugrundeliegenden Mechanismen zur Entstehung von Verklebungen sind bis heute noch nicht vollständig bekannt. Eine fehlerhafte peritoneale Wundheilung wird als Ursache angenommen, in deren Folge sich Adhäsionen in Form von dünnen Bindegewebsschichten oder bis zu dicken strangförmigen Bändern bilden können [3]. Als Risikofaktoren werden Entzündungen wie Peritonitis, Appendizitis, aber auch chirurgische Traumata, Bestrahlungen und das Lösen bereits vorliegender Adhäsionen (Adhäsioolyse) gezählt. Assoziiert werden zudem eine grobe Manipulation, eine Hypoxie des Gewebes, die Austrocknung von serösen Oberflächen, Blutungen und die Bildung von Blutgerinnseln während chirurgischen Eingriffen [2, 3, 17]. Weiter beeinflusst wird das Risiko durch die Art des Eingriffs, die Anzahl der Voroperationen und intraoperative Komplikationen, wie beispielsweise eine Perforation von intraperitonealen Organen [14, 18]. Viele Studien wurden im gynäkologischen Fachgebiet durchgeführt, da adhäsionsbedingte Reoperationen häufig eine Konsequenz von gynäkologischen Eingriffen und Adhäsioolysen sind [18, 19].

Neben der Vielfalt an Ursachen, stellt auch die Komplexität der Symptome eine große Herausforderung dar. Ein Teil der Patientinnen und Patienten zeigt sich zunächst asymptomatisch. Entwickelt sich aber die sogenannte Adhäsionskrankheit (engl. adhesive disease), äußert sich das Krankheitsbild mit

einem breiten Spektrum an klinischen Beschwerden. Im Vordergrund stehen starke, akute und oft chronische Schmerzen im Abdomen- und Beckenbereich. Hinzukommen Funktionsstörungen des Darms, Obstipationen oder bei Patientinnen bereits genannte sekundäre Infertilität durch Verklebungen im Bereich der Tuben und Ovarien [9, 14, 18]. Hervorzuheben ist außerdem der mechanische Ileus als Krankheitsbild, welcher zu 50 - 70 % infolge von Adhäsionen entsteht und oft schwere klinische Verläufe verursacht [4]. Fehlende klassische Laborparameter und die Schwierigkeit der Darstellung mit verfügbaren bildgebenden Verfahren führen dazu, dass peritoneale Adhäsionen oft nicht erkannt werden. Häufig folgen den genannten Symptomen emotionaler Stress und Ängste der Patientinnen und Patienten, die nicht selten mit Depressionen verwechselt werden und die Lebensqualität von Millionen Menschen weltweit stark beeinflussen [1, 14, 18].

1.1.3 Das Peritoneum

Das Peritoneum ist mit einer Fläche von ca. 1,8 m² die größte seröse Membran des menschlichen Körpers [20]. Das parietale Peritoneum kleidet den gesamten Bauchraum aus, während das viszerale Peritoneum intraperitoneale Organe umhüllt und diese im Bauchraum integriert, wie in Abbildung 1 (a) schematisch dargestellt wurde. Durch die Sekretion von visköser Flüssigkeit ermöglicht das Peritoneum als Schleimhaut, die reibungslose Bewegung der intraperitonealen Organe gegen- und miteinander. Als Teil des Immunsystems stellt es einen Schutz vor Pathogenen dar, indem es Leukozyten rekrutiert. Daneben ermöglicht das Peritoneum den Abbau apoptotischer Zellen und Debris, die Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren und reguliert die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (EZM) [21-23].

Das parietale und viszerale Peritoneum ist histologisch gleich aufgebaut: Es können wie in Abbildung 1 (a) und (b) schematisch dargestellt, das Mesothelium, das submesotheliale Bindegewebe und die verbindende Basalmembran unterschieden werden. Peritoneale Mesothelzellen bilden einen Monolayer

(Mesothelium) und kleiden als innerste Schicht die Bauchhöhle aus. Sie adhären auf der Basalmembran, einer dünnen Membran aus EZM. Direkt darunter befindet sich das submesotheliale Stroma mit seinen zellulären und nicht-zellulären Komponenten. Hierzu zählen vor allem Fibroblasten, Adipozyten, Blutgefäße, Kollagene, Fibronectin und weitere Bestandteile [4, 24-26].

Kommt die physiologische Homöostase des Peritoneums aus dem Gleichgewicht, können sich verschiedene schwerwiegende Erkrankungen entwickeln. Dazu zählen beispielsweise Adhäsionen, Ödeme und die Bildung von Fibrosen [22-24, 27, 28]. Hinzukommen maligne Erkrankungen des Peritoneums, wie Mesotheliome oder Metastasen anderer Primärtumore [29]. Ein Großteil der Mechanismen, die zur Entstehung der Krankheitsbilder führen, sind noch nicht vollständig untersucht. Deshalb kommt der Forschung an primären humanen Zellen des Peritoneums eine enorme Bedeutung zu.

1.1.4 Physiologische Wundheilung, Entstehung und Behandlung peritonealer Adhäsionen

Der physiologische Heilungsverlauf von Verletzungen des Peritoneums stellt eine Besonderheit dar. Defekte heilen durch einen Prozess, bestehend aus der Metaplasie des darunterliegenden Mesenchyms, der Migration von epithelialen Zellen aus der peritonealen Flüssigkeit und der Proliferation von Mesothelzellen am Wundrand. Peritoneale Wunden benötigen unabhängig der Größe des Defekts, annähernd acht Tage um zu heilen [30].

Innerhalb der ersten drei Tagen nach Verletzung besteht vermutlich kein Unterschied zwischen physiologischer Wundheilung und der Entstehung von peritonealen Adhäsionen. Es kommt zur Rekrutierung, Aktivierung und Proliferation von hämatopoetischen Zellen und Bindegewebszellen, vor allem von Fibroblasten und Mesothelzellen. Lokal werden zunächst verschiedene Entzündungsmediatoren wie Zytokine (z.B. IL-1, IL-6, TNF- α) freigesetzt. Es folgt eine erhöhte vaskuläre Permeabilität, die das Einwandern von Leukozyten, wie Makrophagen erleichtert [31]. Über die Aktivierung der Gerinnungskaskade wird

Thrombin aktiviert, welches Fibrinogen zu Fibrin zu spaltet. Das gebildete fibröse Material bedeckt den Defekt und nähert die Wundränder an [32]. Makrophagen, Fibroblasten und Mesothelzellen migrieren währenddessen in das fibröse Exsudat. Mesothelzellen wandern an die verletzte Oberfläche, bilden Inseln, proliferieren und bedecken den Defekt. Sie tragen zu einem Großteil des primären Wundverschlusses bei [7, 32, 33]. Fibroblasten produzieren physiologischerweise Kollagene, Fibronectin, Glykosaminoglykane und Proteoglykane, die den überwiegenden Teil der EZM darstellen und den wesentlichen Teil der Wundheilung gestalten [24, 34].

Die Vorgänge, die zur Entstehung von peritonealen Adhäsionen führen sind noch nicht vollständig erforscht. Freigesetzte Substanzen wie Plasminogen-Aktivatoren, Zytokine, Wachstumsfaktoren und Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren modulieren den Prozess der peritonealen Heilung [30, 35, 36]. Es ist anzunehmen, dass das Peritoneum nach den ersten Tagen der Wundheilung die Entstehung von Adhäsionen durch ein hohes Maß an Fibrinolyse verhindert. Dies geschieht beispielsweise durch die Aktivierung von Plasmin (t-PA, u-PA), welches übermäßiges Fibrin abbaut und die Organisation und Bildung von Adhäsionen hemmt [3, 32, 37, 38]. Entzündungsmediatoren führen zudem zu einer verstärkten Aktivierung und Proliferation von Fibroblasten und einer zunehmenden Sekretion von pro-adhäsiven Faktoren wie Kollagenen und Fibronectin. Die Ablagerung dieser führt anschließend zur Bildung von fibrösen Adhäsionen [39, 40], wie in Abbildung 1 (b) und (c) dargestellt wurde. Somit stellen peritoneale Fibroblasten einen wesentlichen Angriffspunkt einer Adhäsionsprophylaxe dar, um deren Proliferation und Synthese, sowie Sekretion von pro-adhäsiven Faktoren zu reduzieren.

Um die primäre Bildung oder erneute Entstehung von postoperativen peritonealen Adhäsionen zu verhindern, wurden bereits diverse Strategiemöglichkeiten entwickelt und häufig aufgrund des Fehlens eines klaren Nutzen wieder verworfen. Der Fokus dabei lag vor allem auf der Prävention von Adhäsionen, wobei aktuell verschiedene Präventionsstrategien diskutiert werden. Hierzu zählen die Verbesserung chirurgischer Techniken, die Anwendung von medikamentösen Therapien und die Verwendung flüssiger oder

fester Barrierematerialien [17, 36]. Bisher entwickelte Therapieoptionen sind oft schwer durchzuführen, teuer in der Anwendung oder mit ernststen Nebenwirkungen oder Komplikationen verbunden [41]. Es gibt einen dringenden Bedarf an einer effektiven Technologie zur Prophylaxe von Adhäsionen, welche unkompliziert in chirurgische Prozeduren integriert werden kann, sich nebenwirkungsarm präsentiert und sowohl in der minimalinvasiven als auch in der offenen Chirurgie Anwendung finden kann.

1.2 Plasmamedizin

1.2.1 Nichtinvasives physikalisches Plasma und Plasma-aktiviertes Medium

Die Applikation von Plasma hat im medizinischen Bereich in den letzten Jahren viel Aufmerksamkeit gewonnen und gehört aktuell zu den aufstrebenden medizinischen Disziplinen. Nichtinvasives physikalisches Plasma (NIPP) beschreibt ein teilweise oder vollständig ionisiertes Gas, welches aus Ionen, freien Elektronen, geladenen und ungeladenen Teilchen, Radikalen, Photonen und elektromagnetischer Strahlung besteht [42]. Vor allem die Wirkung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RONS) stehen hierbei im Vordergrund [43]. Häufig wird physikalisches Plasma als vierter Aggregatzustand klassifiziert [44]. NIPP besteht aus einem Trägergas (z.B. Argon), welches mithilfe eines elektrischen Feldes durch Energiezufuhr angeregt wird. Dadurch entstehen verschiedene biologisch reaktive Spezies, die sowohl physikalische und chemische, als auch biologische Reaktionen auf zellulärer Ebene induzieren können [42, 45-48]. Hervorzuheben ist hier, dass NIPP nur Temperaturen zwischen 25 und 45 °C aufweist [49].

Die Behandlung von Flüssigkeiten mit NIPP führt zu Plasma-aktiviertem Medium (PAM), welches als Träger der plasmaspezifischen Wirkkomponenten fungiert. Es behält den Großteil der biologischen Effekte von NIPP bei [50-52] und besteht unter anderem aus langlebigen reaktiven Spezies wie Nitrit (NO_2^-), Nitrat (NO_3^-) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) [51]. Eine Anwendung von PAM bietet im Vergleich zur NIPP-Behandlung viele Vorteile. Das aktivierte Medium kann im

gekühlten Zustand bis zu 7 Tage ohne Wirkungsverlust gelagert werden [53, 54] und könnte flexibel in Situationen angewendet werden, in denen eine NIPP-Behandlung nicht möglich ist (z.B. bei laparoskopischen Eingriffen). Unter physiologischen Bedingungen sind Schleimhäute, wie das Peritoneum, mit Flüssigkeit benetzt. Bei einer direkten Behandlung mit NIPP, besteht die Gefahr einer Austrocknung der Schleimhaut. Eine Behandlung mit PAM dagegen, erhält die physiologischen Bedingungen weitestgehend aufrecht [54]. Daneben ermöglicht PAM eine homogene und simultane Behandlung einer Oberfläche, auch bei laparoskopischen Eingriffen, was einen großen Vorteil für eine mögliche intraoperative Anwendung darstellt.

1.2.2 NIPP-spezifische Wirkansätze

Die Effekte und therapeutische Wirkung einer NIPP-Behandlung auf verschiedene Zellen und Gewebe wurde in diversen Studien der letzten Jahre untersucht und kommt aktuell bereits in einigen medizinischen Bereichen zum Einsatz. Die antibakterielle Wirkung von NIPP wird beispielsweise in der Dermatologie genutzt, um die Wundheilung zu fördern. Außerdem wurde eine moderate Aktivierung von akuten Entzündungsreaktionen und primären Wundheilungskaskaden beobachtet, wodurch sich NIPP zur Behandlung von chronischen und infizierten Wunden eignet [55-60]. Daneben findet die NIPP-Behandlung auch Anwendung in der Therapie von Psoriasis [45] und Melanomen [61]. In der onkologischen Therapie gibt es vielversprechende Ansätze in der Anwendung einer NIPP- oder PAM-Behandlung. Verschiedene Studien zeigten NIPP-abhängige antiproliferative Effekte auf unterschiedliche Arten von Tumorzelllinien [62, 63]. Vor allem im gynäkologischen Bereich konnte ein apoptotischer Effekt der NIPP-Behandlung in vitro auf Mammakarzinome [64], Ovarialkarzinome [65] und Zervixkarzinome [47] gezeigt werden. Auch eine PAM-Anwendung bewirkte dosisabhängige antiproliferative und apoptotische Effekte auf Tumorzellen und Bindegewebszellen [46], sowie eine Abnahme der zellulären Viabilität dieser [54, 63].

Die genaue Wirkung von NIPP und PAM auf zellulärer Ebene ist noch nicht abschließend geklärt und aktuell Gegenstand der Forschung [62]. Vermutet wird der Einfluss von reaktiven Sauerstoff- (ROS) und Stickstoffspezies (RNS) auf zelluläre biochemische Prozesse und das Immunsystem [66, 67]. Durch den Einfluss von ROS und RNS werden diverse zelluläre Prozesse und Signalkaskaden aktiviert, sowie antiproliferative Effekte und Apoptose induziert [46]. Mutagene Effekte konnten aktuell durch verschiedene Experimente ausgeschlossen werden. Bisher traten auch keine anderen Nebenwirkungen auf [68-70]. Eine selektive Wirkung der NIPP-Behandlung konnte sowohl auf unterschiedliche Zellentitäten, als auch zwischen entarteten und gesunden Zellen in verschiedenen Studien gezeigt werden [68]. Beispielsweise wurde bei Tumorzellen eine schwächere Ausstattung mit antioxidativen Abwehrmechanismen gezeigt [71].

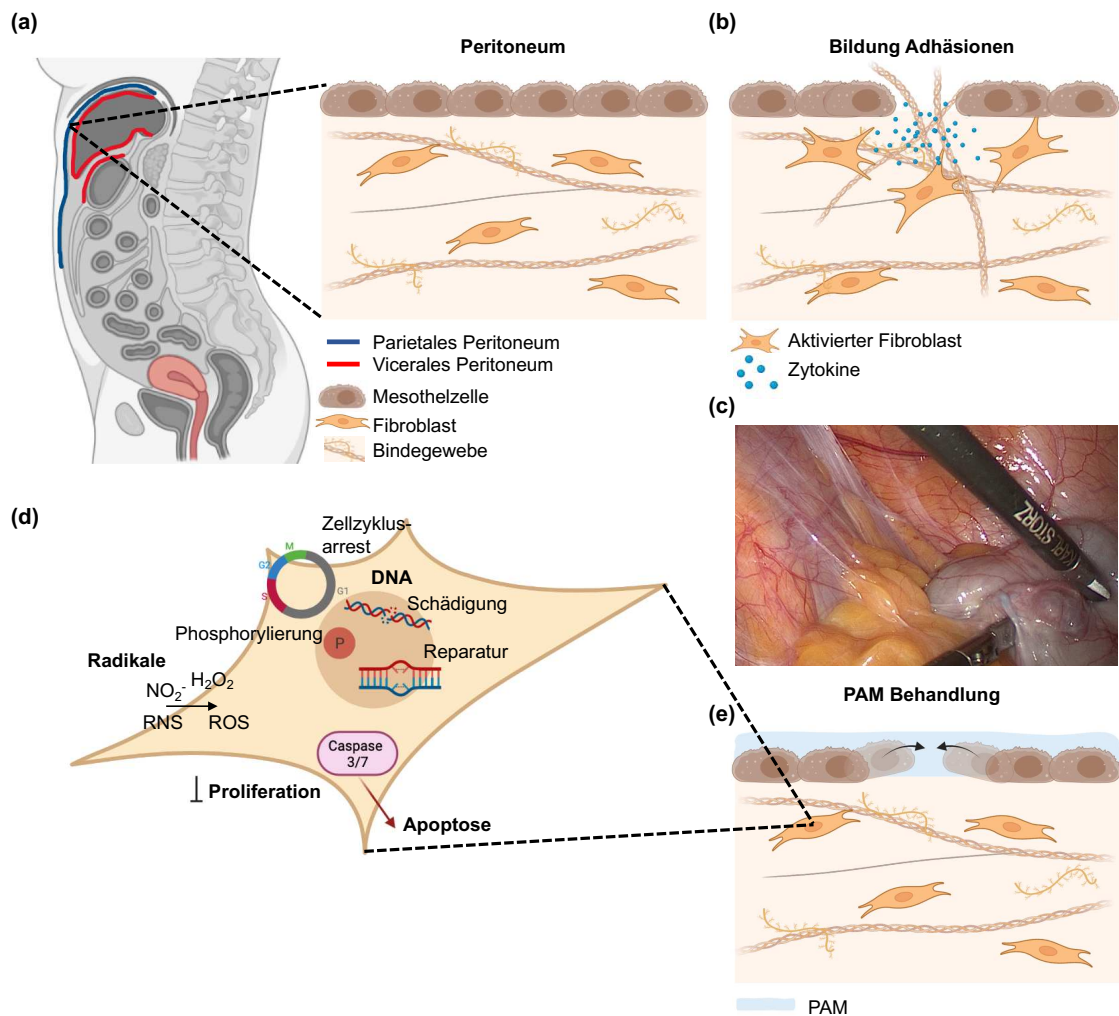


Abbildung 1: Peritoneale Adhäsionen und PAM-Behandlung. (a) Topografie und schematischer Aufbau des humanen parietalen und viszeralen Peritoneums. (b) Schematischer Prozess der Entstehung von Adhäsionen. (c) Intraoperative Sicht auf peritoneale Adhäsionen, mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Martin Weiss. (d) Einfluss einer Behandlung mit Plasma-aktiviertem Medium (PAM) auf zelluläre Prozesse. (e) Schematische Darstellung der Wirkung einer PAM-Behandlung auf das Peritoneum. Teilabbildungen (a), (b), (d) und (e) wurden mit Biorender.com erstellt.

1.3 Zielsetzung

Das Auftreten von postoperativen Adhäsionen stellt mit einem Risiko von 90 bis zu 96 % [4] eine der häufigsten OP-Komplikationen dar. Da bisherige Therapie- und Präventionsstrategien nur wenig erfolgreich waren [36, 72], könnte die PAM-Behandlung mit einer möglicherweise selektiven und antiproliferativen Wirkung, in Kombination mit der Einfachheit der Anwendung, ein komplett neues Spektrum an Therapieansätzen ermöglichen. Dabei sollen peritoneale Fibroblasten in ihrer übermäßigen und pro-adhäsiven Aktivität gehemmt werden, während peritoneale Mesothelzellen möglichst unbeeinflusst den Wundverschluss vollziehen können. Der Einfluss von PAM auf humane peritoneale Fibroblasten und Mesothelzellen wurde in der vorliegenden Arbeit, in Bezug auf eine potenzielle Anwendung zur Prävention von postoperativen Adhäsionen erstmalig untersucht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zunächst, eine neue Methodik zur Isolation und Kultivierung peritonealer Mesothelzellen zu entwickeln und zu etablieren. Darauf basierend sollten die verschiedenen Einflüsse und Effekte von PAM auf primär isolierte peritoneale Fibroblasten und Mesothelzellen untersucht werden. Im Fokus standen hierbei folgende Fragestellungen:

- Wie kann eine reine Population an peritonealen Mesothelzellen aus intraoperativen Spülzytologien isoliert und über mehrere Passagen erfolgreich kultiviert werden?
- Bestehen signifikante Unterschiede zwischen den Effekten der PAM-Behandlung auf Fibroblasten und Mesothelzellen?
- Welche PAM-Konzentration stellt ein mögliches therapeutisches Fenster zur selektiven Proliferationsinhibition von Fibroblasten dar?
- Welchen Einfluss hat die PAM-Behandlung auf Proliferation, Zellzyklus, DNA-Integrität, apoptotische und zytotoxische Prozesse in Fibroblasten und Mesothelzellen?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte.

Gerät	Typ	Hersteller
Automated cell counter	NucleoCounter (NC-200)	Chemometec, Allerød (Denmark)
Durchflusszytometer	BD LSRFortessa™	BD Bioscience, Heidelberg (Germany)
Fluoreszenzmikroskop	Cell Observer	Carl Zeiss AG, Oberkochen (Germany)
Lichtmikroskop	EVOS XL Core Cell Imaging System	ThermoFisher, Bothell (USA)
Live-Cell Analysis System	Incucyte - S3 Live-Cell Analysis System	Essenbioscience, Göttingen (Germany)
Microplate Reader	Spark	Tecan Trading AG (Switzerland)
Pipettensatz	Eppendorf Research - Plus (0,1 - 1.000 µl)	Eppendorf, Hamburg (Germany)
Pipettierhelfer	PIPETBOY acu 2	INTEGRA Biosciences, Biebertal (Germany)
Plasma Jet	Plasma Jet kINPen® MED	neoplas tools, Greifswald (Germany)
Zentrifuge	Centrifuge 5424 R	Eppendorf, Hamburg (Germany)
Zentrifuge	Megafuge 8 Kleine Tischzentrifuge	ThermoFisher, Schwerte (Germany)
Raman-Mikrospektroskop	WITec alpha300R Raman system	WITec GmbH, Ulm (Germany)

63 x Objektiv	63 x Wasserimmersion-Objektiv	(N.A. 1.4; Olympus, Tokyo, Japan)
---------------	-------------------------------	-----------------------------------

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Material	Produkt-Nr.	Hersteller
5 mL BD Falcon Tube	352003	BD Bioscience
96-Well schwarze Mikrotiterplatte (Polystyrol)	CLS3603	Corning
Costar 6-well	3516	Corning
Costar 96-Well	3988	Corning
Einwegpipetten 1 mL	4485	Corning
Einwegpipetten 10 mL	4488	Corning
Einwegpipetten 10 µL	765271	Greiner bio-one
Einwegpipetten 100 mL	4491	Corning
Einwegpipetten 100 µL	686270	Greiner bio-one
Einwegpipetten 200 µL	685270	Greiner bio-one
Einwegpipetten 25 mL	4489	Corning
Einwegpipetten 5 mL	4487	Corning
Eppendorf Tube 1,5 mL	0030125150	Eppendorf
Kryoröhrchen 2,0 mL	4-6104	NeoLab
Via2-Cassette	941-0024	Chemometec
Zellkulturflasche T25	690160	Greiner bio-one
Zellkulturflasche T75	658170	Greiner bio-one
Zentrifugenröhrchen 15 mL	188261	Greiner bio-one
Zentrifugenröhrchen 50 mL	227261	Greiner bio-one

μ-Dish 35 mm, high (Glass Bottom)	81158	Ibidi
μ-Dish 35 mm, low (Polymer Bottom)	80136	Ibidi

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien.

Stoff	Reinheit	CAS-Nr.	Produkt-Nr.	Hersteller
Bovines Serumalbumin	≥ 98,0 %	9048-46-8	8076	ROTH
Carboplatin	99,91 %	41575-94-4	S1215	Selleckchem
Dimethyl Sulfoxide	≥ 99,9 %	67-68-5	D4540	Sigma- Aldrich
EDTA	≥ 99,0 %	6381-92-6	8043.1	ROTH
Ethanol	≥ 96,0 %	64-17-5	P075.4	ROTH
Humanes Serumalbumin	≥ 99,0 %	70024-90-7	21001P	H2B
Natriumazid (NaN ₃)	≥ 98,0 %	26628-22-8	4221.1	ROTH
Paraformaldehyd	95,0 %	30525-89-4	158127	Sigma- Aldrich
Staurosporin	99,61 %	62996-74-1	S1421	Selleckchem
Triton X-100	≥ 99,0 %	9002-93-1	3051.4	ROTH

2.1.4 Gase

Tabelle 4: Verwendete Gase.

Gas	Reinheit	CAS-Nr.	Produkt-Nr.	Hersteller
Argon	≥ 99,996	7440-37-1	10100321	Linde GmbH, Pullach (Germany)

2.1.5 Kommerzielle Puffer und Lösungen

Tabelle 5: Verwendete Puffer und Lösungen.

Produkt	Produkt-Nr.	Hersteller
Cytofix /-perm	554714	BD Bioscience
DPBS	14190144	Gibco™
Perm/ Wash	554723	BD Bioscience

2.1.6 Kommerzielle Kits und Reagenzien

Tabelle 6: Verwendete Kits und Reagenzien.

Produkt	Produkt-Nr.	Hersteller
AlexaFluor 488 - anti-mouse IgG1	A-21121	Invitrogen
AlexaFluor 488 - anti-mouse IgG2b	A-21141	Invitrogen
AlexaFluor 647 - anti-rabbit IgG	A-21235	Invitrogen
Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay	JA1011	Promega

Anti-Phosphohiston H2A.X (Ser139) - Antikörper	16-202A	Sigma-Aldrich
Calretinin	sc-365956	Santa Cruz
Caspase 3/7 (Red)	4704	Essen Bioscience
Cytokeratin - broad spectrum	MSK019	Zytomed
Cytokeratin Antibody (FITC, clone REA831)	130-112-931	miltenyibiotec
Fibronectin	ab2413	Abcam
Cytotoxicity Assay	G8731	Promega
Hoechst 33342 - Ready Flow	R37165	Invitrogen
MT Cell Viability Assay	G9711	Promega
Propidium Iodide	P1304MP	Invitrogen
RNase A	19101	Qiagen
Wilms' tumor protein	sc-192	Santa Cruz

2.1.7 Zellkulturmedien und -zusätze

Tabelle 7: Verwendete Zellkulturmedien und -zusätze.

Produkt	Produkt-Nr.	Hersteller
DMEM + GlutaMAX™	31966021	Gibco™
DMEM/F-12 + GlutaMAX™	21331020	Gibco™
Fetal Bovine Serum	10270-106	Gibco™
Gelatin from bovine skin (Typ B powder)	G9391-100G	Sigma-Aldrich
L-Glutamin	25030-024	Gibco™
MEM	31095029	Gibco™
Penicillin, Streptomycin	15140-122	Gibco™

Trypsin-EDTA (0,05 %), 25300-054 phenol-red	Gibco™
--	--------

2.1.8 Softwares

Tabelle 8: Verwendete Programme.

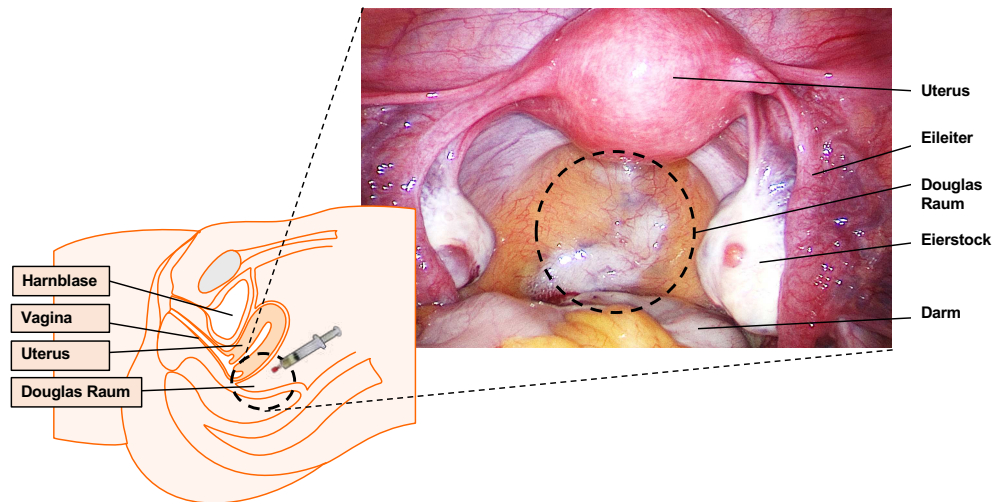
Produkt	Hersteller
BD FACSDiva, Version 8.0.3	Becton Dickinson, Franklin Lakes (USA)
Control FIVE version 5.0 (Messprogramm)	WITec GmbH, Ulm (Germany)
EndNote, Version X9.3.3	Clarivate Analytics, Philadelphia (USA)
FlowJo, Version v10	Becton Dickinson, Franklin Lakes (USA)
GraphPad Prism, Version 9	GraphPad Software, La Jolla (USA)
Incucyte® Base Software	essenbioscience
MatLab R2018a	The MathWorks, Stuttgart (Germany)
Microsoft PowerPoint Version 16.3	Microsoft, Redmond (USA)
Microsoft Word Version 16.3	Microsoft, Redmond (USA)
NucleoView™ NC-200 Software	Chemometec, Allerød (Denmark)
Project FIVE, Version 5.2 (Analyseprogramm)	WITec GmbH, Ulm (Germany)
TheUnscrambler X10.5	Camo Software AS, Oslo (Norway)
ZEN 2021 (blue edition)	Carl Zeiss, Jena

2.2 Methoden

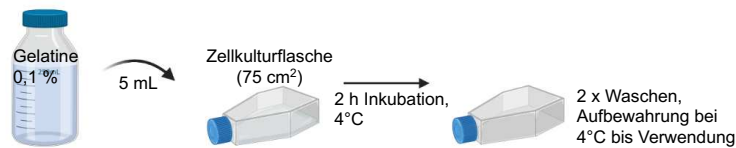
2.2.1 Isolation humaner Mesothelzellen aus Spülzytologien des Douglasraums

Es wurde ein neues Verfahren zur Isolation humaner peritonealer Mesothelzellen entwickelt. Die neu etablierte Methodik kennzeichnet sich durch die Gewinnung von peritonealen Spülzytologien des Douglasraums, aus welchen anschließend Mesothelzellen isoliert wurden. Die verwendeten Spülzytologien wurden von Patientinnen nach deren schriftlicher Einwilligung im Rahmen anderweitig indizierter operativer Eingriffe im Zeitraum von März bis Dezember 2020 am Department für Frauengesundheit (Universitäts-Frauenklinik) in Tübingen gewonnen. Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät an der Eberhard Karls Universität Tübingen genehmigte die Verwendung der humanen Proben am 19.10.2018 (495/2018BO2). Um Verunreinigungen zu vermeiden, wurden die Spülzytologien des Douglasraums direkt nach intra-abdominalem Zugang, wie in Abbildung 2 (a) dargestellt, gewonnen. Hierfür wurde der Douglasraum für 30 s mehrmals mit 10 - 20 mL steriler, isotonischer 0,9%iger NaCl-Lösung gespült. Anschließend wurde die Flüssigkeit mit einer Spritze entnommen und bis zur Verarbeitung der Probe bei 4°C gelagert. Bereits im Vorfeld wurde eine T75 Zellkulturflasche mit Gelatine beschichtet, wie in Abbildung 2 (b) dargestellt. Die Probe wurde zunächst in ein steriles 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurde die Probe bei 300 x g für 5 min bei RT zentrifugiert, wie in Abbildung 2 (c) schematisch dargestellt wurde. Der Überstand (inklusive kontaminierenden Zellen und Zellschrott) wurde vorsichtig entfernt und das Pellet gewaschen. Nach weiterem Zentrifugieren bei 300 x g für 5 min, wurde der Überstand erneut vorsichtig entfernt und die Zellen in 4 - 5 mL vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert. 100 µl der Zellsuspension wurden verwendet, um die Zellzahl mithilfe eines automatisierten Zellzählers zu bestimmen. In die Zellkulturflasche wurden 7 - 8 mL Kulturmedium vorgelegt und die komplette Zellsuspension hinzugefügt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ für mindesten 2 Tage kultiviert. Nach 2 - 3 Tagen wurden die Zellen vorsichtig gewaschen und anschließend mit 12 mL frischem Kulturmedium weiter kultiviert. Anschließend wurde alle 2 - 3 Tage das Kulturmedium gewechselt.

(a)



(b)



(c)

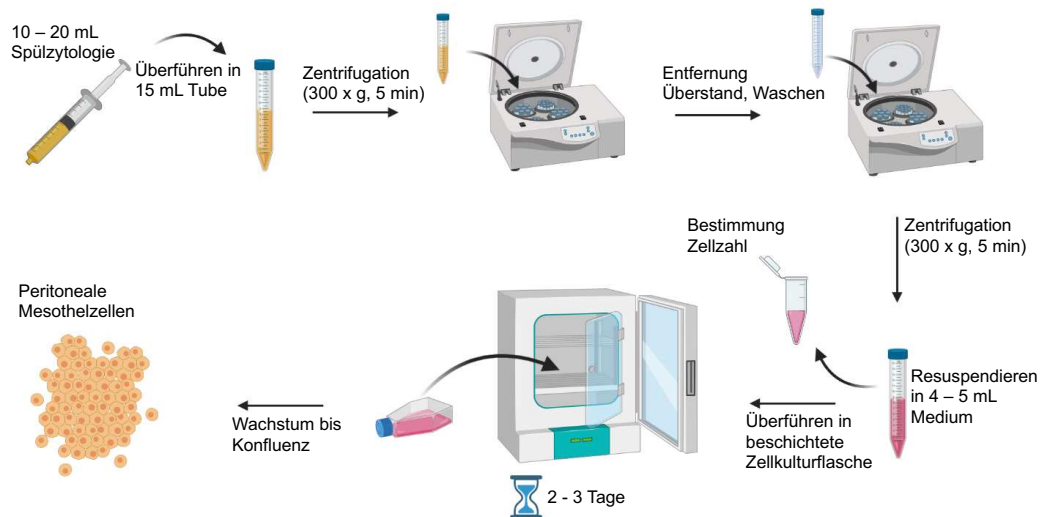


Abbildung 2: Laparoskopische Gewinnung von Spülzytologien und Isolation der Mesothelzellen. Um die peritonealen Spülzytologien zu gewinnen, wurde der Douglasraum mehrmals mit isotonischer 0,9%iger NaCl-Lösung gespült. Dargestellt wurde der Ablauf bis zum Erreichen eines konfluenten Zellrasens. (a) Schematische Übersicht der Anatomie des weiblichen Beckens (links). Laparoskopische Sicht auf den Douglasraum (rechts), mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Martin Weiss. (b) Die zur Isolation benötigte Zellkulturflasche wurde mit Gelatine beschichtet. (c) Die Proben wurden mehrmals zentrifugiert, gewaschen und anschließend bis zum Erreichen eines konfluenten Zellrasens kultiviert. Teilabbildung (a) wurde nach Holl et al. (2021) [73] modifiziert. Abbildungen (b) und (c) wurden mit biorender.com erstellt.

2.2.2 Isolation humaner peritonealer Fibroblasten

Die verwendeten Fibroblasten wurden aus peritonealen Gewebeproben isoliert, welche nach dem schriftlichen Einverständnis der Patientinnen während geplanten Kaiserschnitten entnommen wurden. Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät an der Eberhard Karls Universität Tübingen genehmigte die Verwendung des humanen Gewebes am 12.01.2018 (649-2017BO2). Nach Entnahme der peritonealen Proben wurden diese gründlich in DPBS gewaschen. Anschließend wurden Fettgewebe und Blutgefäße entfernt und die peritonealen Fibroblasten nach Takashima et al. [74] isoliert. Hierfür wurden die Proben zerkleinert, in 6-Well Platten ausgelegt und in entsprechendem Kulturmedium (siehe 2.2.3) inkubiert. Nach 7 Tagen wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA (0,05 %) abgelöst und in eine Zellkulturflasche mit 75 cm² Wachstumsfläche überführt.

2.2.3 Kultivierung, Ernte und Passagieren von Zellen

Primär isolierte Fibroblasten und Mesothelzellen, die Kontrollzelllinien BJ (Primäre humane Fibroblasten, ATCC, CRL-2522) und HaCat (Primäre humane Keratinozyten, CLS, 300493) wurden im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Alle 2 Tage wurde das jeweilige Kulturmedium, wie in Tabelle 9 dargestellt gewechselt. Hierfür wurden 12 mL des jeweiligen Mediums für Zellkulturflaschen mit 75 cm² Wachstumsfläche und 4 mL für Zellkulturflaschen mit 25 cm² Wachstumsfläche verwendet. Die Konfluenz und Morphologie der Zellpopulationen wurden täglich lichtmikroskopisch beurteilt. Nach Erreichen einer 90%igen Konfluenz wurden die Zellen passagiert, eingefroren oder für Versuche verwendet. Zum Passagieren wurde das Kulturmedium abgezogen, die Zellen vorsichtig mit DPBS gewaschen, anschließend 4 mL vorgewärmtes Trypsin/EDTA (0,05 %) hinzugefügt und im Brutschrank bei 37 °C inkubiert, bis sich die Zellen ablösten. Durch Zugabe von 5 mL Kulturmedium mit den entsprechenden Zusätzen, wurde das Trypsin

inhibiert. Die Zellsuspension wurde bei 300 x g für 3 min zentrifugiert und nach dem Resuspendieren zur Weiterführung der Kultur in neue Kulturflaschen überführt. Für Versuche wurden Fibroblasten der Passagen 1 - 5 und Mesothelzellen der Passagen 1 - 4 verwendet.

Tabelle 9: Kulturmedien und Zusätze.

Zelllinie	Medium	Zusätze (v/v)
BJ	DMEM	10 % FCS, 1 % P/S, 1 % L-Glutamin
F	MEM	10 % FCS, 1 % P/S, 1 % L-Glutamin
HaCat	DMEM	10 % FCS, 1 % P/S, 1 % L-Glutamin
MZ	DMEM/F-12	10 % FCS, 1 % P/S, 1 % L-Glutamin

2.2.4 Kryokonservierung, Rekultivierung und Zellzahlbestimmung

Zur vorübergehenden Konservierung der Zellen wurden diese trypsiniert, zentrifugiert und in 1,1 mL Kulturmedium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt. 1 mL der Zellsuspension, sowie 200 µl FCS und 100 µl DMSO wurden in ein Kryoröhrchen pipettiert, bevor das Röhrchen in einer Styroporbox bei - 80 °C platziert wurde.

Die Zellen wurden zur Zellzahlbestimmung trypsiniert und zentrifugiert. Nach dem Resuspendieren in 4 mL Kulturmedium, wurden 80 µl der Zellsuspension in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde nach Anleitung des Herstellers, mithilfe einer Kassette im automatisierten Zellzähler analysiert. Die Proben wurden automatisiert angefärbt und gemessen. Bestimmt wurden die totale Zellzahl (cells / mL), Viabilität der Zellen (%) und deren Durchmesser (µm).

2.2.5 Immunfluoreszenz-Färbung

Isolierte Mesothelzellen (Passage 1 - 4) und isolierte Fibroblasten (Passage 2 - 5) wurden für Immunfluoreszenz (IF)-Färbungen verwendet. Es wurden jeweils

drei unabhängige Experimente mit Zellen drei verschiedener Patientinnen durchgeführt (n = 3). 5×10^4 Fibroblasten wurden nach Anweisung des Herstellers auf ein μ -dish ausgesät. 1×10^5 Mesothelzellen wurden auf ein zuvor mit Gelatine beschichtetes μ -dish ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen gewaschen, mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) für 10 min bei 37 °C fixiert und nach erneutem Waschen mit 0,1 % Triton-X 100 für 15 min bei Raumtemperatur (RT) permeabilisiert. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern wurden die Zellen mit 2 % Bovinem Serumalbumin (BSA) für 60 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit den jeweiligen primären Antikörpern, wie in Tabelle 10 beschrieben, in 0,1 % BSA bei 4 °C über Nacht inkubiert.

Tabelle 10: IF-Antikörper.

Primärer Antikörper	Quelle IgG	Verdünnung	Anwendung
Cytokeratin - broad spectrum	Maus (IgG1)	1:100	IF
Fibronectin	Hase	1:100	IF
Calretinin	Maus (IgG2b)	1:100	IF
Wilms´ tumor protein	Hase	1:100	IF

Am darauffolgenden Tag wurden die Proben gewaschen und mit dem entsprechenden sekundären Antikörper (AF488 und AF647, 1:1000 verdünnt in 0,1 % BSA) für 45 min bei RT inkubiert. Die Proben wurden im Anschluss mit dem Kernfärbemittel Hoechst 33342 für 20 min bei RT, entsprechend der Anweisung des Herstellers gefärbt. Die Zellen wurden vollständig mit DPBS bedeckt und mit einem Fluoreszenzmikroskop in 20-facher und 63-facher Vergrößerung analysiert.

2.2.6 Durchflusszytometrie - Zytokeratin-Färbung

Fibroblasten (Passage 4 - 6), Mesothelzellen (Passage 1 - 2), sowie Zellen der BJ- und HaCat-Zelllinien wurden in drei unabhängigen Experimenten analysiert. Die Zellen wurden abgelöst und zentrifugiert. Jeweils 5×10^5 Zellen wurden in 1 mL Waschpuffer (2 % hitzeinaktiviertes FCS, 0,05 mM EDTA und 0,05 % NaN_3 in DPBS, pH = 7,4) resuspendiert und bei $300 \times g$ für 5 min zentrifugiert. Die Proben wurden für 20 min bei RT mit 10 % humanem Serum (verdünnt in Waschpuffer) inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation ($300 \times g$, 5 min, 4°C) wurde jedes Zellpellet in 250 μl Cytotfix/ -perm (Fixierungs- und Permeabilisierungslösung) resuspendiert und für 20 min auf Eis, im Dunkeln inkubiert. Daraufhin wurden die Proben zweimal mittels des Perm/Wash-Puffers (Permeabilisierungs- und Waschpuffer) gewaschen. Der entsprechende Zytokeratin-Antikörper wurde 1 : 50 mit 10 % Perm/Wash und 10 % humanem Serum (in H_2O) verdünnt und die Proben mit jeweils 100 μl für 30 min, auf Eis und im Dunkeln inkubiert. Abschließend wurden die Zellen in 100 μl Waschpuffer resuspendiert und mit dem Durchflusszytometer analysiert.

Die gemessenen Daten wurde mithilfe der FlowJo Software ausgewertet. Hierfür wurden die Zellen zunächst im Forward- versus Side-scatter (FSC-H und SSC-H) Plot gated, um tote Zellen und Zellschrott auszuschließen. Anschließend wurden mithilfe des Forward-scatter-area versus -height (FSC-A und FSC-H) Plots die Analyse von einzelnen Zellen gewährleistet. In Abbildung 3 (a) bis (f) wurde die Gating-Strategie dargestellt.

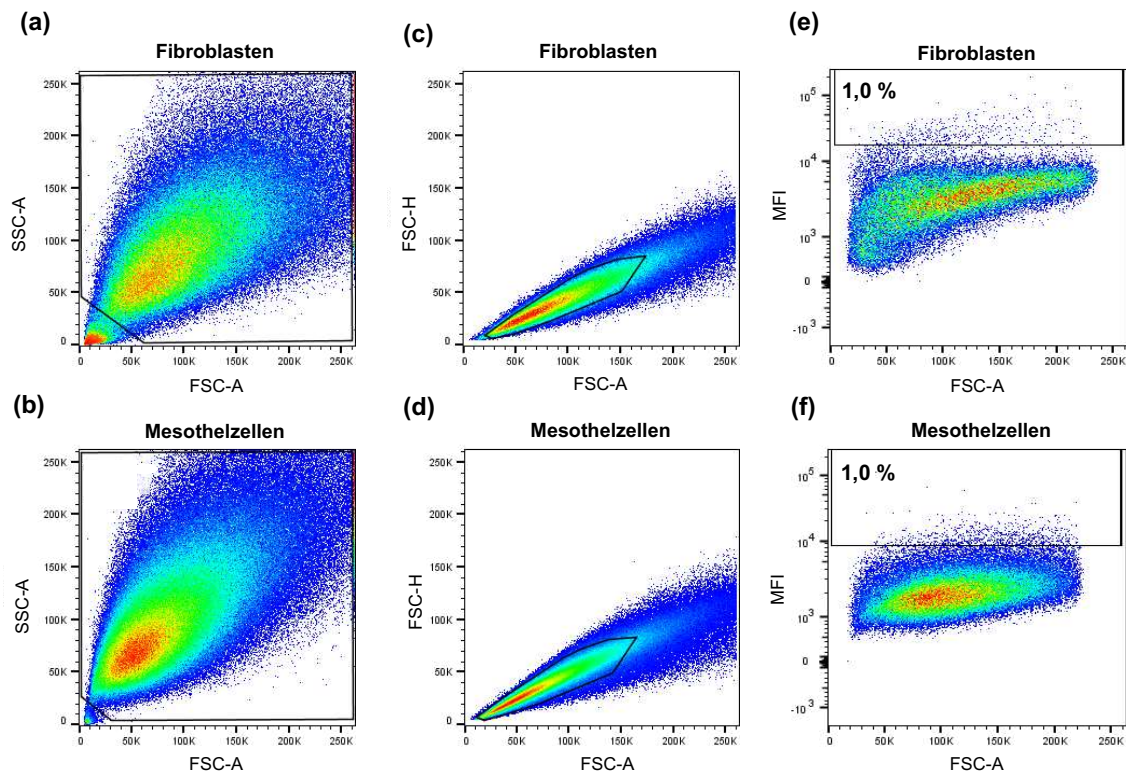


Abbildung 3: Gating Strategie der Durchflusszytometrie von gegen Zytokeratin gefärbten Fibroblasten und Mesothelzellen. Fibroblasten (F) und Mesothelzellen (MZ) wurden gegen Zytokeratin (ZK) gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Forward- und Side-Scatter Charakteristiken wurden verwendet, um tote Zellen und Zellschrott in der F Population (a) und MZ Population (b) zu exkludieren. Anschließend wurden die Forward-Scatter-Area und –Height Charakteristiken verwendet, um Dubletten sowohl in der F-Population (c) als auch in der MZ-Population (d) auszuschließen. Die übrigen Zellen wurden mithilfe der Histogramme in ZK-positive und –negative Populationen eingeteilt. Hierfür wurden die Gates der F (e) und MZ (f) so gesetzt, dass sich 1 % der ungefärbten Zellen im ZK-positiven Gate befanden. Die Abbildung wurde nach Holl et al. (2021) [73] modifiziert.

2.2.7 Raman Mikrospektroskopie

Die Raman Mikrospektroskopie wurde zur molekularen Analyse von fixierten Zellen und Kryo-konservierten Gewebeschnitten angewendet. Zur Untersuchung der neuen Isolationsmethodik wurden 2×10^5 Mesothelzellen der Passagen 1 bis 2 pro dish (μ -dish 35 mm, high glass bottom) ausgesät und für 2 Tage kultiviert, bevor sie in 4 % PFA bei 37 °C für 15 min fixiert wurden. Das intraoperativ gewonnene Kryogewebe des Peritoneums wurde auf eine Dicke von $d = 10 \mu\text{m}$ zugeschnitten und bis zur Messung bei -20 °C gelagert.

Um die Effekte einer PAM-Behandlung auf Fibroblasten und Mesothelzellen nachzuweisen, wurden 2×10^4 Fibroblasten und $1,5 \times 10^5$ Mesothelzellen pro dish ausgesät und 24 h später mit 1:2-verdünntem PAM für 4 h behandelt. Die Zellen wurden in 4 % PFA bei 37 °C für 15 min fixiert und anschließend mit DPBS bedeckt. Auch während der Messung wurden die Zellen und die Gewebeschnitte aus allen Versuchsansätzen mit DPBS bedeckt.

Alle Messungen wurden mit einem kommerziell erworbenen Raman-Mikrospektroskop (alpha300R Raman System, WITec), ausgestattet mit einem grünen Laser (532 nm) und der Software Control FIVE (Version 5.0, WITec), durchgeführt. Zur Dokumentation und Identifikation der Messregionen wurden Hellfeld-Aufnahmen in 63-facher Vergrößerung generiert. Es erfolgten jeweils Messungen mit einer Größe von $100 \times 100 \mu\text{m}$, einer Integrationszeit von 0,05 s und einer Laserstärke von 60 mW. Die Schrittweite der Messpunkte wurde auf $1 \mu\text{m}$ horizontal, sowie senkrecht festgelegt. Es wurden jeweils Fibroblasten und Mesothelzellen von drei verschiedenen Patientinnen und Gewebeproben von zwei verschiedenen Patientinnen analysiert. Pro Patientin wurden drei voneinander unabhängige Aufnahmen mit einem 63 x auflösenden Wasserimmersions-Objektiv generiert. Die Counts (Anzahl der gemessenen Photonen einer bestimmten Wellenlänge) wurden auf der y-Achse angegeben. Die gemessenen Wellenlängen wurden zur Wellenlänge des Lasers relativiert und als Wellennummer auf der x-Achse angegeben.

Die detektierten Raman-Spektren wurden wie folgt ausgewertet: Zunächst wurden die Hintergrundsignale und die kosmische Strahlung subtrahiert. Zudem wurde eine polynomiale Grundlinienkorrektur durchgeführt. Die gemessene Intensität wurde normiert (area to 1). Hierfür wurde die Software Project Five verwendet. Über die True Component Analysis (TCA) wurden die am meisten vertretenen spektralen Signaturen bestimmt. Mithilfe der TCA konnten jeweils Spektren der Zellkerne, Lipide und Proteine bzw. Extrazelluläre Matrix (EZM) identifiziert werden. Die Spektren wurden als Hauptkomponenten entsprechend ihrer Intensitätsverteilung in einer Heatmap farbkodiert dargestellt. Innerhalb der Raman-Bilder wurden die Datenpunkte mit hoher Intensität im jeweiligen Bereich der Wellennummer identifiziert und extrahiert. Hieraus ergab sich je Kondition

200 - 300 Datenpunkte, von denen mittels MatLab jeweils 150 zufällig ausgelesen und die Hauptkomponentenanalyse (PCA) durchgeführt wurde. Für jede Analyse wurde mit dem Programm The Unscrambler X und dem „Nonlinear Iterative Partial Least Squares“ (NIPALS) Algorithmus eine eigenständige PCA errechnet. Die entstandenen Vektoren repräsentierten absteigend den größten Unterschied zwischen den eingespeisten Daten und wurden als Hauptkomponenten (PC) beschrieben. Für die statistische Auswertung wurden die Loadings und Scores der PCs ausgelesen. Das Gegenüberstellen der verschiedenen PCs erlaubte eine visuelle Darstellung von Korrelationen oder Clustering. Der dazugehörige Loadings-Plot ermöglichte eine Interpretation von gefundenen spektralen Unterschieden zwischen den Gruppen.

2.2.8 Generierung von PAM und PAM-Behandlung

Zur Herstellung von PAM wurde der Kaltplasma-Jet kINPen MED® (neoplas tools) verwendet. Als Trägergas wurde das Edelgas Argon, mit einem Gasfluss von 4,0 l/min verwendet. Der Plasma-Jet generierte eine 9 - 13 mm lange Flamme mit einer Temperatur unter 40 °C, wie in Abbildung 3 dargestellt. Die sinusförmige Betriebsfrequenz betrug annähernd 1 MHz. Zur Plasmagenerierung wurde eine Netzspannung von 2 - 3 kV benötigt. Bei einer Eingangsleistung von 20 W, betrug die Leistung der Plasmaflamme 1 W.

Die Behandlung des Kulturmediums erfolgte manuell: Es wurden jeweils 2 mL des MEM-Kulturmediums (inklusive Zusätze) in ein Well einer 6-Well Zellkulturplatte vorgelegt. Anschließend wurde der Plasma-Jet gestartet und über dem Well positioniert. Die Distanz zur Flüssigkeit wurde so gewählt, dass die Spitze der Plasma-Flamme nur bis zur Oberfläche des Mediums reichte. Die Plasma-Behandlung betrug immer exakt 2 min. Als Kontrolle wurden 2 mL MEM-Kulturmedium mit reinem Argon Gas behandelt (ctrl).

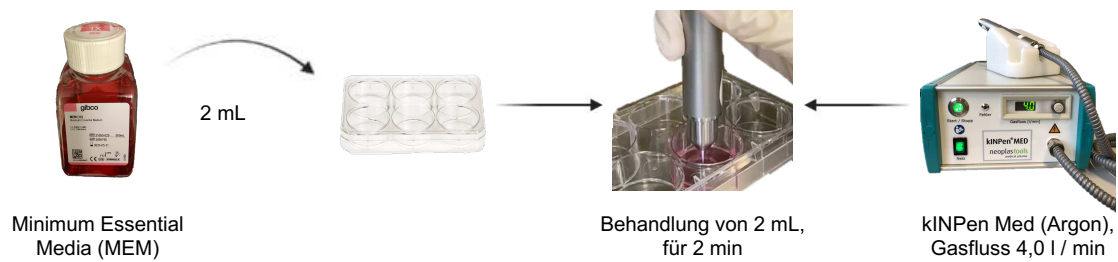


Abbildung 4: Herstellung von PAM. Zur Herstellung von PAM wurden zunächst 2 mL des MEM-Kulturmediums in eine 6-Well Zellkulturplatte pipettiert. Der Plasma-Pen wurde so über dem Medium platziert, dass die Spitze des Kegels die Oberfläche touchierte. 2 mL wurden für exakt 2 min behandelt und anschließend über Verdünnungsreihen entsprechend verwendet.

Es wurden verschiedene PAM-Dosierungen verwendet, wobei das Prinzip der Verdünnung in Tabelle 11 dargestellt wurde.

Tabelle 11: PAM-Verdünnungen.

Bezeichnung	Verdünnung	Beispiel bei V = 200 µL
PAM	unverdünnt	200 µL PAM
1 : 1	1 Teil PAM zu 1 Teil Medium	100 µL PAM + 100 µL MEM
1 : 2	1 Teil PAM zu 2 Teilen Medium	66,66 µL PAM + 133,33 µL MEM
1 : 5	1 Teil PAM zu 5 Teilen Medium	33,33 µL PAM + 166,66 µL MEM

Das Volumen der PAM-Behandlung wurde an die Größe der Versuchsfläche der Zellen angepasst. Vor jeder Behandlung wurden die Zellen vorsichtig mit DPBS gewaschen. Im Anschluss wurde die Verdünnung mit entsprechendem Volumen auf die Zellen gegeben (Zeitpunkt $t = 0$ h) und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach vierstündiger Inkubationszeit wurde das PAM abgezogen und die Zellen erneut zweimal vorsichtig mit DPBS gewaschen.

2.2.9 Analyse der zellulären Konfluenz

Fibroblasten und Mesothelzellen wurden auf 96-Well Platten kultiviert, mit der entsprechenden PAM-Dosierung behandelt und anschließend für 72 h lichtmikroskopisch mithilfe des IncuCyte S3-live Cell Imaging Systems überwacht. Hierfür wurden 2×10^3 Fibroblasten pro Well einer 96-Well Platte ausgesät und für 24 h kultiviert. Die 96-Well Platte der Mesothelzellen wurde zuvor mit Gelatine beschichtet. Anschließend wurden $1,5 \times 10^4$ Mesothelzellen pro Well ausgesät und für 24 h kultiviert. Nach 24 h wurden die Zellen vorsichtig mit 100 μ l DPBS gewaschen und mit 200 μ l der jeweiligen PAM-Verdünnung behandelt. Es wurden jeweils 8 Wells mit derselben PAM-Verdünnung behandelt. Ab dem Zeitpunkt $t = 0$ h wurden die Zellen im IncuCyte kultiviert (37 °C, 5 % CO₂). Jede Stunde wurden automatisiert 4 lichtmikroskopische Aufnahmen pro Well in 10-facher Vergrößerung durchgeführt. Das Experiment wurde für jeden Zelltyp und jede PAM-Verdünnung mindestens dreimal (jeweils 8 Wells pro Verdünnung), mit Zellen drei verschiedener Patientinnen durchgeführt.

Die IncuCyte Software ermittelte die durchschnittliche Konfluenz aus 4 Aufnahmen (in %) jedes Wells, zu jedem Zeitpunkt. Die gemittelten Werte der jeweils 8 Wells pro Verdünnung, wurden auf den jeweiligen $t = 0$ h Wert der Verdünnung normiert und als relative Konfluenz (rel. Konfluenz) angegeben. Die verwendeten statistischen Testverfahren wurden im Abschnitt des Ergebnisteils erläutert.

2.2.10 Analyse von DNA-Doppelstrangbrüchen

Das Histon H2AX wird in seiner phosphorylierten Form zum Nachweis von Doppelstrangbrüchen (DSB) verwendet, da diese bereits wenige Sekunden nach Durchtrennung der DNA-Stränge aktiviert werden. Die Phosphorylierung an Serin 139 kann durch Antikörper (hier: γ H2AX-Antikörper) detektiert werden.

$1,4 \times 10^5$ Fibroblasten (Passage 3 - 4) wurden pro T25 Kulturflasche ausgesät. 3×10^5 Mesothelzellen (Passage 1 - 2) wurden pro Well einer beschichteten 6-Well

Platte ausgesät. Folgende PAM-Verdünnungen wurden analysiert: 1:5, 1:2, 1:1 und ctrl. Zu den Zeitpunkten $t = 1 \text{ h}$, 4 h und 24 h wurden Analysen der DSB durchgeführt. Die Messungen wurde pro Zelltyp dreimal ($n = 3$) durchgeführt. Als zusätzliche Kontrolle wurden Zellen für 30min bei 25 J / m^2 in einer UV-Kammer inkubiert. Die behandelten Zellen wurden wie folgt vorbereitet: Jeder Probe wurde in 4 mL einer eiskalten 1%igen PFA-Lösung für 15 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen zentrifugiert, gewaschen, in $200 \mu\text{L}$ eiskaltem DPBS resuspendiert und in 5 mL -Tubes überführt. Es wurden 2 mL 70%iger Ethanol hinzugeführt und die Proben über Nacht bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit 2 mL des BSA-Triton-PBS-Puffers (1 % BSA, 0,2 % TritonX, gelöst in DPBS) gewaschen und für 5 min mit 2 mL desselben Puffers inkubiert. Die Proben wurden mit $100 \mu\text{L}$ des Färbepuffers ($10 \mu\text{g / mL}$ γH2AX Antikörper, gelöst in BSA-Triton-PBS-Puffer) für 1 h im Dunkeln gefärbt. Nach abschließendem Zentrifugieren wurden die Zellen in $150 \mu\text{L}$ DPBS resuspendiert und mit einem Durchflusszytometer analysiert. Die Gating-Strategie wurde wie in Abbildung 3 durchgeführt. Die mittlere Intensität des Fluoreszenzsignals (MFI) jeder Probe wurde mithilfe der FlowJo Software bestimmt und auf den Wert der ctrl zu jedem Zeitpunkt normiert (Fold change) und statistisch ausgewertet.

2.2.11 Zellzyklusanalyse

Der interkalierende Farbstoff Propidiumiodid (PI) wurde verwendet, um anhand der Stärke des Signals auf die Zellzyklusphasen rückzuschließen. $1,4 \times 10^5$ Fibroblasten (Passage 3 - 8) wurden pro Kulturflasche mit 25 cm^2 Wachstumsfläche ausgesät. Das Arbeitsvolumen betrug 3 mL . 3×10^5 Mesothelzellen (Passage 1 - 2) wurden pro Well einer zuvor beschichteten 6-Well Platte ausgesät. Das Arbeitsvolumen pro Well betrug 1 mL . Die Proben wurden mit den folgenden PAM-Verdünnungen behandelt: 1:5, 1:2, 1:1 und ctrl. Zu den Zeitpunkten $t = 4 \text{ h}$, 24 h und 72 h wurden Zellzyklusanalysen

durchgeführt. Die Analyse wurde pro Zelltyp dreimal ($n = 3$) durchgeführt. Als Kontrolle wurden Zellen mit $1 \mu\text{M}$ Gemcitabin behandelt.

Die behandelten Zellen wurden trypsinisiert, zentrifugiert und in $500 \mu\text{l}$ eiskaltem DPBS resuspendiert. Die Proben wurden in 2 mL 70%igem Ethanol für 30 min bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ fixiert. Die fixierten Zellen wurden für 10 min bei $300 \times g$ zentrifugiert und anschließend in $500 \mu\text{l}$ DPBS resuspendiert. Nach erneutem Waschen wurden die Pellets mit $150 \mu\text{l}$ des Färbepuffers ($20 \mu\text{g} / \text{mL}$ PI und $100 \mu\text{g} / \text{mL}$ RNase in DPBS) für 30 min bei RT inkubiert. Die Proben wurden mittels Durchflusszytometrie gemessen und mithilfe der FlowJo Software ausgewertet. Wie in Abbildung 5 (a) - (d) dargestellt, wurden die Zellen zunächst anhand der FSC-A und SSC-A, sowie FSC-A und FSC-H Charakteristiken gated. Auf der x-Achse des Histogramms wurde in (e) und (f) die Intensität des Signals gegen die Anzahl der jeweils gemessenen Zellen (Counts, y-Achse) aufgetragen. Der erste Peak stellte den Anteil der Zellen dar, die sich in der G0/G1-Zellzyklusphase befanden (1-Chromatid-Chromosomen), während der zweite Peak Zellen zeigte, die bereits die G2/M-Phase (2-Chromatid-Chromosomen) erreicht haben. Zellen zwischen den Peaks repräsentierten die S-Phase. Die Gates der Zellzyklusphasen wurden einheitlich an den charakteristischen Punkten gesetzt. Die prozentualen Werte der Zellzyklusphasen wurden in Bezug zur Grundgesamtheit gesetzt und statistisch ausgewertet.

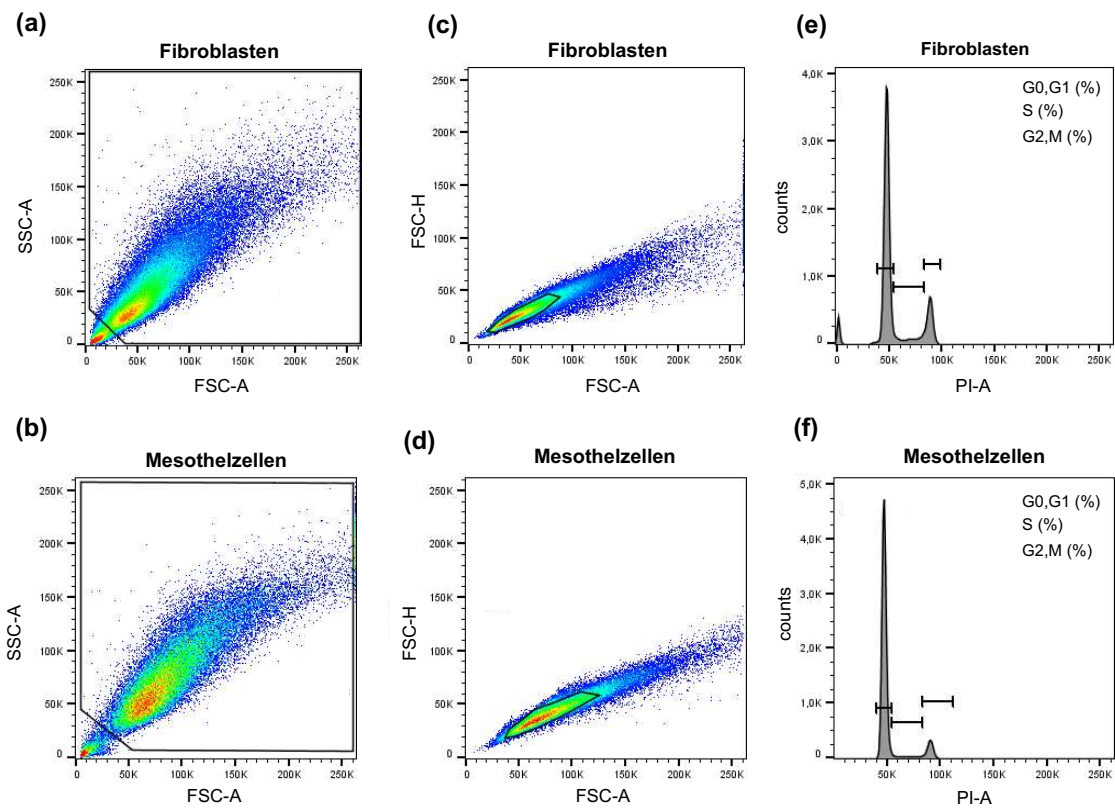


Abbildung 5: Gating-Strategie zur Zellzyklusanalyse von Fibroblasten und Mesothelzellen per Durchflusszytometrie. Fibroblasten (F) und Mesothelzellen (MZ) wurden mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff PI behandelt und mittels Durchflusszytometer analysiert. Forward- und Sideward-Scatter Charakteristiken (FSC-A und SSC-A) wurden verwendet, um Zellschrott der F- (a) und MZ-Population (b) zu exkludieren. Anschließend wurden durch Forward-Scatter-Area und -Height Charakteristiken Dubletten der F (c) und MZ (d) ausgeschlossen. (e,f) Die PI-Färbung wurde als Histogramm dargestellt. Die Gates der verschiedenen Phasen wurden einheitlich an charakteristischen Punkten der Histogramme angelegt. Die Abbildung wurde nach Holl et al. (2022) modifiziert [75].

2.2.12 Caspase 3/7 Assay

Die Caspasen 3 und 7 gehören zu den Effektor-Caspasen, die den programmierten Zelltod (Apoptose) initiieren. Das Caspase-3/7 Reagenz besteht aus einem DNA-bindenden Farbstoff, kann die Zellmembran frei passieren und ist im inaktiven Zustand nicht fluoreszierend. Die aktivierten Caspasen führen zu einer Freisetzung des Farbstoffs, der daraufhin an die DNA binden kann. Das entstehende Signal (630 - 650 nm) wurde mit einem Plate Reader detektiert.

Fibroblasten (Passage 2 - 5) wurden mit 2×10^3 Zellen pro Well einer 96-Well Platte ausgesät. Mesothelzellen (Passage 1 - 3) wurden mit $1,5 \times 10^4$ Zellen pro

Well einer beschichteten 96-Well Platte ausgesät. Nach 24 h Kultivierung erfolgte die Behandlung mit den PAM-Verdünnungsstufen 1:5, 1:2, 1:1 und ctrl. Der Versuch wurde pro Zelltyp mindestens dreimal ($n = 3$) in Duplikaten durchgeführt. Es wurden jeweils zusätzliche Kontrollen ohne Zellen (Hintergrundsignal), vehicle Kontrollen (DMSO) und Positivkontrollen (Staurosporin $1 \mu\text{M}$) durchgeführt. Der Assay wurde entsprechend der Anleitung des Herstellers vorbereitet und 1:500 in vorgewärmten Kulturmedium verdünnt. Zum Zeitpunkt $t = 4 \text{ h}$ wurden die PAM-behandelten Zellen gewaschen und mit jeweils $100 \mu\text{L}$ des Assay-Ansatzes bedeckt. Die Proben wurden im IncuCyte bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5% CO_2 inkubiert. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden Messungen der Fluoreszenz mit einem Plate Reader durchgeführt und die Konfluenz der Zellen lichtmikroskopisch mit dem IncuCyte festgehalten. Die gemessenen Signale wurden wie folgt ausgewertet: Das Hintergrundsignal wurde zuerst subtrahiert. Die jeweiligen Werte wurden zu jedem Zeitpunkt ins Verhältnis zur Konfluenz gesetzt. Mithilfe von Prism wurden die Werte auf den Mittelwert der Kontrolle normiert (Fold change) und statistisch ausgewertet.

2.2.13 Annexin V Assay

Annexin V ist ein zelluläres Protein, welches an Phosphatidylserin (PS) bindet. In der frühen Phase der Apoptose wird PS auf die äußere Seite der Plasmamembran transportiert, wo es auf der extrazellulären Seite der Membran von Annexin V gebunden werden kann. Der RealTime-Glo Annexin V-Assay detektiert das Vorhandensein von PS auf der äußeren Plasmamembran in Echtzeit und somit die Induktion von Apoptoseprozessen.

Es wurden Fibroblasten (Passage 2 - 5) mit 2×10^3 Zellen pro Well und Mesothelzellen (Passage 1 - 3) mit $1,5 \times 10^4$ Zellen pro Well einer 96-Well Platte ausgesät. Die Proben wurden mit folgenden PAM-Verdünnungen behandelt: 1:5, 1:2, 1:1 und ctrl. Der Versuch wurde pro Zelltyp mindestens dreimal ($n = 3$) in Duplikaten durchgeführt. Es wurden jeweils zusätzliche Kontrollen ohne Zellen (Hintergrundsignal) und Positivkontrollen (Staurosporin $1 \mu\text{M}$) durchgeführt. Der

Assay wurde entsprechend der Anleitung des Herstellers vorbereitet und in vorgewärmtem Zellkulturmedium 1:1000 verdünnt. Die Proben wurden im Anschluss an die PAM-Behandlung mit DPBS gewaschen und mit 100 µL des Assay-Ansatzes bedeckt. Die Zellen wurden im IncuCyte bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden Messungen der Lumineszenz mit einem Plate Reader durchgeführt und die Konfluenz der Zellen lichtmikroskopisch mit dem IncuCyte aufgenommen. Die gemessenen Lumineszenzsignale wurden wie folgt ausgewertet: Das Hintergrundsignal wurde zuerst subtrahiert und die Werte zu jedem Zeitpunkt ins Verhältnis zur Konfluenz gesetzt. Mithilfe von Prism wurden die Werte auf den Mittelwert der Kontrolle normiert (Fold change) und statistisch ausgewertet.

2.2.14 Nekrose Assay

Der DNA-bindende Farbstoff des Nekrose Assays ist nicht membrangängig. Wenn die Plasmamembran während des Nekrosevorgangs beschädigt wird, kann der Farbstoff nach intrazellulär gelangen und den Nekroseprozess in Echtzeit detektieren. Das entstehende Fluoreszenzsignal (496 - 555 nm) wurde mit einem Plate-Reader detektiert.

Fibroblasten (Passage 2 - 5) wurden mit 2×10^3 Zellen pro Well und Mesothelzellen (Passage 1 - 3) mit $1,5 \times 10^4$ Zellen pro Well einer 96-Well Platte ausgesät. Die Proben wurden mit folgenden PAM-Verdünnungen behandelt: 1:5, 1:2, 1:1 und ctrl. Der Versuch wurde pro Zelltyp mindestens dreimal ($n = 3$) in Duplikaten durchgeführt. Es wurden jeweils zusätzliche Kontrollen ohne Zellen (Hintergrundsignal) und Positivkontrollen (Carboplatin 75 µM) durchgeführt. Der Assay wurde entsprechend der Anleitung des Herstellers vorbereitet und in vorgewärmtem Zellkulturmedium 1:1000 verdünnt. Die Zellen wurden im Anschluss an die PAM-Behandlung mit DPBS gewaschen und mit 100 µL des Assay-Ansatzes bedeckt. Die Zellen wurden im IncuCyte bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden Messungen der Fluoreszenz mit einem Plate Reader durchgeführt und die Konfluenz der Zellen

lichtmikroskopisch mit dem IncuCyte aufgenommen. Die gemessenen Signale wurden wie folgt ausgewertet: Das Hintergrundsignal wurde subtrahiert und die jeweiligen Werte zu jedem Zeitpunkt ins Verhältnis zur Konfluenz gesetzt. Mithilfe von Prism wurden die Werte auf den Mittelwert der Kontrolle normiert (Fold change) und statistisch ausgewertet.

2.2.15 Viability Assay

Der Viability Assay demonstriert die Fähigkeit von Zellen das enthaltene Substrat zu reduzieren, was eine Eigenschaft von ausschließlich vitalen Zellen darstellt. Das reduzierte Substrat wird von der enthaltenen Luciferase zu einem Lumineszenzsignal umgewandelt und korreliert direkt und in Echtzeit mit der Viabilität der Zellen.

Fibroblasten (Passage 2 - 4) wurden mit 2×10^3 Zellen pro Well einer 96-Well Platte ausgesät. Mesothelzellen (Passage 1 - 3) wurden mit $1,5 \times 10^4$ Zellen pro Well einer 96-Well Platte ausgesät. Die Proben wurden mit folgenden PAM-Verdünnungen behandelt: 1:5, 1:2, 1:1 und ctrl. Der Versuch wurde pro Zelltyp mindestens dreimal ($n = 3$) in Duplikaten durchgeführt. Es wurden Kontrollen ohne Zellen (Hintergrundsignal), eine vehicle Kontrolle (DMSO) und Negativkontrollen (Carboplatin $75 \mu\text{M}$) durchgeführt. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden Messungen der Lumineszenz mit einem Plate Reader durchgeführt und die Konfluenz der Zellen lichtmikroskopisch mit dem IncuCyte aufgenommen. Die gemessenen Lumineszenzsignale wurden wie folgt ausgewertet: Das Hintergrundsignal wurde subtrahiert und die jeweiligen Werte zu jedem Zeitpunkt ins Verhältnis zur Konfluenz gesetzt. Mithilfe von Prism wurden die Werte auf den Mittelwert der Kontrolle normiert (Fold change) und statistisch ausgewertet.

2.2.16 Statistische Auswertung

Die weitere Auswertung und Darstellung der erhobenen Daten erfolgte durch Microsoft Excel, Microsoft PowerPoint und Prism (GraphPad). Die jeweils verwendeten Testverfahren wurden im zugehörigen Abschnitt erläutert. P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Isolation peritonealer Mesothelzellen

3.1.1 Etablierung der Isolationsmethodik

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst ein neues Verfahren zur Isolation humaner peritonealer Mesothelzellen entwickelt, da bisher veröffentlichte Methodiken verschiedene Probleme und Schwierigkeiten aufwiesen. Die neue Isolationsmethodik kennzeichnet sich durch die Verwendung von Spülzytologien des Douglasraums, wie bereits in 2.2.1 beschrieben wurde und zeigte Vorteile bezüglich der Reinheit und Qualität der isolierten Mesothelzellen, im Vergleich zu alternativen Methoden.

Bereits 24 h nach der Isolation zeigten sich die Mesothelzellen adhärent und wiesen eine bi- bis multipolare oder spindelförmige Morphologie auf (Abbildung 6 a). Nach dreitägiger Kultivierung erschienen die Zellen einheitlich oval, mit einer annähernd kongruenten Zellgröße (nicht gezeigt). Im Anschluss an die initiale Wachstumsphase bildeten die Zellen einen konfluenten und homogenen Monolayer aus. Dabei nahm die Kultur nach sechs bis sieben Tagen ein typisches kopfsteinpflasterartiges Erscheinungsbild an (Abbildung 6 b). Eine Kontamination mit anderen Zelltypen, insbesondere mit peritonealen Fibroblasten, die sich morphologisch deutlich von Mesothelzellen abgrenzen, konnte lichtmikroskopisch nicht beobachtet werden. Abhängig von der initial ausgesäten Anzahl an Mesothelzellen (1×10^5 - 1×10^7 Zellen pro T75 Zellkulturflasche), erreichte die Population nach sieben bis zehn Tagen einen vollständig konfluenten Zellrasen.

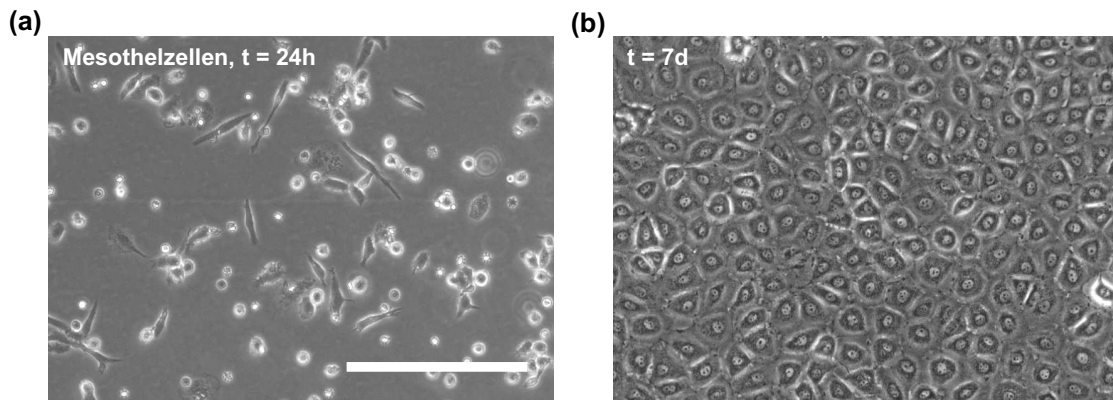


Abbildung 6: Morphologie der Mesothelzellkultur nach der Isolation aus Spülzytologie. Nach der Isolation von Mesothelzellen (MZ) aus peritonealen Spülzytologien wurden diese bis zum Erreichen eines konfluenten Zellrasens täglich lichtmikroskopisch überwacht. (a) Nach 24 h Kultivierung konnten adhärente, langgestreckte und teils multipolare Zellen beobachtet werden. (b) 7 Tage (7d) nach Isolation erreichte die Zellkultur einen homogenen Monolayer, aus einheitlich ovalen und kopfsteinpflasterartigen MZ. Der Maßstabsbalken entspricht 200 μm . Die Grafik wurde nach Holl et al. (2021) [73] modifiziert.

Die isolierten Mesothelzellen wurden erfolgreich über fünf bis sechs Passagen kultiviert und für nachfolgende Analysen und Versuchsansätze verwendet. Ab Passage sieben zeigten sich zum Teil Veränderungen der Zellmorphologie, die eine fortschreitende Seneszenz der Zellen vermuten ließen. Beobachtet wurde eine Zunahme der Zellgröße und Anzahl der Zellkerne, sowie eine geringere Proliferationsrate. Es wurde festgestellt, dass eine erhöhte mechanische Irritation oder Langzeitinkubation der Mesothelzellen mit Trypsin/EDTA zu einem Verlust der typischen Morphologie führen kann.

3.1.2 Patientinnen-spezifische Eigenschaften

Die verwendeten peritonealen Spülzytologien zur Isolation von Mesothelzellen und die peritonealen Gewebeproben zur Isolation von Fibroblasten wurden von Patientinnen nach deren schriftlicher Einwilligung, im Rahmen anderweitig indizierter operativer Eingriffe im Zeitraum von März bis Dezember 2020 am Department für Frauengesundheit (Universitäts-Frauenklinik) in Tübingen gewonnen.

Zur Isolation peritonealer Mesothelzellen wurden 19 Spülzytologien von gesunden Patientinnen mit einem Durchschnittsalter von 30,7 Jahren verwendet (siehe Tabelle 12). Die durchschnittliche Gravidität betrug 1,1 bei einer Parität von 0,6. 18 der 19 Patientinnen (94,7 %) befanden sich in einem prämenopausalen Stadium. Eine Patientin (5,3 %) wurde als perimenopausal (ausbleibende Blutung > 6 Monate und < 12 Monate) klassifiziert. Etwa die Hälfte der Patientinnen (47,4 %) wurde diagnostisch laparoskopiert, um die Ursache eines unerfüllten Kinderwunsches zu ergründen. Weitere Laparoskopien wurden aufgrund von chronischen Schmerzen, Hypermenorrhoe oder dem Verdacht auf Zysten durchgeführt. Bei 42,1 % der Patientinnen wurden intraoperativ Adhäsionen im Bereich des Unterbauchs festgestellt. Voroperationen im Bereich des Abdomens lagen bei 26,3 % der Patientinnen vor.

Zur Isolation von Fibroblasten wurden 12 peritoneale Gewebeproben während elektiven primären Kaiserschnitten entnommen. Folglich befanden sich alle Spenderinnen im prämenopausalen Stadium (100 %). Die Patientinnen waren durchschnittlich 34,2 Jahre alt. Die mittlere Gravidität betrug 2,3 bei einer Parität von 1,6. Die Operationsberichte dieser Patientinnen wiesen keine Besonderheiten hinsichtlich Adhäsionen auf.

Tabelle 12: Charakterisierung der Patientinnen.

	MZ	F
Anzahl Patientinnen, n (%)	19 (100)	12 (100)
Altersdurchschnitt, Jahre (min. - max.)	30,7 (16-50)	34,2 (29-41)
Gravidität, n (min. - max.)	1,1 (0-5)	2,3 (1-5)
Parität, n (min. - max.)	0,6 (0-4)	1,6 (1-4)
Funktion Eierstock, n (%)		
prämenarchal	1 (5,3)	0 (0,0)
prämenopausal	17 (89,4)	12 (100,0)
perimenopausal	1 (5,3)	0 (0,0)
OP-Indikation		

Hypermenorrhoe / Hysterektomie	5 (26,3)	-
Diagnostik / Schmerzen	4 (21,1)	-
Diagnostik / Kinderwunsch	9 (47,4)	-
Zysten	1 (5,3)	-
Sectio caesarea	-	12 (100)
Intraoperative Befunde, n (%)		
Adhäsionen	8 (42,1)	-
Endometriose	5 (26,3)	-
keine	6 (31,6)	-
Vor-OP, n (%)	5 (26,3)	-

3.1.3 Biomolekulare Charakterisierung isolierter Mesothelzellen

Die charakteristische Expression spezifischer Mesothelzellmarker wurde untersucht, um Mesothelzellen eindeutig zu identifizieren und von anderen Zelltypen, vor allem von Fibroblasten abzugrenzen. Mesothelzellen wurden zunächst morphologisch von peritonealen Fibroblasten differenziert und hierfür lichtmikroskopisch analysiert. Die beiden Zelltypen unterschieden sich bereits anhand der zellspezifischen Morphologie. Mesothelzellen zeigten ein typisches homogenes kopfsteinpflasterartiges Erscheinungsbild (Abbildung 7 a). Sie erschienen deutlich kleiner als Fibroblasten. Im Gegensatz dazu präsentierten sich Fibroblasten spindelförmig mit langen, zum Teil verzweigten Fortsätzen (Abbildung 7 b).

Im Anschluss wurde die spezifische Expression charakteristischer Zellstrukturen von Mesothelzellen durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert und gegenübergestellt. Es wurden IF-Färbungen von Mesothelzellen und Fibroblasten gegen Zytokeratin, Calretinin, Fibronectin und Wilms´ tumor protein 1 (WT-1) durchgeführt. Die Fluoreszenzmikroskopie zeigte bei Mesothelzellen

eine spezifische und intensive Expression des epithelialen Markers Zytokeratin (Abbildung 7 c). Fibroblasten wiesen keine Expression von Zytokeratin auf, wie in Abbildung 7 (d) gezeigt wurde. Umgekehrt verhielt sich der Nachweis des Glykoproteins Fibronectin. Mesothelzellen zeigten eine allenfalls vernachlässigbare Fibronectinexpression (Abbildung 7 e), während in Fibroblasten Fibronectin intensiv und hoch spezifisch nachweisbar war (Abbildung 7 f). Das Calcium-bindende Protein Calretinin wurde in Mesothelzellen mit unterschiedlich starker Intensität nachgewiesen (Abbildung 7 g). Fibroblasten zeigten keine Expression von Calretinin (Abbildung 7 h). Der nukleäre Transkriptionsfaktor WT-1 wurde von beiden Zelltypen auf gleiche Weise konstant exprimiert (Abbildung 7 i,j).

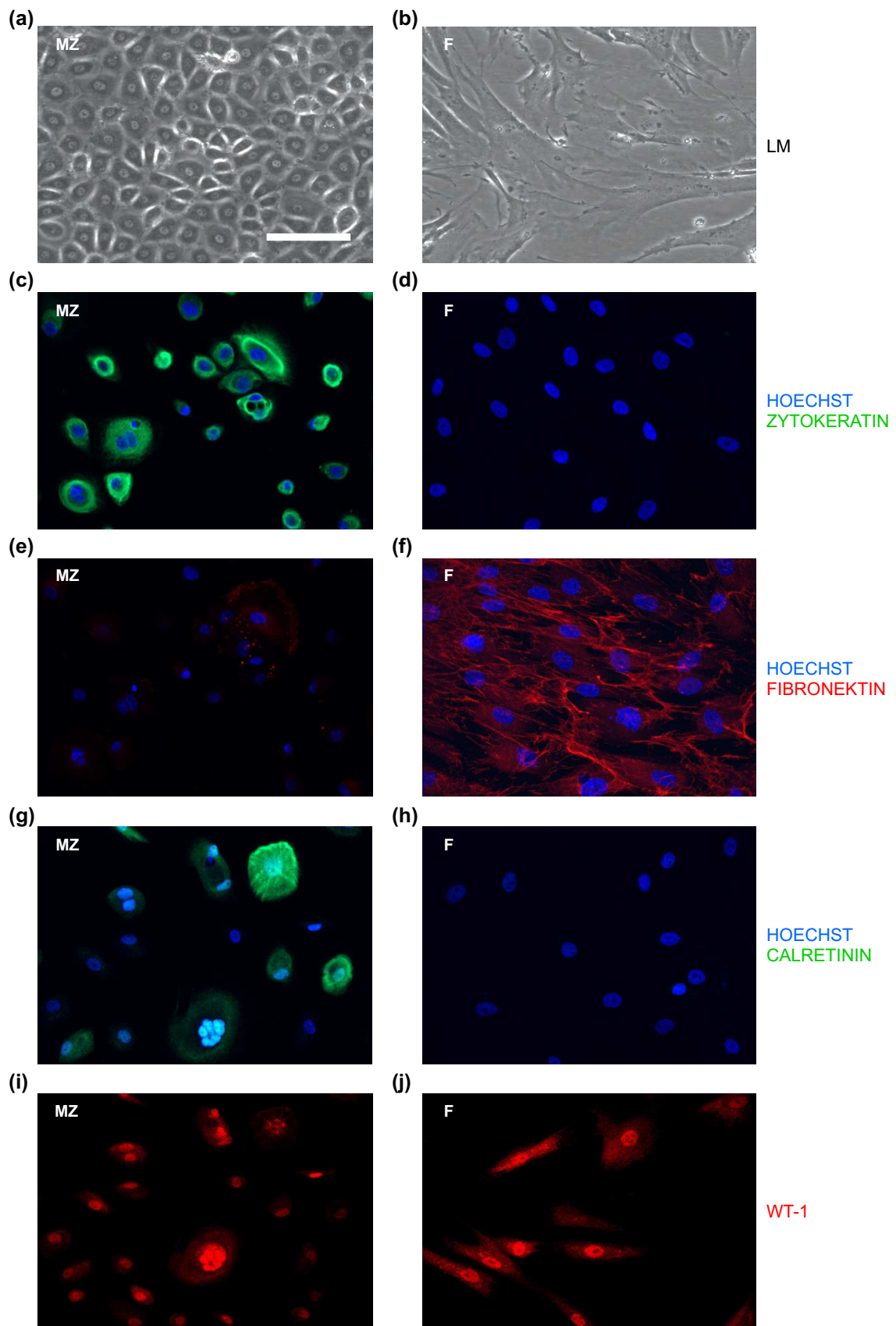


Abbildung 7: Biomolekulare Charakterisierung peritonealer Mesothelzellen und Fibroblasten. Isolierte Mesothelzellen (MZ) aus Spülzytologien und Fibroblasten (F) aus

peritonealen Gewebeproben wurden für 3 bis 4 Tage kultiviert. Anschließend wurden lichtmikroskopische Aufnahmen (a,b), sowie Immunfluoreszenz-Färbungen gegen Zytokeratin (c,d), Fibronectin (e,f), Calretinin (g,h) und WT-1 (Wilms´ Tumor-Protein 1) (i,j) durchgeführt. (a) MZ erschienen lichtmikroskopisch typisch als kopfsteinpflasterartiger Monolayer, (b) während F eine längliche und spindelförmige Morphologie aufwies. (c) MZ zeigten eine hohe Expression des epithelialen Markers Zytokeratin, (d) während F keine Expression von Zytokeratin aufwies. (e) Einige MZ exprimierten Fibronectin auf einem basalen Level, (f) wohingegen sich eine hohe Expression von Fibronectin bei F zeigte. (g) Calretinin wurde von MZ mit unterschiedlicher Stärke exprimiert. (h) F zeigten keine Calretinin Expression. (g, h) Beide Zelltypen exprimierten auf gleiche Weise WT-1. Der Maßstab balken stellt 100 µm dar. Teile der Grafik wurden nach Holl et al. (2021) [73] und Holl et al. (2022) [75] modifiziert.

Die lichtmikroskopische Charakterisierung und der IF-Nachweis von Zytokeratin, Calretinin und WT-1 reichte aus, um Mesothelzellen eindeutig zu identifizieren und von Fibroblasten zu unterscheiden. Aufgrund der hochspezifischen, homogenen und intensiven Expression von Zytokeratin in Mesothelzellen, unabhängig der Zellpassage, wurde Zytokeratin als zuverlässiger und einfach nachzuweisender Marker zur Mesothelzellcharakterisierung und Abgrenzung von Fibroblasten identifiziert und in den darauffolgenden Versuchen weiterverwendet.

3.1.4 Mesothelzell-identifizierende Marker

Die charakterisierende Expression von Zytokeratin, Calretinin und WT-1 in Mesothelzellen wurde detaillierter mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie in 63 x Vergrößerung analysiert.

Die Expression des epithelialen Markers Zytokeratin erstreckte sich über die gesamte Zelle (Abbildung 8 a) hinweg. Zytokeratin konnte von perinukleär bis zur Plasmamembran konstant nachgewiesen werden, was ein typisches Merkmal von Intermediärfilamenten darstellt. Die Expression von Calretinin erstreckte sich im Gegensatz dazu nicht über die gesamte Zelle (Abbildung 8 b). Das Calcium-bindende Protein Calretinin wurde vor allem in einem breiten zirkulären Bereich direkt um den Nukleus exprimiert. Der nukleäre Transkriptionsfaktor WT-1 (Abbildung 8 c) wurde vor allem intranukleär exprimiert. Zum Teil konnte auch perinukleär eine Expression detektiert werden.

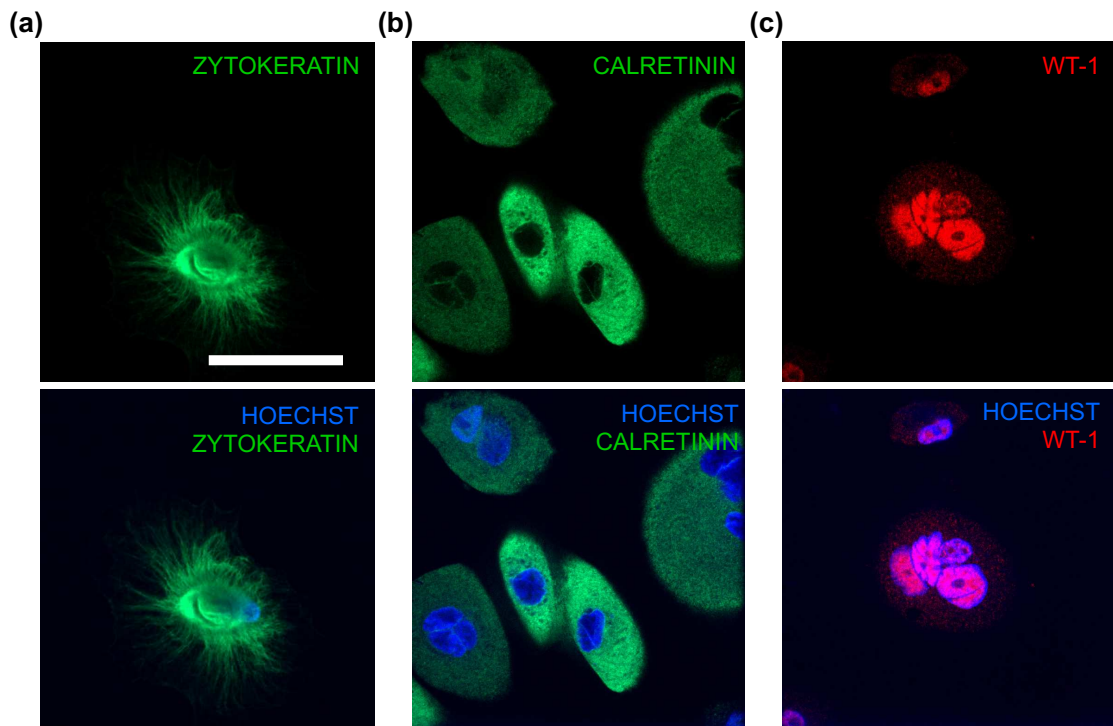


Abbildung 8: Mesothelzellidentifikation über Zytokeratin-, Calretinin- und WT-1-Expression. Die isolierten Mesothelzellen (MZ) wurden für 3 bis 4 Tage kultiviert. Anschließend wurde eine IF-Färbung gegen Zytokeratin, Calretinin und WT-1 durchgeführt. (a) Der epitheliale Marker Zytokeratin wurde in der gesamten Zelle, (b) das Calcium-bindende Protein Calretinin ausschließlich zytoplasmatisch und (c) WT-1 vor allem im Zellkern nachgewiesen, sporadisch auch perinukleär. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μm .

3.1.5 Bestimmung der Reinheit der isolierten Mesothelzellpopulation

Um die Reinheit der isolierten Mesothelzellpopulation zu bestimmen und um eine Kontamination mit Fibroblasten auszuschließen, wurden primär isolierte Mesothelzellen und Fibroblasten gegen Zytokeratin (ZK) gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Als Kontrollen wurden die Zelllinien HaCat (Keratinocyten, ZK+) und BJ (Fibroblasten, ZK-) verwendet. Das Gating (Abbildung 9 a, b) wurde wie bereits in der Methodik beschrieben, durchgeführt und die Zellen quantitativ analysiert.

Die Plots der repräsentativen gefärbten Zellen zeigten eine Verlagerung der Mesothelzellen zu 98,9 % und der Fibroblasten zu 1,52 % in das ZK+ Gate (Abbildung 9 c, d). Folglich zeigten mehr als 98 % der gefärbten Mesothelzellen eine ZK-Expression, während bei weniger als 2 % der Fibroblasten eine

entsprechende Expression nachgewiesen wurde. Die Darstellung als Histogramme (Abbildung 9 e - h) visualisierte den Shift der gefärbten Zellen (blau) im Gegensatz zu den ungefärbten Zellen (rot) in das ZK+ Gate (schwarzer Balken). Während sich die gefärbte Mesothelzellpopulation deutlich in den ZK+ Bereich verlagerte, wurde bei den Fibroblasten nur ein minimaler Shift beobachtet. Die Ergebnisse der gemittelten ZK-Expression (n = 3) wurden in Abbildung 9 (i) dargestellt. Die isolierten Mesothelzellen exprimierten zu $97,7 \pm 0,7$ % den epithelialen Marker ZK, was einer sehr hohen Reinheit der Population entspricht. Bei nur $7,01 \pm 5,5$ % der isolierten Fibroblasten konnte eine ZK-Expression nachgewiesen werden.

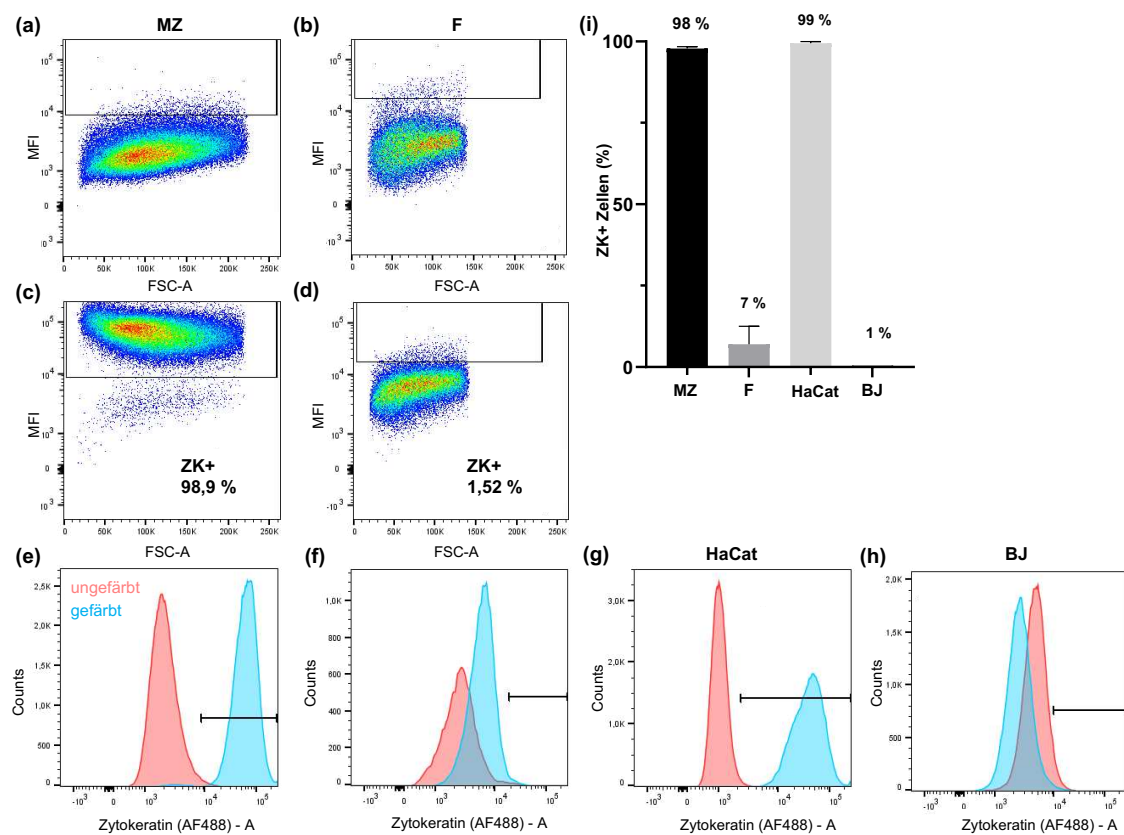


Abbildung 9: Bestimmung der Reinheit der isolierten Mesothelzellpopulation anhand der Expression von Zytokeratin. Mesothelzellen (MZ), Fibroblasten (F), Keratinozyten (HaCat) und BJ-Fibroblasten (BJ) wurden gegen Zytokeratin (ZK) gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. (a, b) Die durchschnittliche Fluoreszenz-Intensität (MFI) ungefärbter MZ und ungefärbter F wurde durch den FSC-A (Forward-Scatter-Area) versus MFI-Plot dargestellt. Das Gate für ZK+ Zellen wurde so gewählt, dass sich 1 % der ungefärbten Zellen darin befanden. (c) 98,9 % der MZ-Population exprimierte ZK. (d) Im Gegensatz dazu exprimierten nur 1,52 % der F ZK. (e) Die Histogramme visualisierten den Shift der gefärbten (blau) vs. der ungefärbten (rot) MZ-Population. Die gefärbten MZ verlagerten sich annähernd komplett in den ZK+ Bereich (schwarzer Balken). (f) Die gefärbte F-Population (blau) verlagerte sich nur minimal Richtung ZK+

Bereich. (g) Die ZK-Färbung der HaCat-Kontrollzelllinie bewirkte ebenfalls eine deutliche Verlagerung der Population. (h) Die ZK-Färbung der BJ-Kontrollzelllinie zeigte keine wesentliche Verlagerung in den ZK+ Bereich. (i) Der prozentuale Anteil von ZK+ Zellen wurde bestimmt und gemittelt für $n = 3$ dargestellt. 98 % der isolierten MZ exprimierten ZK, während dies nur bei 7 % der F der Fall war. 99 % der HaCat-Kontrolle und weniger als 1 % der BJ-Kontrolle exprimierten ZK. Die Daten sind als Mittelwert \pm SD angegeben. Die Grafik wurden nach Holl et al. (2021) [73] modifiziert.

3.1.6 Spektroskopischer Vergleich der molekularen Strukturen von primär isolierten und in situ Mesothelzellen

Um primär isolierte Mesothelzellen (MZ-Iso) auf molekularer Ebene zu charakterisieren und mit Mesothelzellen aus peritonealen Gewebeschnitten (MZ-In situ) zu vergleichen, wurde die kontaktlose und markerunabhängige Raman Mikrospektroskopie angewendet. Die isolierten Mesothelzellen und die Kryoschnitte des soliden Peritoneumgewebes wurden entsprechend vorbereitet und äquivalent analysiert. Die Raman Mikrospektroskopie ermöglichte als spektroskopisches Analyseverfahren eine morphologische und molekulare Gewebe- und Einzelzellanalyse zeitgleich und im selben Experiment [47, 76] und wurde im Folgenden verwendet, um die entwickelte Isolationsmethodik weiter zu untersuchen. Die Hauptkomponentenanalyse (TCA) erlaubte eine Identifizierung von Zellkernen (blau), Lipiden (gelb), Extrazellulärer Matrix der isolierten Mesothelzellen (EZM, grün) und EZM-ähnlichen Spektren in Gewebeschnitten (orange), basierend auf deren charakteristischen „Fingerprint“-Spektren (Abbildung 10 a, b).

Die erste TCA-Komponente repräsentierte DNA-Strukturen unter anderem durch Peaks bei 788 und 1095 cm^{-1} (O-P-O Gruppe [77, 78]) und wurde entsprechend den Nuklei zugeordnet. Rein morphologisch betrachtet zeigten die Nuklei (blau) der MZ-Iso ein größeres Erscheinungsbild im Vergleich zu den MZ-In situ (Abbildung 10 a). Die Gruppe der Lipide wurde als zweite TCA-Komponente identifiziert, über Peaks bei 1442, 1667, 1774 und 2852 cm^{-1} . Die Peaks repräsentierten unter anderem die $-\text{CH}_2$ Bindungen in Fettsäuren [79, 80], ungesättigte $\text{C}=\text{C}$ Bindungen [79, 80], Carbonylgruppen [81] und symmetrische $-\text{CH}_2$ Gruppen in Lipiden [82]. Die Lipid-Komponente war bei beiden Proben

konstant großflächig im Bereich um die Zellkerne verteilt. Rein morphologisch waren diesbezüglich keine Unterschiede zwischen den Analyten erkennbar. Die MZ-Iso zeigten eine dritte TCA-Komponente, die sich unter anderem durch charakteristische Peaks bei 929, 1005, 1567, und 2912 cm^{-1} als C-C Bindung in Aminosäuren (z.B. in Prolin und Valin [83], Phenylalanin [77], Amiden [84]), sowie die -CH Bindungen in Proteinen [84] auszeichnete. Ein Spektrum mit Peaks bei 818 [85], 1247 [85] und 1453 cm^{-1} [83] (u.a. Kollagen) deutete auf EZM-Komponenten der MZ-In situ hin.

Um die Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Mesothelzellen aus beiden Proben auf molekularer Ebene näher zu charakterisieren, wurde eine Principle Component Analysis (PCA) der einzelnen extrahierten Spektren der Nuklei und Lipide durchgeführt. Die PCA-Plots der Score values der Nuklei zeigten einen Trend zur Clusterbildung beider Proben, für alle PCs außer PC-3 (Abbildung 10 c). Der entsprechende Loadings-Plot für PC-3 (Abbildung 10 e) erlaubte die Diskussion des Trends zur Separierung, unter anderem durch Peaks bei 918, 1269 und 1680 cm^{-1} (MZ-Iso) oder 756, 1011 und 1124 cm^{-1} (MZ-In situ). Die Peaks wurden verschiedenen Strukturen der Nuklei zugeordnet. Beispielsweise wurde bei den MZ-Iso der verbreiterte Bereich bei 918 cm^{-1} Prolin [86] zugewiesen, während 1269 cm^{-1} und 1680 cm^{-1} mit Veränderungen in Amid III und Amid I Gruppen in Zusammenhang gebracht wurde [87, 88]. Bei den MZ-In situ wurde bei 756 cm^{-1} [89] ein höherer Tryptophan-Gehalt festgestellt. Die weiteren Peaks repräsentierten beispielsweise C-C Bindungen in Kohlenhydraten (1011 cm^{-1} [80]) und Lipiden (1124 cm^{-1} [78, 86]). Eine ausführliche Übersicht der Peak-Zuweisungen wurde in Anhang 1 (Peak-Zuweisung Isolation Mesothelzellen) hinzugefügt. Der Scores plot der Nuklei (Abbildung 10 g) zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Score values der MZ-Iso und MZ-In situ ($p < 0,05$, t-Tests der Mittelwerte).

Die PCA-Plots der Score values der Lipide zeigten ebenfalls einen Trend zur Clusterbildung beider Proben, außer für PC-2 (Abbildung 10 d). Der Trend zur Separierung zwischen den MZ-Iso und MZ-In situ durch PC-2 wurde durch die Analyse des Loadings-Plots weiter untersucht. Der Loadings-Plot für PC-2 (Abbildung 10 f) zeigte unter anderem Peaks bei 1296, 1445 und 1656 cm^{-1} (MZ-

Iso) und 1592, 1628 und 1683 cm^{-1} (MZ-In situ). Die Peaks repräsentierten Strukturen der intrazellulären Lipid-Komponenten. Es konnten C-C Schwingungen (1296 cm^{-1} [88]), $-\text{CH}_2$ Wipp- und Deformationsschwingungen, sowie C=C Streckschwingungen (1445, 1656 cm^{-1} [87, 90]) identifiziert werden (MZ-Iso). Die Peaks der MZ-In situ repräsentierten unter anderem C=C Schwingungen bei 1592 [91] und 1628 cm^{-1} [92], aber auch C=O Schwingungen (1683 cm^{-1}). Eine ausführliche Übersicht der Peak-Zuweisungen wurde in Anhang 1 (Peak-Zuweisung Isolation Mesothelzellen) hinzugefügt. Der dazugehörige Scores plot der Lipide (Abbildung 10 h) zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Score values der MZ-Iso und MZ-In situ ($p < 0,05$, t-Tests der Mittelwerte).

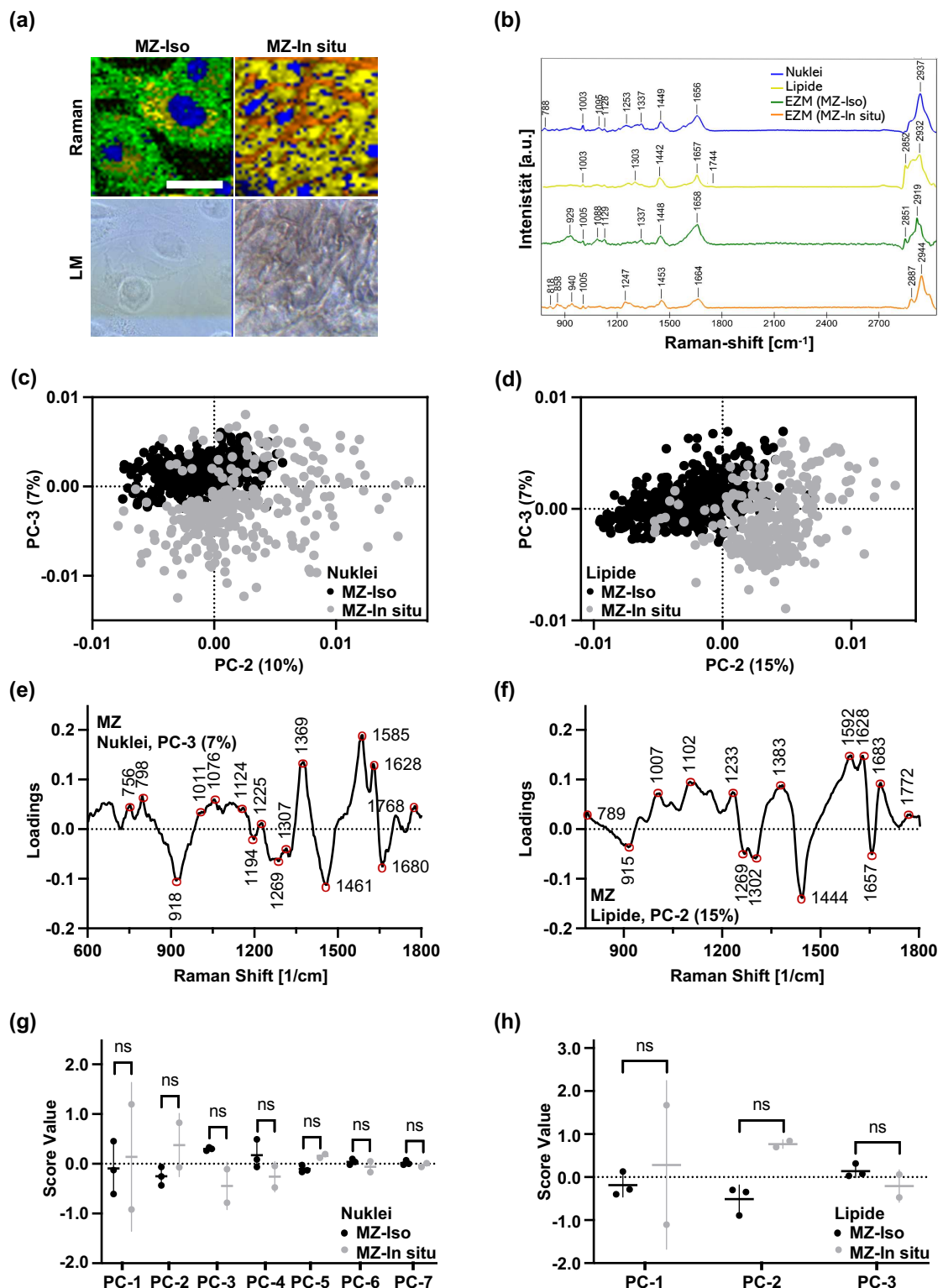


Abbildung 10: Molekulare Analyse primär isolierter Mesothelzellen im Vergleich zu Mesothelzellen in peritonealen Gewebeschnitten mittels Raman Mikrospektroskopie. Die primär isolierten Mesothelzellen (MZ-Iso) und Mesothelzellen in peritonealen Gewebeschnitten (MZ-In situ) wurden entsprechend vorbereitet und mit einem WITec Raman System analysiert. Um die Proben zu vergleichen, wurde eine mehrdimensionale Datenanalyse der folgenden Zellkomponenten durchgeführt: Zellkern (DNA), Lipide und Bestandteile der extrazellulären Matrix (EZM). (a) Dargestellt sind repräsentative Raman Messungen und lichtmikroskopische

Aufnahmen (LM) desselben Ausschnittes der MZ-Iso und MZ-In situ. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μm . (b) Es wurde ein charakteristisches „Fingerprint“-Spektrum der analysierten molekularen Zellkomponenten verwendet, um die Zellkerne (blau), Lipide (gelb) und Bestandteile der EZM (grün, orange) durch die TCA (True Component Analysis) zu identifizieren. (c) Der PCA (Principle Component analysis) Score-Plot (PC-2 versus PC-3) der extrahierten Zellkern-Spektren zeigte einen Trend zum Clustering für alle PCs, außer PC-3. (d) Der Score-Plot (PC-2 versus PC-3) der extrahierten Lipide zeigte ebenfalls einen Trend zum Clustering für alle PCs, außer PC-2. (e) Der Loadings-Plot (für PC-3) der Zellkern-spezifischen PCA zeigte Peaks, die den Trend zum Separierung aus (c) widerspiegelten. (f) Ebenso ermöglichte der Loadings-Plot für PC-2 der Lipid-spezifischen PCA einer Analyse der Peaks, die den Trend zur Separierung widerspiegelten. (g) Die Zellkern-spezifischen Score values für PC1 bis PC7 zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Werten der MZ-Iso und MZ-In situ. (h) Auch zeigten die Lipid-spezifischen Score values der PC-1 bis PC-3 keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen MZ-Iso und MZ-In situ. Die Daten wurden als Mittelwert \pm SD angegeben. Statistische Signifikanz definiert als * $p < 0,05$, ermittelt per t-Tests der Mittelwerte. Die Abbildung wurde nach Holl et al. (2021) [73] modifiziert.

Die spektroskopische Analyse der Nuklei, Lipide und Proteine von isolierten Mesothelzellen und Mesothelzellen aus peritonealen Gewebeschnitten zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Zellen. Die mittels Spülzytologie isolierten Mesothelzellen behielten die charakteristischen morphologischen und molekularen Eigenschaften bei.

Zusammenfassend wurde im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit erfolgreich eine neue innovative Methodik zur Isolation humaner peritonealer Mesothelzellen aus Spülzytologien etabliert. Die isolierten Mesothelzellen wurden durch verschiedene biomolekulare und spektroskopische Verfahren charakterisiert und eine suffiziente Reinheit der Population aufgezeigt.

Im zweiten Abschnitt sollten nun die verschiedenen Effekte einer PAM-Behandlung auf primär isolierte Fibroblasten und Mesothelzellen untersucht und anhand zahlreicher Methoden auf verschiedenen Ebenen analysiert werden.

3.2 PAM-Behandlung von Fibroblasten und Mesothelzellen

3.2.1 Dosisabhängige Effekte auf die Zellkonfluenz und Bestimmung des therapeutischen PAM-Dosisfensters

Eine PAM-Behandlung von peritonealen Fibroblasten und Mesothelzellen mit dem Ziel einer Prävention von postoperativen Adhäsionen, wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben. In folgenden Analysen wurden primär isolierte Fibroblasten und Mesothelzellen mit verschiedenen PAM-Verdünnungsstufen behandelt und deren zelluläre Auswirkungen durch biomolekulare und spektroskopische Verfahren dargestellt und zeitabhängig charakterisiert.

Zunächst wurde der Einfluss verschiedener Verdünnungsstufen zwischen 1:9 und unverdünntem PAM auf die zelluläre Konfluenz von peritonealen Fibroblasten und Mesothelzellen untersucht. Die Zellkonfluenz wurde lichtmikroskopisch bestimmt und über einen Zeitraum von 72 h überwacht. Um die Effekte der verschiedenen Verdünnungsstufen miteinander zu vergleichen, wurde die Konfluenz zu jedem Zeitpunkt auf den Ausgangswert ($t = 0$ h) der jeweiligen Verdünnung und Kontrolle (rel. Konfluenz) normiert.

Die in Abbildung 11 (a) logarithmisch dargestellte Dosis-Wirkungs-Kurve der Fibroblasten zeigte einen sigmoidalen Verlauf der zellulären Konfluenz, wobei sie sich der x-Achse als Asymptote annäherte. Je höher der PAM-Anteil der Verdünnung, desto geringer die Konfluenz der behandelten Zellen nach 72 h im Vergleich zur Kontrolle. Die Verdünnungsstufe 1:1 führte zu einer Annäherung der berechneten Kurve an die x-Achse. Höher verdünnte Dosierungen führten zu geringeren Effekten auf die Konfluenz. Ab einer Verdünnung von 1:9 zeigte die Kurve eine Annäherung an den Wert der unbehandelten Kontrolle (ctrl; $y = 1$, nicht dargestellt). Noch stärker verdünnte Dosierungen zeigten keine relevanten Effekte auf die Konfluenz der Zellen. Die Dosis-Wirkungs-Kurve wurde weiterverwendet, um eine Verdünnungsstufe mit der halb-maximalen Wirkung auf die Zellkonfluenz (IC_{50}) von Fibroblasten zu bestimmen. Der ermittelte IC_{50} -Wert (unterbrochene Linie) ergab eine Verdünnungsstufe zwischen 1:4 und 1:3.

Im nächsten Schritt wurde die zeitliche Dynamik der jeweiligen Verdünnungsstufen auf die Zellkonfluenz der Fibroblasten untersucht (Abbildung 11 b). Im Vergleich zur Kontrolle zeigten Fibroblasten bereits 4 h nach der PAM-Behandlung einen deutlichen dosisabhängigen Effekt. Die Konfluenz der mit unverdünntem PAM behandelten Zellen, unterschied sich bereits nach 4 h signifikant zur Kontrolle und den Verdünnungsstufen 1:9 bis 1:5 (ctrl: $p = 0,0086$, 1:9: $p = 0,0112$, 1:7: $p = 0,0091$, 1:5: $p = 0,0115$).

Eine deutliche Auftrennung der Verdünnungen in zwei Gruppen, wurde nach 24 h sichtbar. Während sich die Verdünnungsstufen 1:9 bis 1:5 nicht signifikant von der Kontrolle unterschieden (jeweils $p > 0,05$), reduzierte sich die Konfluenz nach einer Behandlung mit 1:2, 1:1 und PAM signifikant im Vergleich zur Kontrolle (1:2: $p = 0,0455$, 1:1 $p = 0,0007$, PAM: $p = 0,0002$). Die Werte nach einer Behandlung mit 1:1 und PAM unterschieden sich zudem signifikant von den Verdünnungen 1:9 bis 1:5 (jeweils $p < 0,05$).

Auch nach 72 h zeigten die Verdünnungen 1:9, 1:7 und 1:5 keine statistisch signifikanten Unterschiede verglichen mit der Kontrollbehandlung. Die Verdünnungen 1:2, 1:1 und PAM dagegen, führten zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Konfluenz im Vergleich zur Kontrolle (1:2: $p = 0,0337$, 1:1 $p = 0,0060$, PAM: $p = 0,0046$). Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte auch zwischen den Verdünnungsstufen 1:1 und PAM, im Vergleich zu den Verdünnungen 1:9 bis 1:5 gezeigt werden (jeweils $p < 0,05$).

Die Dosis-Wirkungs-Kurve der Mesothelzellen Abbildung 11 (c) zeigte ebenfalls den Trend eines sigmoidalen Verlaufs. Im Vergleich zu Fibroblasten zeigte sich eine Verlagerung der gesamten Kurve in Richtung höher konzentrierter Verdünnungsstufen. Die graphische Ermittlung der halb-maximalen PAM-Wirkung auf die Zellkonfluenz (IC_{50}) der Mesothelzellen, ergab eine Verdünnungsstufe zwischen 1:2 und 1:1.

Die mit verschiedenen PAM-Verdünnungsstufen behandelten Mesothelzellen konnten weder nach 4 h, noch nach 24 h einen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle aufweisen (jeweils $p > 0,05$, Abbildung 11 d). Nach 72 h zeigten die mit unverdünntem PAM behandelten Zellen einen

statistisch signifikanten Unterschied der zellulären Konfluenz im Vergleich zur Kontrolle und den Verdünnungsstufen 1:9 bis 1:2 (ctrl: $p < 0,0001$, 1:9: $p = 0,0002$, 1:7: $p = 0,0004$, 1:5: $p = 0,0011$, 1:2: $p = 0,0140$). Statistische Signifikanzen in Abbildung 11 (b) und (d) wurden durch eine zweifache Varianzanalyse (Two-way ANOVA, $p < 0,05$) ermittelt.

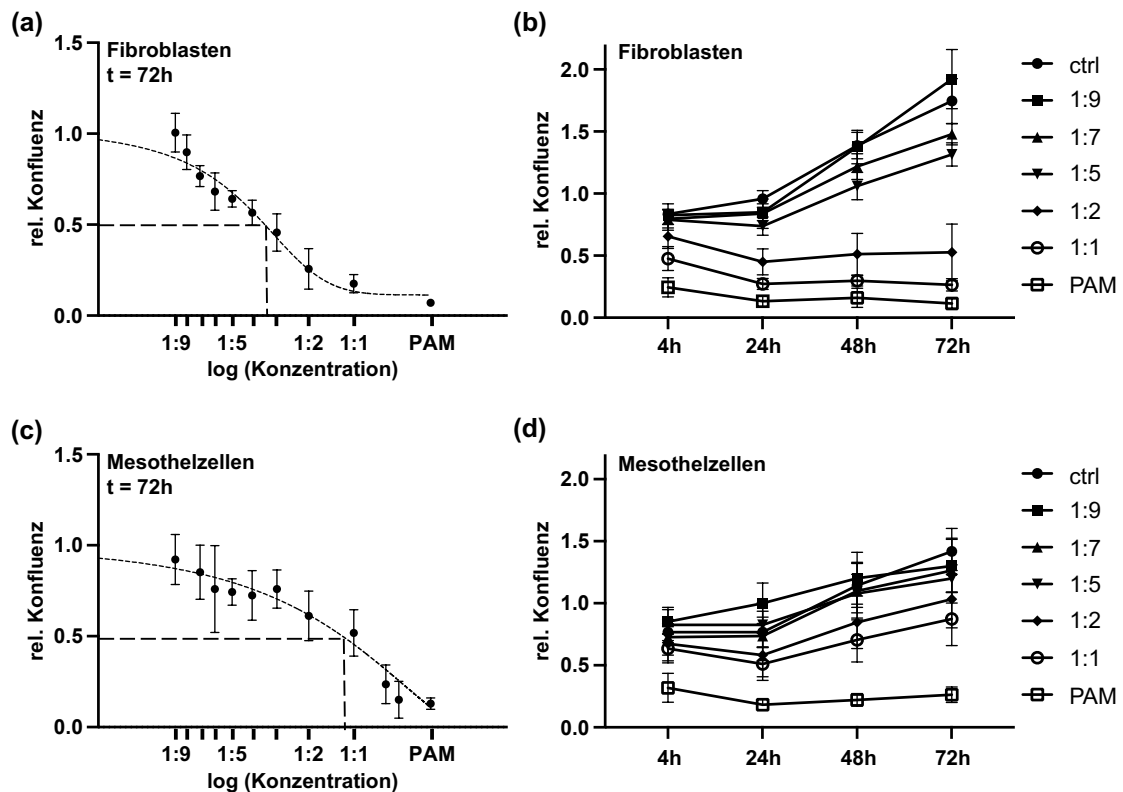


Abbildung 11: Dosisabhängige Zellkonfluenz nach PAM-Behandlung. Fibroblasten (F) und Mesothelzellen (MZ) wurden mit verschiedenen PAM-Verdünnungsstufen behandelt und die Konfluenz lichtmikroskopisch überwacht. Um die Verdünnung mit halb-maximaler Wirkung (IC₅₀-Wert) zu bestimmen, wurden die Werte normiert angegeben (rel. Konfluenz) und die dosisabhängige Zellkonfluenz dargestellt. (a) Logarithmische Darstellung der dosisabhängigen Effekte der PAM-Behandlung auf die Konfluenz der F zum Zeitpunkt t = 72 h. Der Verlauf der Dosis-Wirkungs-Kurve zeigte sich sigmoidal. Die IC₅₀ (gestrichelte Linie) lag bei den F zwischen 1:4 und 1:3. (b) Die dosisabhängigen PAM-Effekte auf F wurden im zeitlichen Verlauf dargestellt. Die Verdünnungen 1:2, 1:1 und PAM führten zu einer signifikanten Reduktion der Zellkonfluenz im Vergleich zur Kontrolle (ctrl). (c) Logarithmische Darstellung der dosisabhängigen Effekte einer PAM-Behandlung auf die Konfluenz der MZ zum Zeitpunkt t = 72 h. Der angedeutete sigmoidale Verlauf zeigte die IC₅₀ der MZ zwischen 1:2 und 1:1. (d) Die dosisabhängigen PAM-Effekte auf MZ zeigten im zeitlichen Verlauf durch unverdünntes PAM eine signifikante Reduktion der Konfluenz im Vergleich zur ctrl. Dargestellt wurden die Mittelwerte ($n \geq 3$) \pm SEM. Statistische Signifikanz definiert als $p < 0,05$, ermittelt per Two-way ANOVA. Teile der Grafik (a) und (c) wurden nach Holl et al. (2022) [75] modifiziert.

Mesothelzellen zeigten im Vergleich zu Fibroblasten eine grundsätzlich niedrigere Proliferation und Zunahme der Konfluenz in der Kontrolle. Eine PAM-Behandlung der Mesothelzellen mit unterschiedlichen Verdünnungsstufen bewirkte erst durch unverdünntes PAM einen signifikanten Einfluss. Die Konfluenz der Fibroblasten dagegen, wurde bereits ab einer Dosierung von 1:2 signifikant reduziert.

Um ein geeignetes therapeutisches Fenster für eine Behandlung mit einer selektiven PAM-Wirkung zu identifizieren, wurde die normierte Konfluenz beider Zelltypen nach 72 h gegenübergestellt. Eine optimale Verdünnungsstufe sollte eine Inhibition von Fibroblasten bewirken, während die Proliferation von Mesothelzellen möglichst nicht beeinflusst werden sollte. Die aus Abbildung 11 zum Zeitpunkt $t = 72$ h gewonnenen Informationen zellulärer Konfluenz, wurden jeweils zur Kontrolle normiert, um den Effekt der jeweiligen Verdünnungsstufe zwischen den beiden Zelltypen vergleichen zu können (Abbildung 12 a).

Eine Behandlung mit der Verdünnungsstufe 1:5 reduzierte die Konfluenz beider Zelltypen im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (F: 0,641-fach; MZ: 0,711-fach), ohne signifikanten Unterschied zwischen Fibroblasten und Mesothelzellen ($p > 0,05$). Die Verdünnungsstufen 1:2 und 1:1 reduzierten die Konfluenz beider Zelltypen (F: 1:2: 0,257-fach, 1:1: 0,176-fach; MZ: 1:2: 0,692-fach, 1:1: 0,518-fach), zeigten aber einen signifikant größeren Einfluss auf die Konfluenz von Fibroblasten im Vergleich zu Mesothelzellen (1:2: $p = 0,0363$, 1:1: $p = 0,0437$). Die Behandlung mit unverdünntem PAM führte grundsätzlich zu einer signifikanten Abnahme der Zellproliferation für beide Zelltypen (F: 0,071-fach; MZ: 0,156-fach), erlaubte aber keine Differenzierung oder signifikante Unterscheidung zwischen Fibroblasten und Mesothelzellen ($p = 0,0742$). Signifikante Unterschiede in Abbildung 12 (a) wurden durch ungepaarte t-Tests ($p < 0,05$) ermittelt.

Wie bereits in Abbildung 11 (d) gezeigt, führten die Verdünnungen 1:2 und 1:1 zu keiner signifikanten Reduktion der Konfluenz der Mesothelzellen. Im Gegensatz dazu, konnte bei Fibroblasten (Abbildung 11 b) eine signifikante Abnahme der Konfluenz im Vergleich zur Kontrolle gezeigt werden. Beide

Verdünnungsstufen zeigten im direkten Vergleich in Abbildung 12 (a) einen größeren Einfluss auf Fibroblasten. Um den hemmenden Einfluss der PAM-Behandlung auf Mesothelzellen möglichst gering zu halten, wurde das therapeutische Fenster bei der Verdünnungsstufe 1:2 angesetzt.

Zudem wurde die Morphologie der beiden Zelltypen durch lichtmikroskopische Aufnahmen 72 h nach der PAM-Behandlung untersucht (Abbildung 12 b). Fibroblasten zeigten bei den verwendeten PAM-Verdünnungen von 1:5, 1:2 und 1:1 eine dosisabhängig reduzierte Konfluenz im Vergleich zur Kontrolle. Nach einer Behandlung mit unverdünntem PAM konnte nach 72 h die typische Morphologie von Fibroblasten, aufgrund von apoptotischen Prozessen wie Adhärenzverlust, Pyknose und Fragmentierung nicht mehr beobachtet werden. Mesothelzellen zeigten nach einer Behandlung mit den PAM-Verdünnungen 1:5 und 1:2 lichtmikroskopisch keine Veränderung der Zellmorphologie oder -konfluenz nach 72 h im Vergleich zur Kontrolle. Ab einer Verdünnung von 1:1 wurde zunächst eine Reduktion der Zellkonfluenz lichtmikroskopisch beobachtet. Nach einer Behandlung mit unverdünntem PAM verloren auch Mesothelzellen ihren typischen morphologischen Phänotyp, infolge von apoptotischen Zellveränderungen.

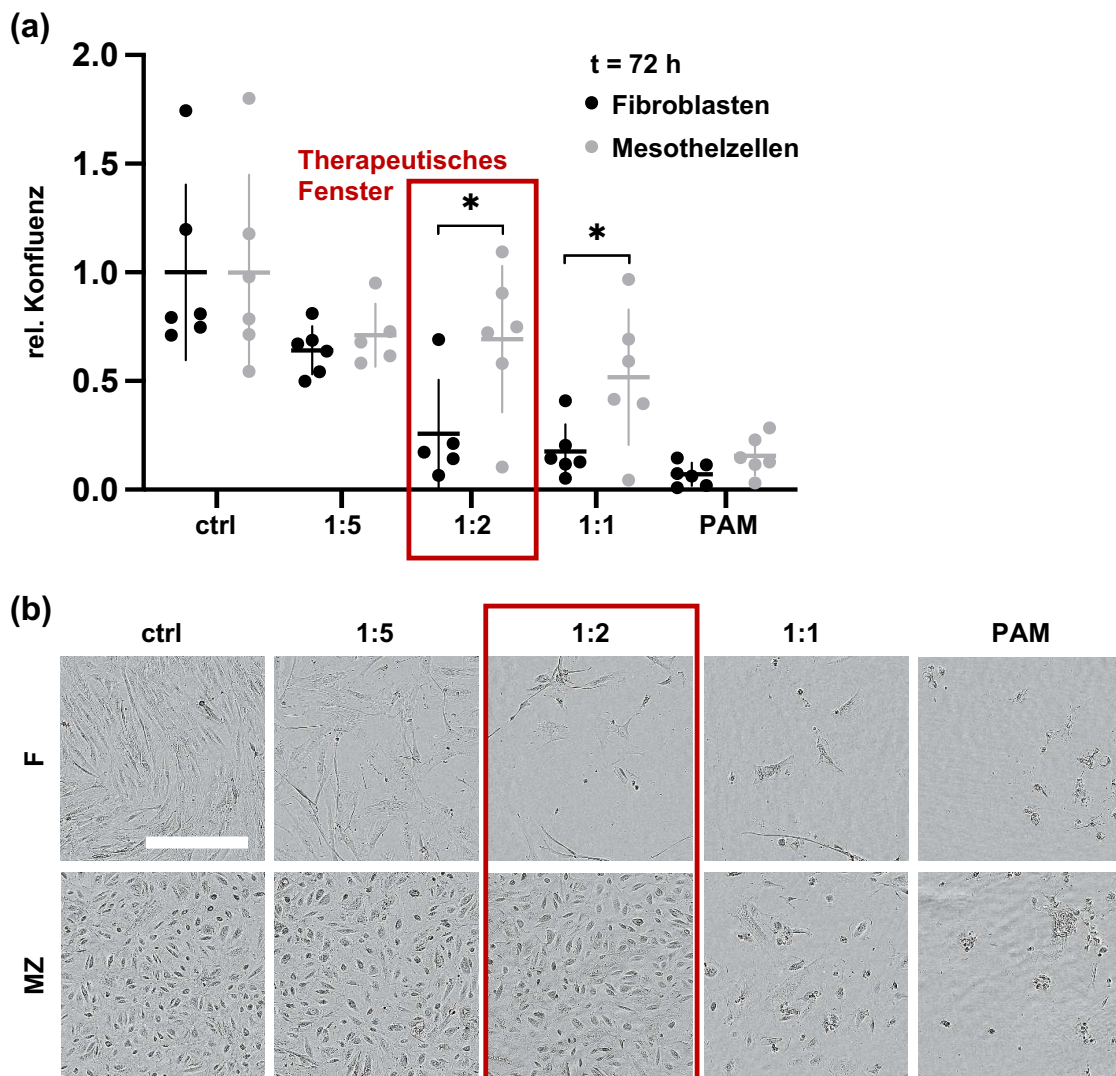


Abbildung 12: Bestimmung des therapeutischen PAM-Dosisfensters. Fibroblasten (F) und Mesothelzellen (MZ) wurden mit verschiedenen PAM-Verdünnungsstufen behandelt und die Konfluenz lichtmikroskopisch überwacht. Die Werte wurden nach 72 h normiert (rel. Konfluenz) und interzellulär verglichen. (a) Die mit 1:2 und 1:1 behandelten F zeigten einen signifikanten Unterschied zu MZ. (b) Die lichtmikroskopische Analyse zeigte die verschiedene starke Reduktion der Zellkonfluenz durch unterschiedliche Verdünnungsstufen nach 72 h. Durch eine Behandlung mit 1:2 wurde die Konfluenz von F deutlich reduziert, während sich 1:2-behandelte MZ nur minimal von der ctrl unterschieden. Der Maßstabsbalken entspricht 400 μ m. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD, $n = 6$. Signifikante Unterschiede ($*p < 0,05$) wurden mittels ungepaarten t-Tests bestimmt. Grafik (a) und Teile der Grafik (b) wurden nach Holl et al. (2022) [75] modifiziert.

Zusammenfassend wurde durch die Analyse der Konfluenz und Proliferationsaktivität die Verdünnungsstufe 1:2 als mögliches therapeutisches Fenster für eine PAM-Behandlung identifiziert. Eine Behandlung mit dieser Dosierung führte bei peritonealen Fibroblasten zu einer signifikanten Abnahme

der Konfluenz, während Mesothelzellen keine relevanten Unterschiede bezüglich Konfluenz oder Morphologie im Vergleich zur Kontrolle aufwiesen.

3.2.2 Dosisabhängiges Zellwachstum und morphologische Effekte im zeitlichen Verlauf

Im nächsten Schritt wurde das zuvor identifizierte therapeutische Fenster mit der PAM-Dosierung 1:2 zeitaufgelöst untersucht. Beide Zelltypen wurden mit 1:2-verdünntem PAM behandelt und deren morphologische Veränderungen über einen Zeitraum von 72 h mit der Kontrolle verglichen. Zum Zeitpunkt $t = 0$ h wiesen beide Gruppen der Fibroblasten ein charakteristisches spindelförmiges Erscheinungsbild, mit typisch verzweigten Zellfortsätzen auf (Abbildung 13 a). 4 h nach der PAM-Behandlung unterschieden sich die Fibroblasten bereits von der Kontrolle. Es zeigte sich ein Zurückbilden der Zellausläufer, während sich die Kontrolle unverändert zur Ausgangsmorphologie verhielt. Zum Zeitpunkt $t = 24$ h war neben einer verschieden ausgeprägten Konfluenz, auch eine deutlich unterschiedliche Morphologie der beiden Gruppen sichtbar. Die behandelten Zellen zeigten im Unterschied zum typischen multipolaren Phänotyp der Kontrollzellen eine bipolare Morphologie. Nach 72 h konnte bei den behandelten Fibroblasten eine deutlich reduzierte Konfluenz, sowie eine bipolare Verzerrung, Adhärenzverlust und Fragmentierung beobachtet werden.

Lichtmikroskopisch konnte für keinen Untersuchungszeitpunkt ein wesentlicher morphologischer Unterschied oder eine Differenz der Zellkonfluenz zwischen 1:2-behandelten Mesothelzellen und der Kontrolle gezeigt werden (Abbildung 13 b).

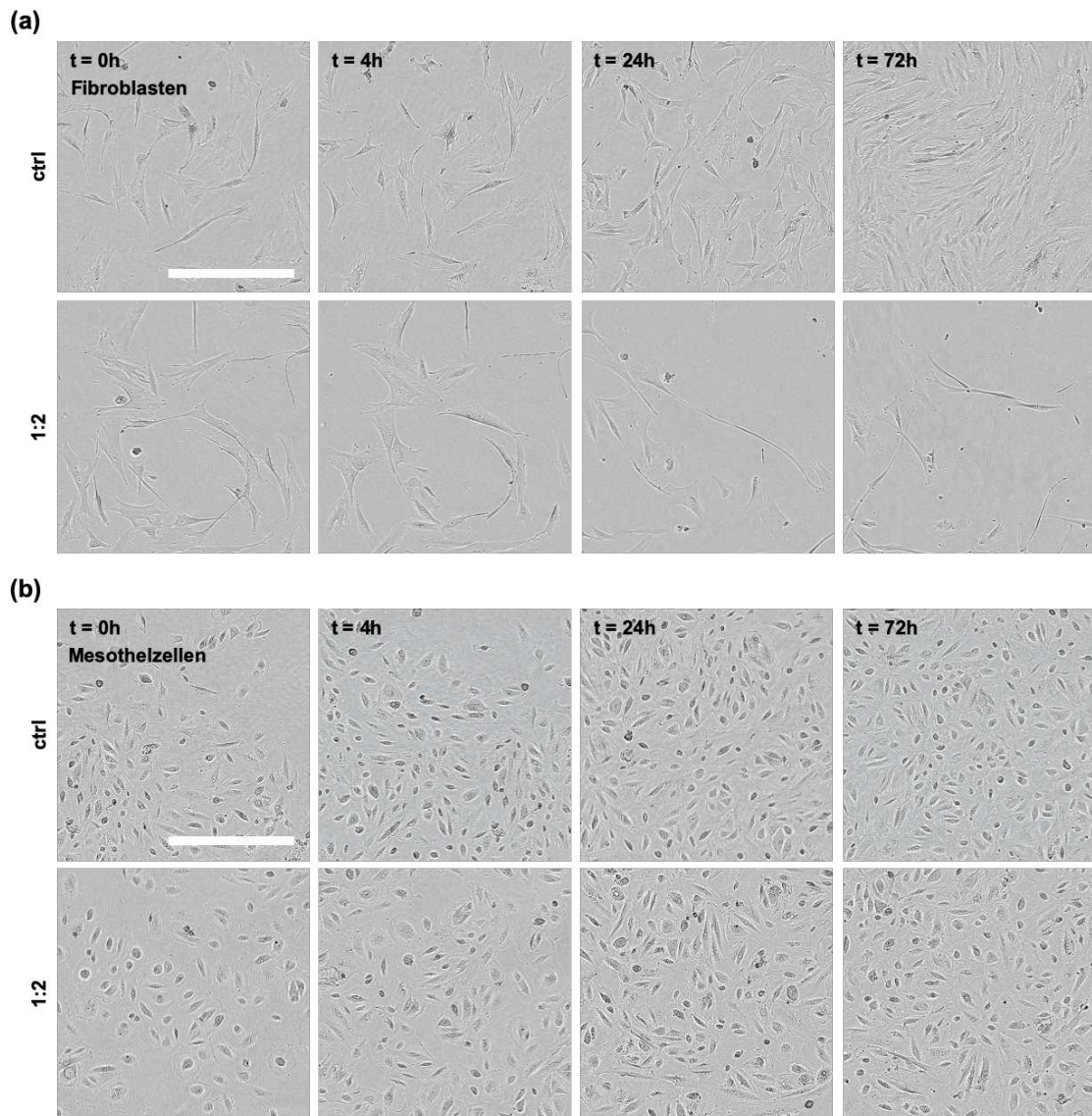


Abbildung 13: PAM-abhängiges Zellwachstum und morphologische Veränderungen im zeitlichen Verlauf. Repräsentative Hellfeld-Mikroskopie von Fibroblasten (F) und Mesothelzellen (MZ) im zeitlichen Verlauf nach einer Behandlung mit 1:2. (a) F zeigten im Vergleich zur ctrl eine verminderte Zellkonfluenz und Zeichen von Schrumpfung, bipolarer Verzerrung und Abkugelung ab t = 4 h. (b) Mit 1:2 behandelte MZ unterschieden sich morphologisch zu keinem Kulturzeitpunkt von der ctrl. Die Maßstabsbalken stellen 400 µm dar.

3.2.3 Dosisabhängige Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen

Im nächsten Abschnitt wurden die dosisabhängigen Effekte der PAM-Behandlung auf die Integrität der nukleären DNA untersucht. Hierfür wurden PAM-behandelte Fibroblasten und Mesothelzellen zum Nachweis von DNA-

Doppelstrangbrüchen mit spezifischen Anti-H2A.X Antikörpern gefärbt, mittels Durchflusszytometrie analysiert und normiert (Fold change) in Abbildung 14 dargestellt.

Eine Behandlung von Fibroblasten (Abbildung 14 a) mit der Verdünnung 1:5 führte nach 1 h und 24 h zu einem erhöhten, aber statistisch nicht signifikant gesteigerten Signal im Vergleich zur Kontrolle (1 h: 1,26-fach, $p = 0,0643$; 24 h: 1,15-fach, $p = 0,0563$). 1:2-verdünntes PAM führte zu jedem der gemessenen Zeitpunkte zu einem statistisch signifikant erhöhten Signal (1 h: 1,64-fach, $p = 0,0302$; 4 h: 1,33-fach, $p = 0,0011$; 24 h = 1,51-fach, $p = 0,0072$). Auch eine Behandlung mit 1:1 führte nach 1 h und 4 h zu einem statistisch signifikant gesteigerten Signal (1 h: 1,85-fach, $p = 0,0373$; 4 h: 1,43-fach, $p = 0,0173$). Nach 24 h konnte ein erhöhtes aber statistisch nicht signifikant gesteigertes Signal gemessen werden (24 h: 1,63-fach, $p = 0,0554$). Eine Behandlung von Mesothelzellen mit den Verdünnungen 1:5, 1:2 und 1:1 führte zu keinem der analysierten Zeitpunkte zu einem relevant erhöhten H2A.X-Signal. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mittels ungepaarten t-Tests ($p < 0,05$) bestimmt.

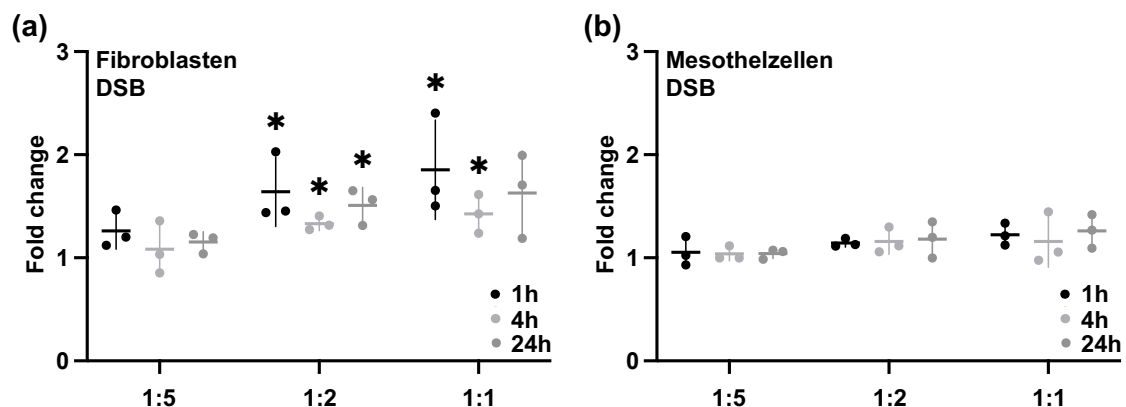


Abbildung 14: Dosisabhängige Induktion von Doppelstrangbrüchen. Fibroblasten (F) und Mesothelzellen (MZ) wurden mit verschiedenen PAM-Dosierungen behandelt, gegen H2A.X zur Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) gefärbt, mittels Durchflusszytometrie analysiert ($t = 1\text{ h}, 4\text{ h}$ und 24 h) und normiert (Fold change) dargestellt. (a) Die Dosierungen 1:2 und 1:1 führten zu statistisch signifikant erhöhten Signalen der behandelten F. (b) MZ zeigten keine relevante Erhöhung der Werte. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD, $n = 3$. Signifikante Unterschiede ($*p < 0,05$) wurden mittels ungepaarten t-Tests bestimmt. Teile der Abbildung wurden nach Holl et al. (2022) [75] modifiziert.

3.2.4 Dosisabhängiger Einfluss auf die Zellzyklusregulation

Der Einfluss der PAM-Behandlung auf Ebene der Zellzyklusphasen wurde im nächsten Schritt weiter untersucht. Fibroblasten und Mesothelzellen wurden nach einer PAM-Behandlung mit Propidium-Iodid (PI, DNA-interkalierender Farbstoff) gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die ermittelten Werte der jeweiligen Zellzyklusphasen wurden in Abbildung 15 nach 4 h, 24 h und 72 h absolut gegenübergestellt.

4 h nach der PAM-Behandlung zeigte sich bei Fibroblasten grundsätzlich kein statistisch signifikanter Unterschied der Zellzyklusphasen im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 15 a). Zum Zeitpunkt $t = 24$ h konnte eine dosisabhängige Zunahme der G2/M-Phase, sowie eine dosisabhängige Abnahme der S-Phase der Fibroblasten beobachtet werden (Abbildung 15 b). Bei den mit 1:2 behandelten Fibroblasten konnte eine statistisch signifikante Zunahme der G2/M-Phase gemessen werden ($p = 0,0243$). Zudem zeigte sich ein erniedrigter Wert der S-Phase ($p = 0,1705$). Eine Behandlung mit 1:1-verdünntem PAM führte zu einem erhöhten, aber statistisch nicht signifikant gesteigertem Wert der G2/M-Phase ($p = 0,0988$), sowie zu einer Abnahme des Signals der S-Phase ($p = 0,158$). 72 h nach der PAM-Behandlung verdeutlichten sich die dosisabhängigen Effekte auf Fibroblasten (Abbildung 15 c). Eine Behandlung mit 1:5-verdünntem PAM führte zu keinen relevanten Unterschieden im Vergleich zur Kontrolle. Die mit 1:2 und 1:1 behandelten Fibroblasten zeigten jeweils eine statistisch signifikante Zunahme der G2/M-Phase und Abnahme der G0/G1-Phase im Vergleich zur Kontrolle (1:2: G2/M-Phase: $p < 0,0001$, G0/G1-Phase: $p < 0,0001$; 1:1: G2/M-Phase: $p < 0,0001$, G0/G1-Phase: $p < 0,0001$).

Eine Behandlung von Mesothelzellen zeigte nach 4 h keinen relevanten Unterschied im Vergleich zu Kontrolle (Abbildung 15 d). 24 h nach einer Behandlung mit 1:2 (Abbildung 15 e) konnte ein erhöhtes, aber statistisch nicht signifikant gesteigertes Signal der G2/M-Phase und eine statistisch signifikante Zunahme der G0/G1-Phase beobachtet werden (G2/M-Phase: $p = 0,0706$, G0/G1-Phase: $p = 0,0022$). Eine Behandlung mit 1:1 führte zu einer statistisch signifikanten Zunahme der G2/M- und G0/G1-Phase (G2/M-Phase: $p = 0,0174$,

G0/G1-Phase: $p = 0,0002$). Zum Zeitpunkt $t = 72$ h konnte kein relevanter Unterschied zwischen den behandelten Mesothelzellen und der Kontrolle beobachtet werden (Abbildung 15 f).

Signifikante Unterschiede wurden durch eine zweifache Varianzanalyse (Two-way ANOVA, $p < 0,05$) ermittelt. Die einzelnen absoluten Werte der Zellzyklusanalysen von behandelten Fibroblasten und Mesothelzellen wurden im Anhang 2 und 3 aufgelistet (Anhang 2: Zellzyklusanalyse Fibroblasten, Anhang 3: Zellzyklusanalyse Mesothelzellen).

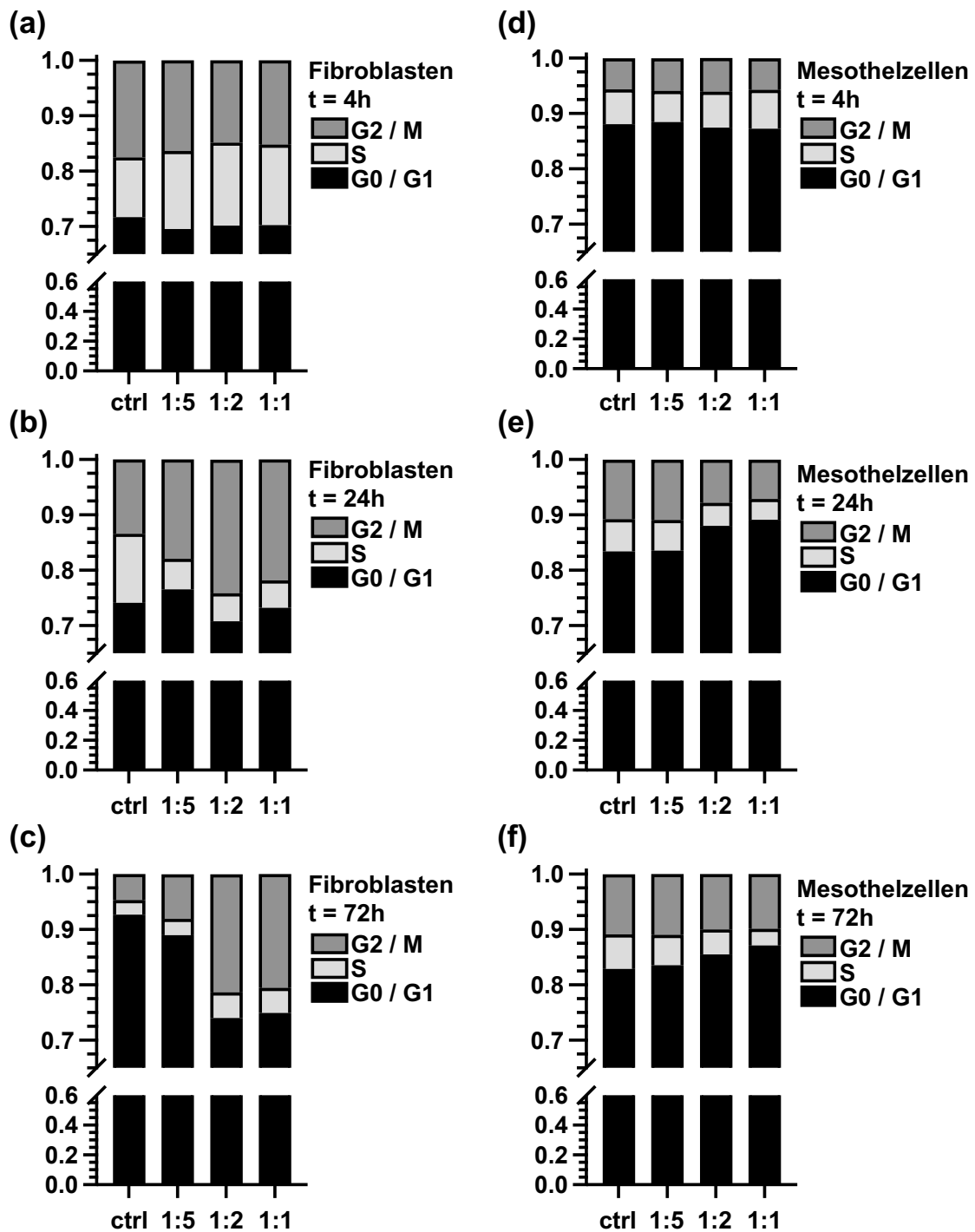


Abbildung 15: Dosisabhängiger absoluter Einfluss der PAM-Behandlung auf die Zellzyklusregulation. Fibroblasten (F) und Mesothelzellen (MZ) wurden mit PAM-Dosierungen behandelt, mit PI gefärbt und die mittels Durchflusszytometrie bestimmten Werte absolut angegeben. (a) Nach 4 h zeigten F keinen signifikanten Unterschied der Zellzyklusphasen. (b) 24 h nach PAM-Behandlung konnte eine Zunahme der G2/M-Phase bei den Verdünnungen 1:2 (signifikant) und 1:1 (nicht signifikant) im Vergleich zur ctrl beobachtet werden. (c) Zum Zeitpunkt t = 72 h zeigte sich im Vergleich zur ctrl eine signifikante Abnahme der G0/G1-Phase und Zunahme der G2/M-Phase (1:2 und 1:1). (d) PAM-behandelte MZ zeigten nach 4 h keinen relevanten Unterschied. (e) Nach 24 h konnte eine Zunahme der G0/G1-Phase der behandelten MZ (1:2 und 1:1) beobachtet werden. Zudem zeigte sich eine signifikante Abnahme der G2/M-

Phase der mit 1:1 behandelten Zellen. (f) Nach 72 h konnten keine relevanten Unterschiede der MZ beobachtet werden. Dargestellt sind Mittelwerte, $n = 3$. Statistische Signifikanz definiert als $p < 0,05$, ermittelt per Two-way ANOVA. Teile der Abbildung (c) und (f) wurden nach Holl et al. (2022) [75] modifiziert.

Die Ergebnisse der Zellzyklusanalysen wurden zur besseren Darstellung der relativen Veränderungen in Abbildung 16 normiert angegeben (Fold change). Zum Zeitpunkt $t = 4$ h (Abbildung 16 a) konnten erhöhte aber statistisch nicht signifikante Werte der S-Phase der behandelten Fibroblasten gezeigt werden (1:5: 1,31-fach, $p = 0,2105$; 1:2: 1,39-fach, $p = 0,0766$; 1:1: 1,34-fach, $p = 0,1347$). Die weiteren Werte zeigten keine relevanten relativen Unterschiede. Nach 24 h konnte eine dosisabhängige Abnahme der S-Phase, sowie eine dosisabhängige Zunahme der G2/M-Phase beobachtet werden (Abbildung 16 b). Die mit 1:5, 1:2 und 1:1 behandelten Fibroblasten zeigten eine statistisch signifikante Abnahme der S-Phase, abhängig vom PAM-Anteil der Behandlung (1:5: 0,44-fach, $p = 0,0431$; 1:2: 0,41-fach, $p = 0,0294$; 1:1: 0,39-fach, $p = 0,0257$). Außerdem wurde eine statistisch signifikante Zunahme der G2/M-Phase der mit 1:2 und 1:1 behandelten Fibroblasten deutlich (1:2: 1,80-fach, $p = 0,0025$; 1:1: 1,63-fach, $p = 0,0198$). Nach 72 h (Abbildung 16 c) konnte eine weitere statistisch signifikante Zunahme der G2/M-Phase der mit 1:2 und 1:1 behandelten Fibroblasten im Vergleich zur Kontrolle gezeigt werden (1:2: 4,55-fach, $p < 0,0001$; 1:1: 4,38-fach, $p < 0,0001$).

Eine Behandlung von Mesothelzellen führte nach 4 h zu keinen relevanten relativen Änderungen der Zellzyklusphasen im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 16 d). Zum Zeitpunkt $t = 24$ h (Abbildung 16 e) konnte ein statistisch signifikant reduzierter Wert der S- und G2/M-Phase, der mit 1:1 behandelten Mesothelzellen beobachtet werden (S-Phase: 0,64-fach, $p = 0,0274$; G2/M-Phase: 0,67-fach, $p = 0,0389$). 72 h nach der PAM-Behandlung zeigte sich eine statistisch signifikante Abnahme der S-Phase (Abbildung 16 f), der mit 1:1 behandelten Mesothelzellen (S-Phase: 0,48-fach, $p = 0,0056$). Signifikante Unterschiede wurden durch eine zweifache Varianzanalyse (Two-way ANOVA, $p < 0,05$) ermittelt.

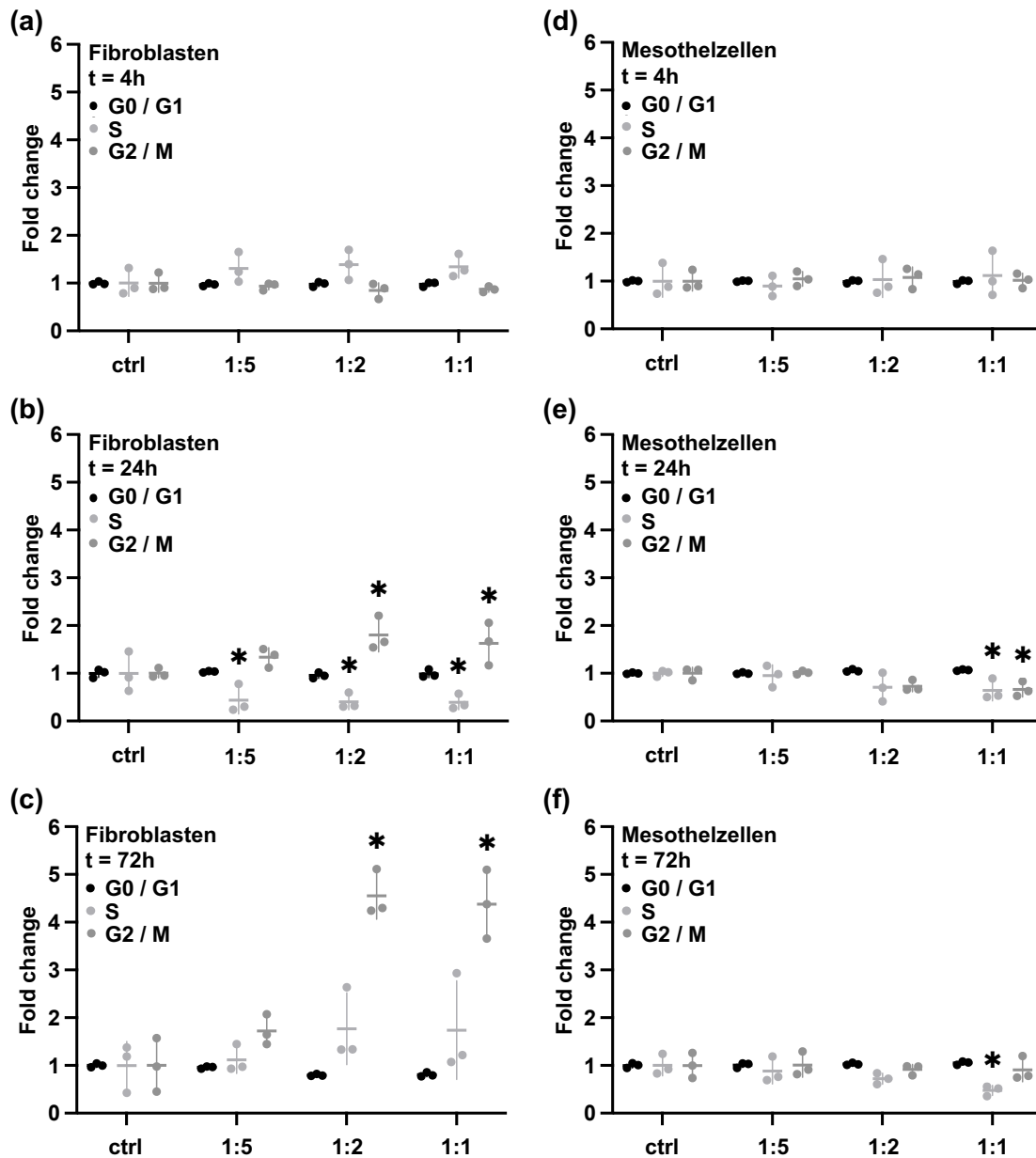


Abbildung 16: Dosisabhängiger relativer Einfluss von PAM auf die Zellzyklusregulation. Die Werte der Zellzyklusphasen wurde normiert (Fold change) dargestellt. (a) Zum Zeitpunkt $t = 4$ h zeigten Fibroblasten (F) keine statistisch signifikanten Veränderungen der Zellzyklusphasen. (b) Nach 24 h konnte bei den mit 1:2 und 1:1 behandelten F eine statistisch signifikante Zunahme der G2/M-Phase, sowie eine signifikante Abnahme der S-Phase gemessen werden. (c) Nach 72 h zeigte sich bei den mit 1:2 und 1:1 behandelten F eine deutlich signifikante Zunahme der G2/M-Phase. (d) Die behandelten Mesothelzellen (MZ) zeigten nach 4 h keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle. (e) Nach 24 h konnte eine signifikante Abnahme der S- und G2/M-Phase der mit 1:1 behandelten MZ beobachtet werden. (f) Die Behandlung von MZ mit 1:1-verdünntem PAM führte nach 72 h zu einer statistisch signifikanten Reduktion der S-Phase. Signifikante Unterschiede ($*p < 0,05$) wurden mittels Two-way ANOVA bestimmt. Teile der Abbildung (c) und (f) wurden nach Holl et al. (2022) [75] modifiziert.

Die Analyse der Zellzyklusphasen nach einer Behandlung mit PAM zeigte statistisch signifikante absolute und relative Veränderungen in Fibroblasten, während sich behandelte Mesothelzellen nur unwesentlich von der Kontrolle unterschieden. Die Untersuchung deutete auf eine selektive plasmaspezifische Wirkung der Behandlung auf Fibroblasten hin.

3.2.5 Dosisabhängige Induktion von Apoptose

Der Einfluss einer PAM-Behandlung auf zellulärer Ebene wurde im nächsten Schritt weiter hinsichtlich einer Apoptoseinduktion untersucht. Mittels Lumineszenz- und IF-Färbungen von Annexin V und Caspase 3/7 wurden Apoptoseprozesse von behandelten Fibroblasten und Mesothelzellen in Echtzeit analysiert und normiert dargestellt.

Der frühe Apoptosemarker Annexin V zeigte bei behandelten Fibroblasten nach 4 h und 24 h einen dosisabhängigen Effekt (Abbildung 17 a). Die Verdünnungsstufen 1:2 und 1:1 führten zu einem erhöhten aber statistisch nicht signifikant gesteigerten Signal des Apoptose Assays (1:2: 4 h: 1,23-fach, $p = 0,6600$, 24 h: 1,66-fach, $p = 0,0920$; 1:1: 4 h: 1,96-fach, $p = 0,0982$, 24 h: 1,89-fach, $p = 0,0602$). Im Vergleich dazu konnte bei den behandelten Mesothelzellen keine relevante Änderung des Annexin V-Signals beobachtet werden (Abbildung 17 b).

Der späte Apoptosemarker Caspase 3/7 zeigte nach 72 h (Abbildung 17 c) eine Zunahme des Signals der mit 1:5 (statistisch signifikant) und 1:2 behandelten Fibroblasten (1:5: 1,85-fach, $p = 0,0046$; 1:2: 1,65-fach, $p = 0,1196$). Die behandelten Mesothelzellen zeigten zu keinem Zeitpunkt ein signifikant gesteigertes Caspase 3/7-Signal im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 17 d). Statistisch signifikante Unterschiede wurden mittels ungepaarten t-Tests ($p < 0,05$) bestimmt.

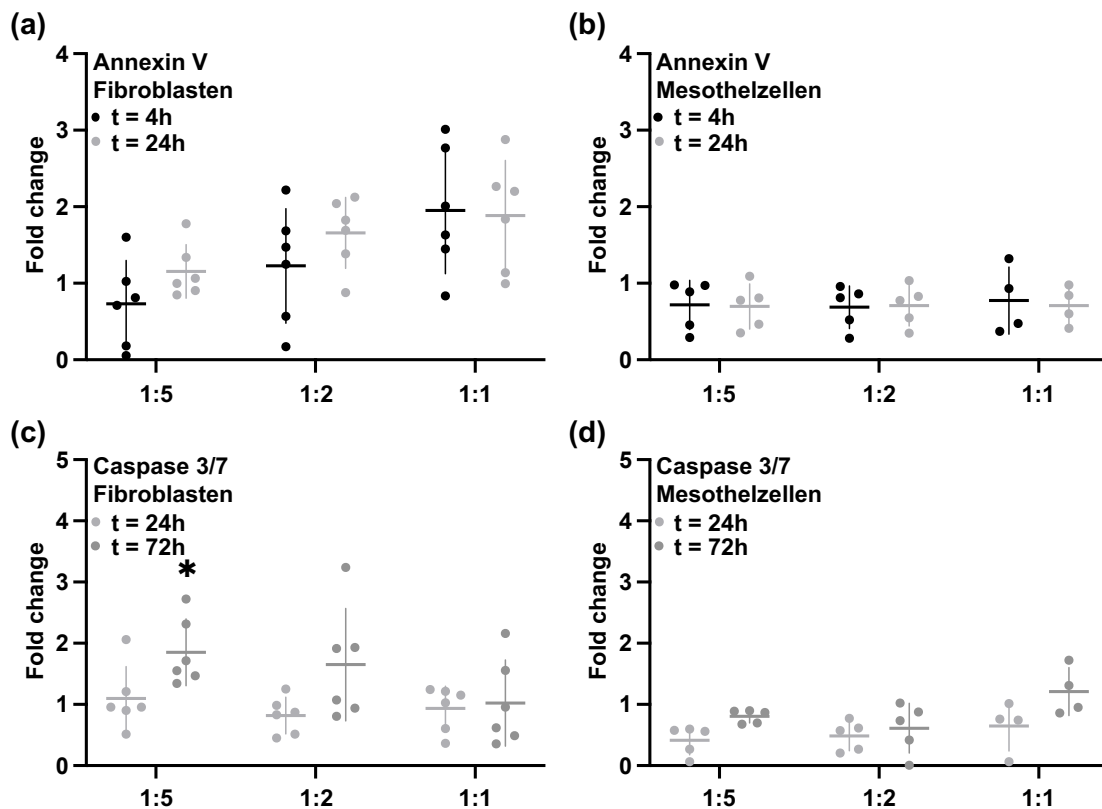


Abbildung 17: Dosisabhängige Induktion von Apoptose nach PAM-Behandlung. Fibroblasten (F) und Mesothelzellen (MZ) wurden mit verschiedenen Verdünnungsstufen behandelt und das Lumineszenz- bzw. IF-Signal von Annexin V und Caspase 3/7 verwendet, um Apoptosevorgänge zu detektieren. (a) F zeigten eine dosisabhängige Zunahme des Annexin V-Signals. (b) MZ zeigten keine Änderung des Annexin V-Signals. (c) F zeigten nach 72 h eine dosisabhängige Zunahme des Caspase 3/7-Signals. (d) Die behandelten MZ zeigten keine relevanten Änderungen des Caspase 3/7-Signals. Dargestellt wurden Einzelwerte, Mittelwerte \pm SEM, aus $n = 5$ und 6 . Signifikanzen wurden mittels ungepaarten t-Tests ermittelt (* $p < 0,05$). Teile der Abbildungen (a) - (d) wurden nach Holl et al. (2022) [75] modifiziert.

3.2.6 Dosisabhängige Induktion von Nekrose

Neben den Apoptoseprozessen wurde anschließend der Einfluss der PAM-Behandlung auf nekrotische zelluläre Vorgänge analysiert. Fibroblasten und Mesothelzellen wurden mit verschiedenen PAM-Verdünnungen behandelt, das Signal des Nekrose Assays in Echtzeit detektiert und normiert in Abbildung 18 dargestellt.

Zum Zeitpunkt $t = 4$ h konnte eine dosisabhängige Zunahme des Nekrosesignals der behandelten Fibroblasten gezeigt werden (Abbildung 18 a). Eine Behandlung

mit 1:2-verdünntem PAM führte zu einem gesteigerten, aber nicht signifikant erhöhten Signal (1:2: 2,01-fach, $p = 0,0503$). Die Verdünnungsstufe 1:1 zeigte bereits nach 4 h ein statistisch signifikant erhöhtes Signal im Vergleich zur Kontrolle (1:1: 2,53-fach, $p = 0,0186$). 24 h nach der PAM-Behandlung konnte durch die Verdünnung 1:2 ein gesteigertes, aber statistisch nicht signifikant erhöhtes Signal detektiert werden (1:2: 2,87-fach, $p = 0,0611$). Durch die Dosierung 1:1 dagegen konnte ein statistisch signifikant gesteigerter Wert im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (1:1: 6,67-fach, $p = 0,0065$). Zum Zeitpunkt $t = 72$ h führten die Verdünnungen 1:2 und 1:1 zu einer statistisch signifikanten Zunahme des Signals (1:2: 4,15-fach, $p = 0,0485$; 1:1: 6,39-fach, $p = 0,0082$). Die Behandlung der Fibroblasten mit der Verdünnungsstufe 1:5 zeigte zu keinem der gemessenen Zeitpunkte eine relevante Änderung der Werte im Vergleich zur Kontrolle. Die mit verschiedenen PAM-Verdünnungen behandelten Mesothelzellen zeigten zu keinem der analysierten Zeitpunkte eine relevante Zunahme des Nekrosesignals (Abbildung 18 b). Statistisch signifikante Unterschiede wurden mittels ungepaarten t-Tests ($p < 0,05$) bestimmt.

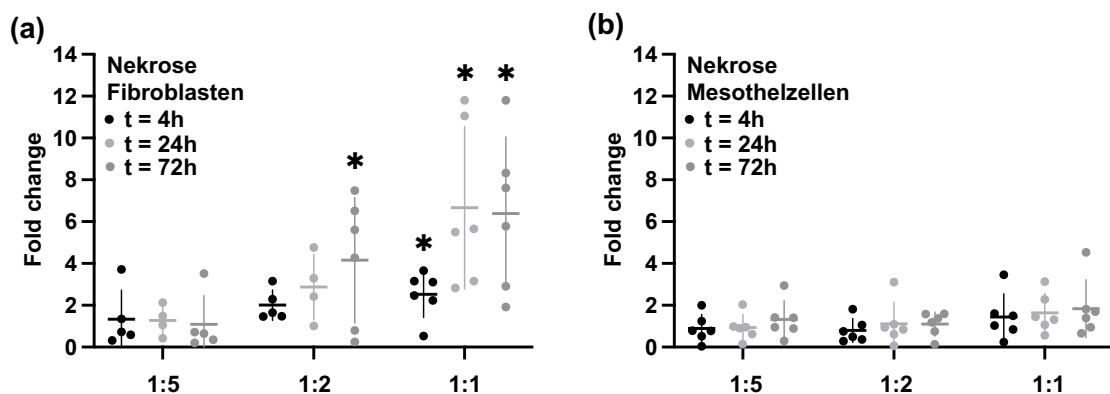


Abbildung 18: Dosisabhängige Induktion von Nekrose nach PAM-Behandlung. Fibroblasten (F) und Mesothelzellen (MZ) wurden mit verschiedenen PAM-Dosierungen behandelt und das Fluoreszenz-Signal normiert (Fold change) dargestellt. (a) F zeigten eine statistisch signifikante dosisabhängige Zunahme des Nekrose-Signals. (b) MZ zeigten keine relevanten Änderungen des Nekrose-Signals. Dargestellt wurden Einzelwerte, Mittelwerte \pm SEM aus $n = 6$. Signifikanzen wurden mittels ungepaarten t-Tests ermittelt ($p < 0,05$). Teile der Abbildung (a) und (b) wurden nach Holl et al. (2022) [75] modifiziert.

3.2.7 Dosisabhängige Reduktion der zellulären Viabilität

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der PAM-Behandlung auf die zelluläre Viabilität untersucht. Die Zellen wurden mit verschiedenen Verdünnungsstufen behandelt, die Signale des verwendeten Lumineszenz Assays detektiert und normiert in Abbildung 19 dargestellt.

Die behandelten Fibroblasten zeigten nach 4 h einen dosisabhängigen Effekt (Abbildung 19 a). Eine Behandlung mit 1:1 verdünntem PAM führte zu einem reduzierten Signal im Vergleich zur Kontrolle und den anderen Verdünnungsstufen (0,65-fach, $p = 0,2776$). Nach 24 h konnte ein erniedrigter, aber statistisch nicht signifikant reduzierter Wert der mit 1:2 behandelten Fibroblasten beobachtet werden (0,68-fach, $p = 0,3926$). Eine Behandlung mit der Dosierung 1:1 zeigte eine statistisch signifikante Reduktion des Signals (0,078-fach, $p = 0,0077$). Zum Zeitpunkt $t = 72$ h führte die Verdünnung 1:2 zu einem erniedrigten, aber statistisch nicht signifikant reduzierten Signal (1:2: 0,51-fach, $p = 0,1682$) Eine Behandlung mit 1:1 zeigte eine statistisch signifikante Reduktion des Signals der zellulären Viabilität im Vergleich zur Kontrolle (1:1: 0,042-fach, $p = 0,0059$). Eine Behandlung der Mesothelzellen führte zu keinem der analysierten Zeitpunkte zu einer statistisch signifikanten Änderung des Nekrosesignals (Abbildung 19 b). Statistisch signifikante Unterschiede wurden mittels ungepaarten t-Tests ($p < 0,05$) bestimmt.

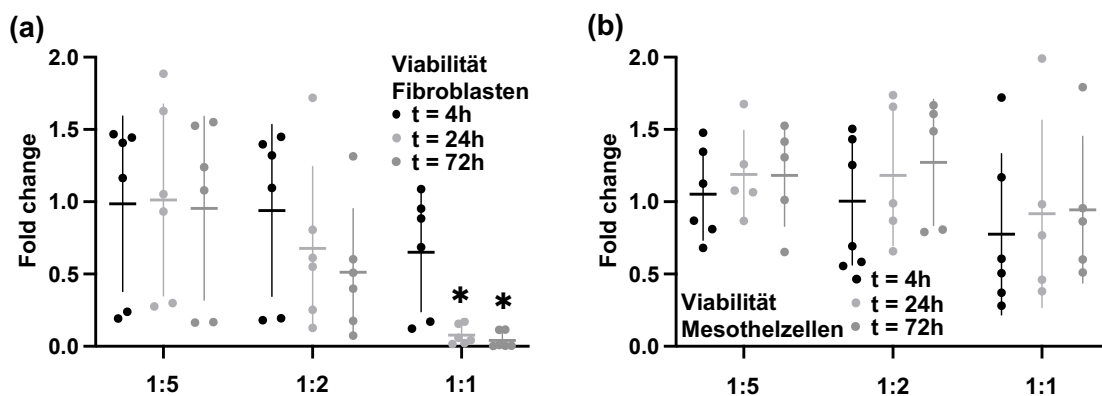


Abbildung 19: Dosisabhängige Reduktion der zellulären Viabilität nach PAM-Behandlung. Fibroblasten (F) und Mesothelzellen (MZ) wurden mit verschiedenen Verdünnungsstufen behandelt und das Lumineszenzsignal normiert (Fold change) dargestellt. (a) Die behandelten F zeigten eine dosisabhängige Reduktion der zellulären Viabilität, mit einem maximalen Effekt

durch die Dosierung 1:1. (b) Die behandelten MZ zeigten keine relevanten Änderungen der zellulären Viabilität. Dargestellt wurden Einzelwerte, Mittelwerte \pm SEM aus $n = 6$. Signifikanzen wurden mittels ungepaarten t-Tests ermittelt ($p < 0,05$). Teile der Abbildung (a) und (b) wurden nach Holl et al. (2022) [75] modifiziert.

3.2.8 Effekte einer PAM-Behandlung auf Nuklei, Lipide und Proteine

Um morphologische und molekulare Veränderungen spezifischer Zellkomponenten nach einer PAM-Behandlung zu identifizieren, wurden 1:2-behandelte Fibroblasten und Mesothelzellen fixiert und mittels kontaktloser und markerunabhängiger Raman Mikrospektroskopie analysiert. Es wurden jeweils drei Messungen pro Spenderin ($n = 3$) durchgeführt und Patientinnen-spezifisch ausgewertet, aufgrund der vorhandenen Spenderheterogenität. Die Analysen der ersten Spenderin wurden im Folgenden ausführlich diskutiert, die weiteren Auswertungen wurden in Anhang 5 - 7 dargestellt.

Die repräsentativen Raman Aufnahmen der Fibroblasten und Mesothelzellen nach einer Behandlung mit der Verdünnungsstufe 1:2 wurden in Abbildung 20 (a), im Vergleich zur Kontrollgruppe dargestellt. Die TCA ermöglichte eine Identifizierung von Nuklei (blau), Lipiden (gelb) und einem Proteinspektrum (grün) basierend auf deren charakteristischen „Fingerprint“-Spektren (Abbildung 20 b). Rein morphologisch konnte anhand der Aufnahmen kein Unterschied zwischen den 1:2-behandelten Zellen und der zugehörigen Kontrollgruppe beobachtet werden. Das Spektrum der Nuklei wurde anhand der Peaks bei 788, 1095, 1337 und 1656 cm^{-1} (O-P-O Streckschwingungen [77], DNA Rückgrat [78], DNA Basen Adenin und Guanin [93] und DNA Basen Thymin und Cytosin [93]) bestimmt. Das Spektrum der Lipide konnte beispielsweise durch den Peak bei 1442 cm^{-1} (C-C Bindung in Fettsäuren [80]) identifiziert werden. Verschiedene Peaks bei 1005, 1128, 1448 und 1658 cm^{-1} (Phenylalanin [77], C-N Bindung in Proteinen [77], CH_2 - und CH_3 - Bindungen, Kollagene [78, 85, 86] und Amid I [84]) wiesen auf ein Protein-Spektrum hin.

Zunächst wurde der Einfluss einer PAM-Behandlung auf Ebene der Nuklei weiter untersucht. Eine PCA der einzelnen extrahierten Spektren der Nuklei wurde

durchgeführt. Die Score values der PC-1 zeigten einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den 1:2-behandelten Fibroblasten und der Kontrollgruppe ($p = 0,0060$, Abbildung 20 c). Bei den 1:2-behandelten Mesothelzellen konnte für die PC-2 der Score values ein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zu Kontrollgruppe beobachtet werden ($p = 0,0021$, Abbildung 20 d). Der dazugehörige Scores plot der Fibroblasten verdeutlichte eine klare Gruppierung der analysierten Spektren über die PC-1 (Abbildung 20 e). In Abbildung 20 (f) konnte auch für die Mesothelzellpopulation eine entsprechende Aufteilung der Spektren im Scores plot über die PC-2 gezeigt werden.

Der Loadings-Plot der Fibroblasten für PC-1 veranschaulichte die molekularen Unterschiede zwischen den 1:2-behandelten Zellen und der Kontrollgruppe im Detail (Abbildung 20 g). Die Gruppierung ergab sich unter anderem durch Peaks bei 1063 , 1520 und 1749 cm^{-1} (Kontrolle) und Peaks bei 725 , 1249 , 1333 , 1456 , 1659 und 1779 cm^{-1} (1:2-behandelt). Die Peaks deuteten beispielsweise auf Unterschiede im Bereich der Base Adenin (725 cm^{-1}) [93], der Base Guanin, sowie C-H Bindungen (1333 cm^{-1}) [94, 95] hin. Eine Übersicht aller Peak-Zuweisungen wurde im Anhang 4 zusammengestellt. Der Loadings-Plot der Mesothelzellen für PC-2 veranschaulichte die molekularen Unterschiede zwischen den 1:2-behandelten Zellen und der Kontrollgruppe im Detail (Abbildung 20 h). Die Differenzen ergaben sich unter anderem durch Peaks bei 785 , 996 , 1087 , 1163 , 1520 , 1621 , 1684 und 1781 cm^{-1} (Kontrolle), sowie 722 , 744 , 1068 , 1300 , 1395 , 1443 , 1555 und 1755 cm^{-1} (1:2-behandelt). Die Peaks deuteten beispielsweise auf Unterschiede im Bereich der Basen Uracil, Thymin, Cytosin und des O-P-O Rückgrats (785 cm^{-1}) [93] hin. Eine Übersicht aller Peak-Zuweisungen wurde im Anhang 4 zusammengestellt.

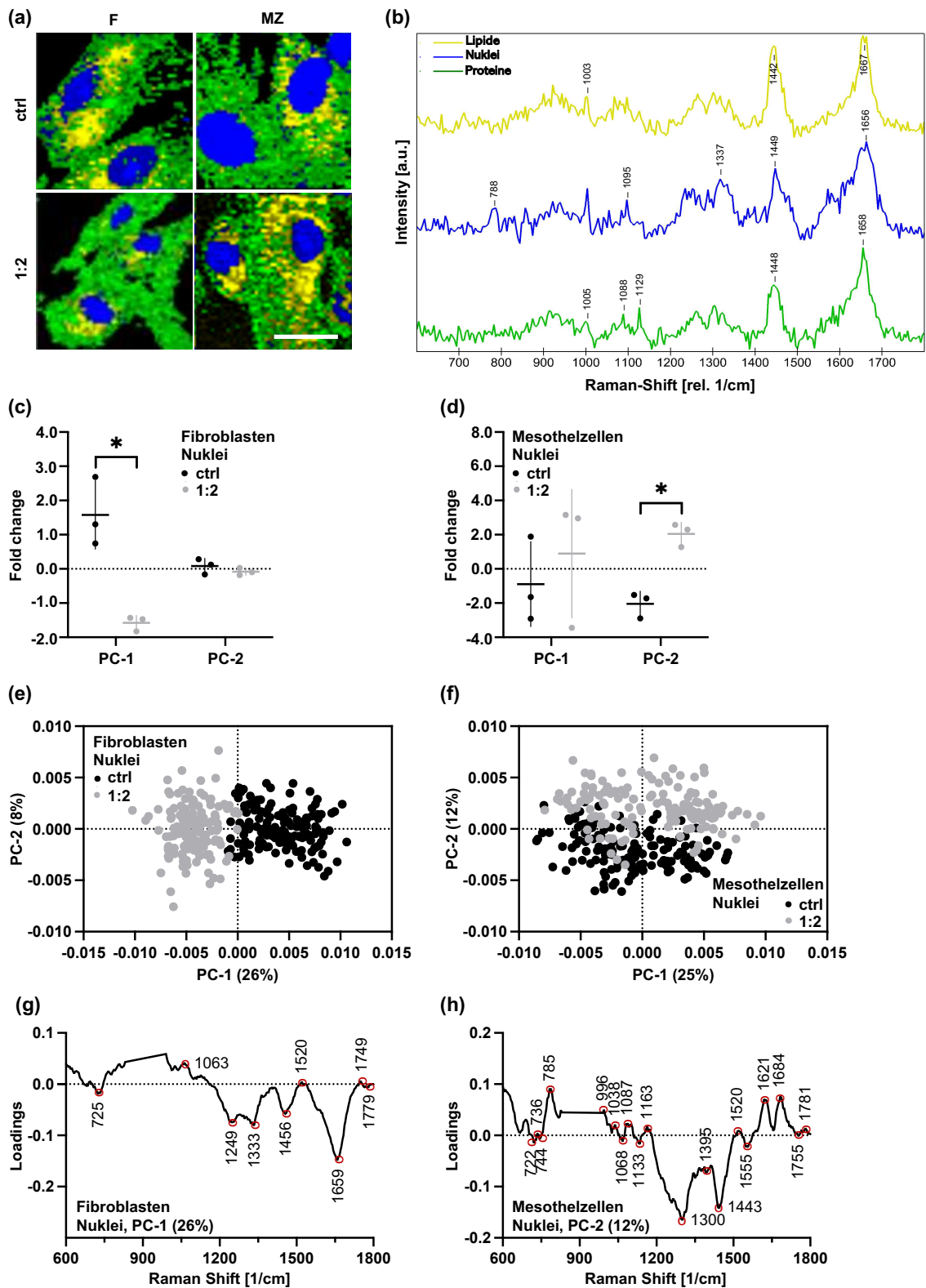


Abbildung 20: Molekulare Analyse der Nuklei nach einer PAM-Behandlung mittels Raman Mikrospektroskopie. Fibroblasten (F) und Mesothelzellen (MZ) wurden mit der Verdünnungsstufe 1:2 behandelt und eine molekulare Analyse der Nuklei mittels Raman Mikrospektroskopie durchgeführt. Die Ergebnisse einer mehrdimensionalen Datenanalyse wurden dargestellt. (a) Repräsentative Raman Aufnahmen von F und MZ der Kontrollgruppe im

Vergleich zu einer Behandlung mit der Verdünnung 1:2. Abgebildet wurden Nuklei (blau), Lipide (gelb) und Proteine (grün). Der Maßstabsbalken stellt 40 μm dar. (b) Das charakteristische „Fingerprint“-Spektrum der analysierten molekularen Zellkomponenten wurde verwendet, um die Nuklei, Lipide und Proteine durch die durchgeführte TCA zu identifizieren. (c) Die Nukleispezifischen Score values für die PC-1 der F zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen den behandelten F (grau) und der Kontrolle (ctrl, schwarz). (d) Die 1:2-behandelten MZ (grau) zeigten im Vergleich zur ctrl(schwarz) einen signifikanten Unterschied der Score values für PC-2. (e) Der PCA Score-Plot (PC-1 versus PC-2) der F der extrahierten Nuklei-Spektren zeigte eine deutliche Auftrennung über PC-1. (f) Der PCA Score-Plot der MZ zeigte für die PC-2 einen Trend zur Auftrennung zwischen den 1:2-behandelten Zellen und der ctrl. (g) Dargestellt wurde der entsprechende Loadings-Plot der F für PC-1. (h) Dargestellt wurde der entsprechende Loadings-Plot der MZ für PC-2. Dargestellt wurden Einzelwerte, Mittelwerte \pm SD aus drei Messungen. Signifikante Unterschiede wurden mittels ungepaarten t-Tests ermittelt ($p < 0,05$). Die Abbildungen (a) - (b) und (e) - (h), sowie Teile aus (c) - (d) wurden nach Holl et al. (2022) [75] modifiziert.

Als weitere Komponente wurden die Lipide näher charakterisiert und eine PCA der einzelnen extrahierten Spektren durchgeführt. Im Scores plot der Fibroblasten (Abbildung 21 a) konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den 1:2-behandelten Fibroblasten und der Kontrollgruppe für PC-1 gezeigt werden ($p = 0,0012$). Auch der Scores plot der Mesothelzellen zeigte für PC-1 einen statistisch signifikanten Unterschied der Lipide der 1:2-behandelten Mesothelzellen, im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p = 0,0019$, Abbildung 21 b). Der dazugehörige Scores plot der Fibroblasten zeigte eine klare Gruppierung der analysierten Spektren über die PC-1 (Abbildung 21 c). In Abbildung 21 (d) konnte auch für die Mesothelzellpopulation eine entsprechende Aufteilung der Spektren im Scores plot über die PC-1 gezeigt werden. Der Loadings-Plot der Fibroblasten für PC-1 veranschaulichte die molekularen Unterschiede zwischen den 1:2-behandelten Zellen und der Kontrollgruppe im Detail (Abbildung 21 e). Die Gruppierung ergab sich unter anderem durch Peaks bei 702, 1182 und 1498 cm^{-1} (Kontrolle) und bei 1163, 1258, 1302, 1446, 1524 und 1657 cm^{-1} (1:2-behandelt). Die Peaks deuteten beispielsweise auf Veränderungen von $-\text{CH}_2$ Dreh- und Wippschwingungen in Phospholipiden, $-\text{CH}_3$ und $-\text{CH}_2$ Wippschwingungen von Lipiden (1302 cm^{-1}) [86, 90, 96] oder Unterschiede in Fettsäuren und Triacylglycerinen (1657 cm^{-1}) [79, 80, 97] hin. Eine Übersicht aller Peak-Zuweisungen wurde im Anhang 4 zusammengestellt. Der Loadings-Plot der Mesothelzellen für PC-1 veranschaulichte die molekularen Unterschiede zwischen den 1:2-behandelten Zellen und der Kontrollgruppe im Detail

(Abbildung 21 f). Die Differenz ergab sich unter anderem durch Peaks bei 1031, 1266, 1436 und 1746 cm^{-1} (Kontrolle) und 755, 1121, 1166, 1231, 1333, 1462, 1632 und 1680 cm^{-1} (1:2-behandelt). Die Peaks deuteten beispielsweise auf Unterschiede der C-C Bindung in Lipiden und Fettsäuren (1121, 1166 cm^{-1}) [87] oder der $-\text{CH}_2$ Scher- und Deformationsschwingung von Lipiden (1436 cm^{-1}) [83, 98] hin. Eine Übersicht aller Peak-Zuweisungen wurde im Anhang 4 zusammengestellt.

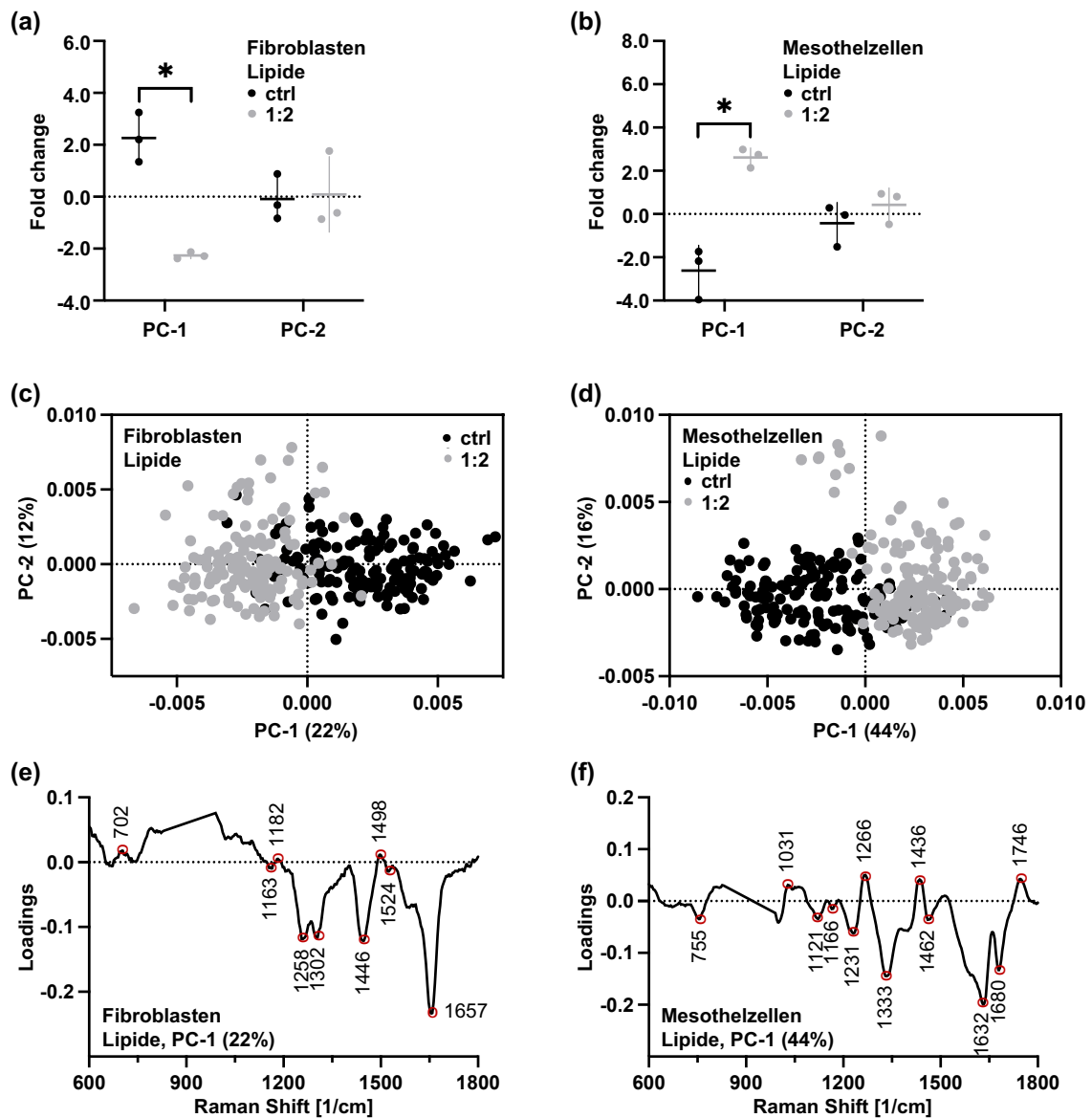


Abbildung 21: Molekulare Analyse der Lipide nach einer PAM-Behandlung mittels Raman Mikrospektroskopie. Fibroblasten (F) und Mesothelzellen (MZ) wurden mit der Verdünnungsstufe 1:2 behandelt und eine molekulare Analyse der Lipide mittels Raman Mikrospektroskopie durchgeführt. Die Ergebnisse der mehrdimensionalen Datenanalyse wurden

dargestellt. (a) Die Lipid-spezifischen Score values der PC-1 der F zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen den 1:2-behandelten F (grau) und der Kontrolle (ctrl, schwarz). (b) Die 1:2-behandelten MZ (grau) zeigten im Vergleich zur ctrl (schwarz) einen signifikanten Unterschied der Score values für PC-1. (c) Der Scores plot (PC-1 versus PC-2) der extrahierten Lipid-Spektren der F zeigte eine deutliche Auftrennung über PC-1. (d) Der Scores plot der MZ zeigte für PC-1 eine Auftrennung zwischen den 1:2-behandelten Zellen und der ctrl. (e) Dargestellt wurde der Loadings-Plot der F für PC-1. (f) Dargestellt wurde der Loadings-Plot der MZ für PC-1. Dargestellt wurden Einzelwerte, Mittelwerte \pm SD aus drei Messungen. Signifikante Unterschiede wurden mittels ungepaarten t-Tests ermittelt ($p < 0,05$). Teile der Abbildung (a) und (b) wurden nach Holl et al. (2022) [75] modifiziert.

Als letzte Komponente wurden die Proteine näher charakterisiert und eine PCA der einzelnen extrahierten Spektren durchgeführt. Die 1:2-behandelten Fibroblasten zeigten im Scores plot für PC-1 einen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p = 0,0077$, Abbildung 22 a). Auch der Scores plot der Mesothelzellen zeigte für PC-1 einen statistisch signifikanten Unterschied der Protein-Komponente der 1:2-behandelten Mesothelzellen im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p = 0,0008$, Abbildung 22 b). Der dazugehörige Scores plot der Fibroblasten zeigte eine klare Gruppierung der analysierten Spektren über die PC-1 (Abbildung 22 c). In Abbildung 22 (d) konnte auch für die Mesothelzellpopulation eine entsprechende Aufteilung der Spektren im Scores plot über die PC-1 gezeigt werden. Der Loadings-Plot der Fibroblasten für PC-1 veranschaulichte die molekularen Unterschiede zwischen den 1:2-behandelten Zellen und der Kontrollgruppe im Detail (Abbildung 21 e). Die Gruppierung ergab sich unter anderem durch Peaks bei 817 cm^{-1} (Kontrolle) und 734 , 1263 , 1298 , 1451 und 1652 cm^{-1} (1:2-behandelt, Abbildung 22 e). Die Peaks deuteten beispielsweise auf eine veränderte trans-Konformation der Aminosäure Methionin (735 cm^{-1}) [87], Amid Strukturen (1263 , 1298 cm^{-1}) oder Amid III Proteine (C-N Bindung, N-H Bindung) [77, 78, 80, 95] hin. Eine Übersicht aller Peak-Zuweisungen wurde im Anhang 4 zusammengestellt. Der Loadings-Plot der Mesothelzellen für PC-1 veranschaulichte die molekularen Unterschiede zwischen den 1:2-behandelten Zellen und der Kontrollgruppe im Detail (Abbildung 22 f). Die Differenz ergab sich unter anderem durch Peaks bei 659 , 756 , 1000 , 1113 , 1226 , 1328 , 1457 , 1633 , 1674 und 1773 cm^{-1} (Kontrolle) und 808 , 1071 , 1144 , 1264 , 1428 , 1493 und 1747 cm^{-1} (1:2-behandelt). Die Peaks deuteten beispielsweise auf Unterschiede der Konformation der Aminosäure

Methionin (659 cm^{-1}) [87], sowie der Geometrie des Rückgrats von Methionin (808 cm^{-1}) [93] oder der Amid III Banden von Proteinen (1113 cm^{-1}) [99]. Eine Übersicht aller Peak-Zuweisungen wurde im Anhang 4 zusammengestellt.

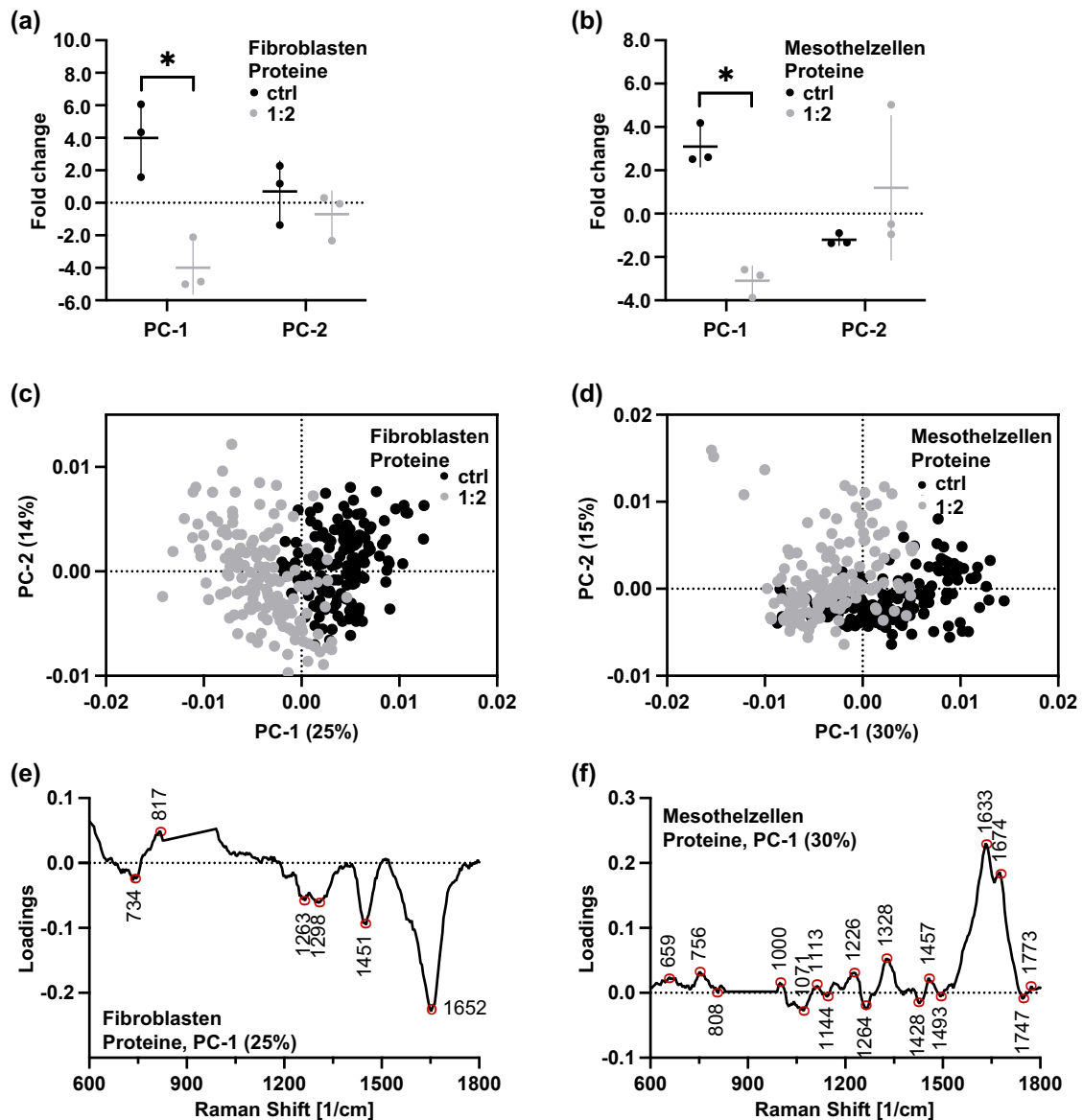


Abbildung 22: Molekulare Analyse der Proteine nach einer PAM-Behandlung mittels Raman Mikrospektroskopie. Fibroblasten (F) und Mesothelzellen (MZ) wurden mit der Verdünnungsstufe 1:2 behandelt und eine molekulare Analyse der Proteine mittels Raman Mikrospektroskopie durchgeführt. Die Ergebnisse der mehrdimensionalen Datenanalyse wurden dargestellt. (a) Die Protein-spezifischen Score values für PC-1 der F zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen den behandelten F (grau) und der Kontrolle (ctrl, schwarz). (b) Die 1:2-behandelten MZ zeigten im Vergleich zur ctrl (schwarz) einen signifikanten Unterschied der Score values für PC-1. (c) Der Scores plot (PC-1 versus PC-2) der F der extrahierten Protein-Spektren zeigte eine Auftrennung der Analyten über PC-1. (d) Der Scores plot der MZ zeigte für PC-1 einen Trend zur Auftrennung zwischen den 1:2-behandelten Zellen und der ctrl. (e) Dargestellt wurde der Loadings-Plot der F für PC-1. (f) Dargestellt wurde der Loadings-Plot der

MZ für PC-1. Dargestellt wurden Einzelwerte, Mittelwerte \pm SD aus drei Messungen. Signifikante Unterschiede wurden mittels ungepaarten t-Tests ermittelt ($p < 0,05$). Teile der Abbildung (a) und (b) wurden nach Holl et al. (2022) [75] modifiziert.

Die Raman Mikrospektroskopie ermöglichte die molekulare Untersuchung von 1:2-behandelten Fibroblasten und Mesothelzellen. Es konnten signifikante Unterschiede beider Zelltypen auf Ebene der nukleären DNA-, Lipid- und Protein-Komponenten nach einer PAM-Behandlung gezeigt werden.

4 Diskussion

Das menschliche Peritoneum erfüllt eine Vielzahl an Aufgaben, um die Integrität des Körpers zu gewährleisten. Die Komplexität des Systems spiegelt sich in den zahlreichen Funktionen wider. Störungen der Homöostase können zu schwerwiegenden Krankheitsbildern führen, deren Pathophysiologien bisher meist nicht genau untersucht sind. Postoperative peritoneale Adhäsionen stellen hier mit einer hohen Prävalenz und dem breiten Spektrum an klinischen Beschwerden, eine der wichtigsten Komplikationen dar. Aktuell angewandte Strategiemöglichkeiten zur Prävention und Behandlung von Adhäsionen zeigten bisher keinen ausreichend gesicherten Nutzen. Die Applikation von Plasmaaktiviertem Medium stellt eine vielversprechende Neuerung in zahlreichen medizinischen Anwendungsgebieten dar. In aktuellen Studien lag der Fokus vor allem im onkologischen und dermatologischen Bereich [56, 100], während in der vorliegenden Arbeit eine Anwendung zur Prävention von postoperativen Adhäsionen untersucht wurde. Dieser Zusammenhang wurde bislang nicht untersucht und stellte eine wesentliche Motivation für die vorliegende Arbeit dar.

In dieser Studie war es zunächst möglich, ein neues Verfahren zur Isolation humaner peritonealer Mesothelzellen zu etablieren und die Zellen mittels verschiedener biomolekularer Methoden zu charakterisieren. Im weiteren Teil wurden die dosisabhängigen Effekte einer PAM-Behandlung auf peritoneale Fibroblasten und Mesothelzellen untersucht. Hierbei konnten neben verdünnungsabhängigen Effekten auf die Proliferation und Zellzyklusregulation, sowie auf Apoptose- und Nekroseprozesse auch Einflüsse auf molekularer Ebene gezeigt werden.

4.1 Aktuelle Möglichkeiten Patienten/innen-spezifischer In-vitro-Modelle

Das Peritoneum stellt den Ausgangspunkt vieler benignen und malignen Krankheitsbilder dar, weshalb der Entwicklung und Forschung an In-vitro-Modellen eine enorme Bedeutung zukommt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden humane Mesothelzellen aus Spülzytologien isoliert, charakterisiert und das neu etablierte Verfahren mit bereits publizierten Techniken verglichen.

In der Vergangenheit gelang es bereits einigen Arbeitsgruppen humane peritoneale Mesothelzellen erfolgreich aus Gewebeproben zu isolieren und zu kultivieren. Die Kontamination mit anderen Zelltypen, speziell mit Fibroblasten stellte bisher aber eine große Limitation dar. Einige Studien beschrieben zwar die Gewinnung einer lichtmikroskopisch homogenen Population, allerdings wurde die Reinheit quantitativ nicht analysiert. Stylianou et al. publizierte bereits 1990 eine bis heute aktuelle Methodik, welche geringe Trypsinkonzentrationen verwendete, um Mesothelzellen aus peritonealen Gewebeproben zu gewinnen und um eine Kontamination mit Fibroblasten zu minimieren [101]. Jedoch resultierte dies gehäuft in einer inhomogenen Population und verringerten Viabilität der Mesothelzellen. Die Trypsin/ EDTA-abhängige Disaggregation von omentalen Gewebeproben, stellt eine weitere bekannte Methodik in der Literatur dar, publiziert von Liu et al. [102] und Fang et al. [103]. Auch hier zeigten sich Probleme bezüglich der Reinheit der Mesothelzellpopulation. Chung-Welch et al. beschrieb 1997 die Verwendung von Kollagenasen, um Mesothel- und Endothelzellen zu gewinnen [104]. Mittels lichtmikroskopischer Überwachung konnte die typische kopfsteinpflasterartige Morphologie der Mesothelzellen beobachtet werden. Allerdings zeigten einige Zellen eine spindelartige Form, was stark an Fibroblasten erinnerte. Eine Inkubation mit endothelialen Wachstumsfaktoren führte hier zu einem Anteil an Fibroblasten von bis zu 50 % der isolierten Population. Andere Arbeitsgruppen wie Yáñez-Mó et al. [105], Yamamoto et al. [106] oder Chan et al. [107] versuchten Mesothelzellen aus peritonealen Dialysaten zu gewinnen. Die isolierten Zellen zeigten aber verschiedene degenerative Veränderungen (vergrößerte Zellkörper,

Vakuolisierung, verminderte Funktion der zellulären Organellen), was vermutlich auf die zugrundeliegenden Erkrankungen der Spender/innen und der Langzeitexposition gegenüber Dialyselösungen zurückzuführen ist. Zudem bestand eine erhöhte morphologische Heterogenität und eine längere Zeitspanne bis zum Erreichen eines konfluenten Zellrasens, verglichen mit anderen Methoden [105, 108].

Die in der vorliegenden Studie verwendeten peritonealen Spülzytologien wurden ausschließlich von Patientinnen mit makroskopisch intaktem Peritoneum gewonnen, um einen Kontakt der Flüssigkeit mit Fibroblasten oder anderen Zellen zu minimieren und um eine Kontamination der Proben zu verhindern. Spülzytologien können intraoperativ schnell, nichtinvasiv und mit einer hohen Reproduzierbarkeit gewonnen werden. Im Gegensatz dazu geht die Exzision von peritonealen und omentalen Gewebeproben, wie bei Stylianou et al. oder Liu et al. bei gesunden Patientinnen mit dem Risiko von Blutungen, großem Zeitaufwand und einer Gefahr der Verletzung physiologischer Strukturen einher. In der vorliegenden Studie konnten bereits lichtmikroskopisch alle morphologischen Kriterien der Mesothelzellen nachgewiesen werden. Die isolierten Mesothelzellen zeigten zunächst einen bipolaren und elongierten Phänotyp, bevor sie einen konfluenten kopfsteinpflasterartigen Monolayer ausbildeten. Dieses Phänomen wurde bereits in diversen Studien von Stylianou et al., Fetsch et al. oder Czernobilsky et al [101, 109, 110] belegt. Die per Spülzytologie isolierten Mesothelzellen erreichten nach sieben bis zehn Tagen deutlich schneller eine 100%ige Konfluenz des Zellrasens, im Vergleich zu Stylianou et al. (18 ± 1 Tage).

Daneben wurde durch die Fluoreszenzmikroskopie eine qualitative Analyse der Mesothelzellen durch den Nachweis von charakteristischen Zellstrukturen durchgeführt. Es konnten die spezifische Expression von Zytokeratin (ZK) und Calretinin, sowie das überwiegende Fehlen von Fibronectin-Signalen gezeigt werden. Der epitheliale Marker ZK wird von kontaminierenden Zellen wie Fibroblasten, Lymphozyten, Adipozyten und Endothelzellen nicht exprimiert [20, 111-114], weshalb er eine Differenzierung der Zellen von Mesothelzellen

ermöglichte, was bereits Stylianou et al. [101] oder Yang et al. [115] zeigten. In der aktuellen Literatur wird Fibronectin als ausreichender Marker zur Charakterisierung von EZM-produzierenden mesenchymalen Zellen, wie Fibroblasten beschrieben [101, 105, 108, 116]. Peritoneale Mesothelzellen zeigen zum Teil eine geringe Expression an Fibronectin [101, 117], was auch in der vorliegenden Studie bestätigt werden konnte. Der quantitative Nachweis ZK-positiver Mesothelzellen ermöglichte den Beleg einer extrem hohen Reinheit ($97,67 \pm 0,67$ % ZK+ Zellen) der isolierten Population. Eine vergleichbare quantitative Analyse wurde in der Literatur bisher nicht durchgeführt. Daneben ermöglichte die Untersuchung der isolierten Mesothelzellen durch die Raman Mikrospektroskopie eine kontaktlose und markerunabhängige Analyse molekularer Strukturen [47, 76, 118, 119]. Gaifulina et al. untersuchte bereits 2016 die Mesothelzellschicht des viszeralen Peritoneums [120], woraufhin Parlatan et al. 2019 die Raman Mikroskopie als nichtinvasive diagnostische Methode zur Analyse peritonealer Endometriose etablierte [121]. Auf molekularer Ebene konnte in der vorliegenden Arbeit kein Unterschied zwischen den isolierten und den in situ Mesothelzellen beobachtet werden.

In der Literatur wurden bereits verschiedene 3D-Modelle des Peritoneums diskutiert. So entwickelte Falk et al. 2017 ein Modell des humanen Peritoneums um die Integration von Mesheinsätzen bei Hernienoperationen ex vivo zu untersuchen [122]. Unter Laborbedingungen war es möglich das Modell aus exzidierten Peritoneumproben über mehrere Wochen zu kultivieren. Eine Untersuchung des Peritoneums und möglicher Pathophysiologien stellte sich anhand dieses Modells aber schwierig dar, da bereits bei der Exzision Verletzungen und Entzündungsreize gesetzt wurden. Die Arbeitsgruppe um Jayne et al. [123] entwickelte bereits 1999 ein Modell zur Untersuchung der peritonealen Metastasierung. Aufgrund verschiedener Verunreinigungen mit anderen Zelltypen, dem Fehlen einer Basalmembran und Blutgefäßen eignete sich auch dieses Modell bisher nicht für weitere Untersuchungen des Peritoneums. Es besteht ein großer Bedarf an 3D-Modellen, die eine mikrofluidische ex-vivo-Kultivierung von peritonealen Zellen über einen längeren

Zeitraum ermöglichen. Verschiedene Arbeitsgruppen für Organ-on-chips-Projekten konnten dies beispielsweise für Leber- oder Nierengewebe bereits etablieren [124]. In dieser Studie wurde ein innovatives 2D-Modell aus primär isolierten Mesothelzellen entwickelt, was zukünftig zur Entwicklung geeigneter 3D-Modelle zur Untersuchung des Peritoneums und der Pathophysiologien verschiedenster Krankheitsbilder beitragen kann.

4.2 PAM-Behandlung zur Prophylaxe intraperitonealer Adhäsionen

Eine Behandlung von postoperativen peritonealen Adhäsionen wird in der aktuellen Literatur intensiv diskutiert. Bisher entwickelte Präventions- und Therapiestrategien zeigten keinen klaren Nutzen. Der Fokus der Therapie lag in den letzten Jahren vor allem auf der Prävention von Adhäsionen. Bereits bestehende Adhäsionen können zwar mittels Adhäsioolyse gelöst werden, das Risiko einer erneuten Bildung ist jedoch extrem hoch [3]. Das Ziel einer Prophylaxe stellt die Vermeidung der Entstehung von Adhäsionen dar, ohne die Wundheilung zu beeinträchtigen. Die übermäßige Produktion von EZM durch Fibroblasten soll durch eine lokale Wirkung der Behandlung gehemmt werden, ohne systemische Nebenwirkungen zu verursachen.

Zu den aktuellen Strategien zur Verhinderung postoperativer Adhäsionen zählt zunächst die Verbesserung chirurgischer Techniken. Durch den Versuch das operative Trauma möglichst gering zu halten, konnte eine Reduktion des Auftretens von Adhäsionen erzielt werden. Ebenfalls positiv wirkte sich die Vermeidung von Ischämien im Operationsgebiet und die Reduktion von Fremdkörperkontakten mit der peritonealen Höhle aus [36, 72]. Die intraabdominale Lavage mit Ringer-Laktat-Lösung ist eine weit verbreitete Methodik, die zu einer gewissen Adhäsionsprophylaxe beiträgt, sich in ihrer Effektivität aber als gering und nicht kontinuierlich darstellte. Die vermutete Wirkung liegt in der lokalen Verdünnung von pro-adhäsiven Faktoren (z.B. Fibrin) [125, 126].

Flüssige Barrieren konnten in Studien zumeist keinen ausreichenden Nutzen zeigen und wurden vom Markt genommen. Eine Behandlung mit osmotischem Zucker beispielsweise, zeigte eine signifikant reduzierte Adhäsionogenese, führte jedoch auch zu septischen und entzündlichen Zuständen, Labenschwellungen nach der Instillation, sowie der Leckage von Anastomosen [125, 126].

Daneben wurde eine Reihe an Barrierematerialien entwickelt, welche die Gewebeadhärenz verhindern und die Wundränder schützen sollen [36, 72]. Gelartige absorbierbare Barrieren aus Carboxymethylzellulose (CMC) und Polyethylenoxid (PEO) zeigten eine signifikante Reduktion der Adhäsionsbildung im Zusammenhang mit der laparoskopischen Behandlung von Endometriose [127]. Außerdem wurden Gele aus quervernetzten Hyaluronsäureestern untersucht, die angewandt auf verletzten peritonealen Oberflächen den Heilungsprozess durch lokale Separation unterstützen konnten [128].

Entwickelte feste Barrierematerialien konnten zum Teil nur unter bestimmten Indikationen, oder oftmals auch keinen gesicherten adhäsionspräventiven Nutzen zeigen. Diese waren zudem klinisch oft schwer anwendbar und mussten teilweise durch Reoperationen wieder entfernt werden [129]. Eine Seprafilm-Adhäsionsbarriere aus Hyaluronsäure und CMC wurde durch eine Reihe an randomisierten Studien zur Anwendung bei Laparotomien untersucht und konnte eine Reduktion von abdominalen Adhäsionen in 51 % versus 6 % in der Kontrollgruppe erreichen [130]. Bisherige Studien zeigten in der laparoskopischen Anwendung aber keine signifikante Verbesserung [131, 132]. Ein aufsprühbares Komponentensystem aus Polyethylenglykol (PEG) zeigte keinen adhäsionspräventiven Nutzen [133]. Dagegen konnte oxidierte regenerierte Zellulose als resorbierbare Membran auf Wundflächen zur Prophylaxe aufgebracht werden [134].

Zusätzlich wurden verschiedene medikamentöse Therapiestrategien mit antiinflammatorischen Reagenzien (z.B. Kortikosteroide), Fibrinolytika (z.B. Heparine) oder antibiotische Lösungen untersucht. Keines der untersuchten Pharmaka konnte in Studien einen signifikanten Nutzen zeigen [135]. Zusammenfassend gibt es einen dringenden Bedarf an einer effektiven Adhäsionsprophylaxe, welche unkompliziert in chirurgische Prozeduren integriert

werden kann, sich nebenwirkungsarm präsentiert und sowohl in der minimalinvasiven als auch in der offenen Chirurgie Anwendung finden kann.

Aktuell sind bereits verschiedene kommerzielle atmosphärische Plasmaquellen zur medizinischen Anwendung erhältlich [136]. In der vorliegenden Studie wurde der CE-zertifizierte KINPen® verwendet, welcher sich durch seine kompakte Größe und die Einfachheit in der Handhabung auszeichnet [137]. Im Hinblick auf eine mögliche intraoperative Anwendung in der minimalinvasiven, als auch in der offenen Chirurgie wurde die Plasmabehandlung von peritonealen Fibroblasten und Mesothelzellen indirekt mittels PAM gewählt. Bauer et al. verglich in einer Studie den Einfluss einer direkten und indirekten Applikation von Plasma und konnte keinen relevanten Unterschied feststellen [51]. Neben bereits genannten Vorteilen bezüglich der Lagerung von PAM und der Behandlung von Schleimhäuten, steht hier vor allem auch die mögliche Anwendung bei laparoskopischen Eingriffen im Vordergrund. Die NIPP-Behandlung von Kulturmedium und dadurch entstehende ROS und RNS sind volumenabhängig. Yan et al. entdeckte 2015 ein optimales Arbeitsvolumen von 2 mL Kulturmedium zur Herstellung von PAM [138], was in der vorliegenden Arbeit übernommen wurde. Um weiterhin optimale Bedingungen für das Wachstum und den Stoffwechsel der primär isolierten Zellen zu gewährleisten, wurde das Kulturmedium MEM als Grundlage der Generierung von PAM verwendet. Das Kulturmedium MEM enthielt zudem kein Pyruvat als Zusatzstoff, welcher in vorherigen Studien zu einer verminderten Anzahl an reaktiven Spezies führte und deshalb nicht zur Herstellung von PAM geeignet ist [53]. Andere Arbeitsgruppen wie Sato et al. zeigten in vitro und in vivo antitumorale Effekte durch die Anwendung von Plasma-aktivierter Ringer-Laktat-Lösung [139]. Weitere Studien sind hier notwendig, um die Anwendung von medizinisch zugelassenen und intraperitoneal anwendbaren Flüssigkeiten oder Pufferlösungen zu untersuchen, um die Ergebnisse der vorliegenden Studie zu bestätigen.

Der Einfluss direkter und indirekter Plasmabehandlungen wurde in den letzten Jahren auf viele Arten benigner und maligner Zellen untersucht. Der Fokus in der aktuellen Literatur lag aber hauptsächlich im dermatologischen und onkologischen Bereich [139, 140]. Der Einfluss einer direkten Behandlung von dermalen Fibroblasten wurde von Bekeschus et al. und Arndt et al. hinsichtlich einer möglichen therapeutischen Option zur Wundheilung analysiert [141, 142]. Der Fokus richtete sich auf die Aktivierung von Fibroblasten. Bourdens et al. dagegen konnte durch eine direkte Plasmabehandlung eine Hemmung dermalen Fibroblasten auf zellulärer Ebene nachweisen [143]. Im Vordergrund der Studie stand die Verhinderung von Wundheilungsstörungen oder Ausbildung hypertropher Narben und Keloiden. Die Arbeitsgruppe um Nakamura et al. untersuchte die Wirkung einer PAM-Behandlung auf verschiedene Zelllinien ovarieller Karzinome hinsichtlich einer möglichen Verhinderung ovarieller Metastasierung. Eine Behandlung peritonealer Mesothelzellen, isoliert aus omentalen Gewebeproben wurde im Rahmen der Studie als Kontrolle durchgeführt und untersuchte lediglich die Reduktion der zellulären Viabilität [144]. Daneben analysierte Cheng et al. die Effekte einer PAM-Behandlung auf verschiedene maligne Zellen, isoliert aus Pleuraergüssen von an Lungenkarzinom erkrankten Patientinnen und Patienten [145]. Eine PAM-Behandlung von peritonealen Fibroblasten und Mesothelzellen mit dem Ziel einer möglichen Prävention von Adhäsionen wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben.

Dosisabhängige Effekte auf die Proliferation von malignen Zellen durch eine Behandlung mit Plasma-aktivierten Flüssigkeiten, wurde bereits in diversen Studien diskutiert. Sato et al. konnte 2017 eine verdünnungsabhängige Reduktion der Proliferation verschiedener Pankreaskarzinom-Zelllinien zeigen, wobei Dosierungen von 1:32 bis 1:4 verwendet wurden [139]. Bourdens et al. zeigte einen vergleichbaren Effekt auf dermale Fibroblasten [143]. Entartete Zellen präsentierten sich in der Literatur grundsätzlich als weniger resistent gegenüber PAM-Behandlungen im Vergleich zu benignen Zellen [138, 146]. Vermutet wurden eine erhöhte Sensibilität von malignen Zellen auf reaktive

Spezies, sowie eine Abhängigkeit der zellulären Reaktion von der Dosierung und Dauer der Behandlung [138, 147]. In der Literatur wurde eine erhöhte Proliferations- und reduzierte Apoptoserate bei aus peritonealen Adhäsionen isolierten Fibroblasten beschrieben [40, 148], was in der vorliegenden Studie als möglicher Angriffspunkt einer PAM-Behandlung untersucht wurde.

In der vorliegenden Arbeit konnte ein dosisabhängiger selektiver Effekt einer PAM-Behandlung auf peritoneale Fibroblasten, im Gegensatz zu Mesothelzellen gezeigt werden. Peritoneale Fibroblasten zeigten äquivalent zu dermalen Fibroblasten, eine reduzierte Proliferation und Konfluenz des Zellrasens abhängig von der jeweils analysierten Verdünnungsstufe. Der IC_{50} -Wert behandelter Fibroblasten lag zwischen 1:4 und 1:3. Im Vergleich dazu konnte eine signifikante Reduktion der Proliferation und Konfluenz der Mesothelzellen erst bei einer Behandlung mit unverdünntem PAM erreicht werden. Interessanterweise reichte bei Pankreaskarzinomzellen bereits die Dosierung 1:16 aus, um eine signifikante Hemmung der Zellen zu erreichen [139]. Beobachtet wurde durch die Dosis-Wirkungs-Kurve zudem eine konstant zunehmende Hemmung der Zellen, bei einer Zunahme des PAM-Anteils der behandelten Fibroblasten und Mesothelzellen. Dieser lineare Effekt wurde bereits für einige maligne Zellen gezeigt und beruht vermutlich auf der konstant ansteigenden Zahl an reaktiven Spezies [149]. Im Review von Von Woedtke et al. wurden verschiedene Studien diskutiert, die den Zusammenhang eines höheren Levels an reaktiven Spezies und dem zunehmenden Einfluss auf die Proliferationsaktivität zeigten [147]. Daneben konnten Torii et al. und Tanaka et al. morphologische Veränderungen von Magenkarzinom- und Glioblastomzellen durch PAM-Behandlungen zeigen [150, 151]. In der vorliegenden Studie konnte dieser Effekt im therapeutischen Dosisfenster 1:2 auch bei Fibroblasten beobachtet werden. Die Arbeit von Cheng et al. zeigte deutliche morphologische Änderungen von pleuralen Mesothelzellen nach einer PAM-Behandlung [145]. In der vorliegenden Arbeit konnte erst bei einer Behandlung mit hochkonzentriertem PAM (ab Verdünnungsstufe 1:1) ein morphologischer

Unterschied der peritonealen Mesothelzellen im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden.

Das Vorliegen von DSB kann sich auf die Zellzyklusregulation auswirken und durch den Nachweis von H2A.X detektiert werden [152]. Der Einfluss von Plasma führte in verschiedenen Studien zur Zunahme des H2A.X-Signals nach der Behandlung von entarteten Zellen [153-155]. So zeigte Marzi et al. (2022) einen signifikanten Einfluss der NIPP-Behandlung auf das H2A.X-Signal von Zervixkarzinomzellen [156], oder Arndt et al. die Zunahme des Signals abhängig von der Behandlungsdauer mit NIPP bei verschiedenen Zelllinien von Melanomen [157]. Eine signifikante Zunahme von DSB konnte auch Bourdens et al. bei der Behandlung von dermalen Fibroblasten und Adipozyten nachweisen [143]. In der vorliegenden Studie konnte eine dosisabhängige statistisch signifikante Zunahme von DSB bei behandelten Fibroblasten beobachtet werden. Eine Behandlung von Mesothelzellen dagegen führte zu keiner Änderung des H2A.X-Signals.

Direkte Einflüsse einer NIPP- bzw. PAM-Behandlung auf Ebene des Zellzyklus wurden bereits in verschiedenen Studien bei humanen Fibroblasten [158] und malignen Zellen [142, 159] nachgewiesen. Die Hemmung der Proliferationsaktivität wurde durch einen G2/M-Arrest und einen Rückgang der S-Phase diskutiert [142]. Yan et al. veröffentlichte 2010 die Theorie, dass die Plasma-Behandlung zu einer gesteigerten Aktivität von p53 führe. Das aktivierte p53-Protein verhindere zum einen die Bildung des B-Cyclin/CDK1-Komplexes, welcher essenziell für den Eintritt der Zelle in die Mitose-Phase ist. Zum anderen fördere p53 die Expression von p21, was über eine Signalkaskade den Übergang der Zellen von der G0- zur G1-Phase hemmt [160]. Keidar et al. diskutierte zudem die Abhängigkeit der Plasmawirkung vom Anteil der Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Behandlung in der S-Phase befinden [70]. Der in der vorliegenden Arbeit bei peritonealen Fibroblasten beobachtete G2/M-Arrest stimmt mit den in der aktuellen Literatur beschriebenen Theorien überein. Unbehandelte Fibroblasten zeigten einen grundsätzlich höheren Anteil an Zellen in der S-

Phase, im Vergleich zu unbehandelten Mesothelzellen. Die geringe Proliferations- und Mitoseaktivität von Mesothelzellen, sowie der hohe Anteil an Zellen in der G1-Phase wurde im Review von Mutsaers et al. bereits ausführlich beschrieben [22]. Entsprechend kann der geringe Effekt einer PAM-Behandlung auf Mesothelzellen auf Ebene des Zellzyklus durch die Vermutung von Keidar et al. bestätigt werden.

Neben den Effekten auf nukleärer Ebene wurde in der Literatur der Einfluss einer Plasmabehandlung auf apoptotische oder nekrotische Prozesse belegt. So konnte beispielsweise Bourdens et al. die Induktion von Apoptosesignalwegen bei dermalen Fibroblasten zeigen [143], während dies in anderen Studien vor allem für maligne Zellen bestätigt wurde [161, 162]. Ahn et al. diskutierte den Einfluss von ROS und RNS auf Apoptoseprozesse [161]. Der durch freie Radikale induzierte oxidative Stress simuliere einen Zustand der Zelle, der sonst mitochondrial bei der Einleitung der Apoptose entstehe. Der Anstieg von zytoplasmatischem Cytochrom C führe über eine Signalkaskade zur Aktivierung verschiedener Caspasen und damit zum Apoptoseprozess. Ähnliche Vermutungen wurden auch durch andere Studien aufgestellt und diskutiert [157, 163, 164]. Torii et al. zeigte 2015, dass die durch PAM induzierte Apoptose abhängig von der Behandlungszeit des Mediums mit NIPP, dem behandelten Zelltyp und der behandelten Zellzahl ist [150]. Ab einer Behandlungsdauer von 2 h wurden jedoch auch zytotoxische Effekte bei Magenkarzinomzellen und humanen Fibroblasten beobachtet [165]. Neben den Einflüssen auf Apoptose- und Nekrosesignalwege, wurde in der Literatur zusätzlich die zelluläre Viabilität nach Plasmabehandlungen untersucht. Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten eine reduzierte Viabilität der behandelten Zellen, wie beispielsweise Hamouda et al. bei verschiedenen Osteosarkomen [166], oder Weiss et al. bei dermalen Fibroblasten [46].

Die in der vorliegenden Studie verwendeten Apoptosemarker Annexin V (früh) und Caspase 3/7 (spät) gelten in Kombination als zuverlässige Nachweismethodik [167]. Es konnte ein dosisabhängiger Anstieg des Annexin V-

Signals von behandelten Fibroblasten gezeigt werden. Ein erhöhter PAM-Anteil führte zu einem erhöhten Signal. Die detektierte Caspase 3/7-Aktivität zeigte ihr maximales Signal nach einer Behandlung mit 1:5. Auch bei anderen Arten des Zelltods, kann Phosphatidylserin detektiert werden, weshalb der Annexin V-Assay auch bei einem möglichen Nekroseprozess ein erhöhtes Signal anzeigen kann [168, 169]. Im nächsten Schritt wurde deshalb die Induktion von Nekrosesignalwegen weiter untersucht. Hier konnte eine statistisch signifikante dosisabhängige Zunahme des Nekrosesignals der behandelten Fibroblasten gezeigt werden. Entsprechend erlaubte die Analyse der zellulären Viabilität eine statistisch signifikante dosisabhängige Abnahme des Signals der behandelten Fibroblasten. Höher dosiertes PAM führte zu einer reduzierten Viabilität der Fibroblasten. Behandelte Mesothelzellen dagegen, zeigten keine statistisch signifikanten Veränderungen bezüglich Apoptose- oder Nekroseprozessen, sowie der zellulären Viabilität. Cheng et al. zeigte in seiner Studie ebenfalls eine nur geringe Änderung der zellulären Viabilität von PAM-behandelten pleuralen Mesothelzellen [145].

Die Kombination der verschiedenen Assays erlaubte die Vermutung, dass höher verdünntes PAM (z.B. 1:5 und 1:2) zu vermehrten Apoptoseprozessen in Fibroblasten führte, während weniger verdünntes PAM (z.B. 1:1) eine Induktion von Nekrosesignalwegen und eine Reduktion der zellulären Viabilität bedingte. Das gewählte therapeutische Dosisfenster 1:2 wurde hier bestätigt, da peritoneale Fibroblasten durch die PAM-Behandlung zwar gehemmt wurden, aber keine zytotoxischen Effekte erfahren haben und peritoneale Mesothelzellen keine signifikante Beeinträchtigung zeigten.

Die Raman Mikrospektroskopie stellt ein etabliertes Verfahren zur kontaktlosen und markerunabhängigen Analyse von molekularen und chemischen Strukturen, sowie biologischem Material dar. Die Methodik wurde bereits in zahlreichen Studien zur Identifikation der Struktur von Stoffen, des molekularen Aufbaus oder der Unterscheidung chemischer Komponenten verwendet [170, 171]. Die Raman Mikrospektroskopie wurde in den letzten Jahren zunehmend zur Untersuchung von biologischem Gewebe und zellulären Strukturen angewandt [172, 173].

Brauchle et al. zeigte 2014 beispielsweise die erfolgreiche Verwendung der Methodik zum Monitoring von Apoptose- und Nekrosevorgängen in Osteosarkom- und Chondrosarkomzelllinien [174]. Marzi et al. konnte 2019 die Raman Mikrospektroskopie zur Identifikation von glatten Muskelzellen in Gewebeschnitten und deren Charakterisierung etablieren [118].

Plasmabehandelte Zervixkarzinomzellen und Zellen aus zervikalen intraepithelialen Neoplasien wurden von Wenzel et al. (2019) [76] und Marzi et al. (2022) [156] mittels Raman Mikrospektroskopie untersucht und die plasmaspezifische Effekte analysiert. Die Raman Mikrospektroskopie wurde in der vorliegenden Studie deshalb ebenfalls zur Evaluierung plasmaspezifischer Veränderungen in behandelten Fibroblasten und Mesothelzellen angewandt. Im Review von Reiazi et al. wurden verschiedene Studien zusammengefasst, die die Wirkung von NIPP auf zelluläre Komponenten untersuchten. Insbesondere wurde hier eine plasmaspezifische Wirkung durch oxidativen Stress auf nukleäre DNA, Lipide und Proteine beschrieben. Der Fokus der Studien lag vor allem auf entarteten Zellen, die auf eine NIPP-Behandlung mit DNA-DSB, Oxidation von Lipiden und dem Funktionsverlust mitochondrialer Proteine reagierten [175]. Verschiedene Vorarbeiten konnten den Einfluss einer Plasmabehandlung auf die Alteration von DNA- und Lipid-Komponenten im Zusammenhang mit einer Apoptoseinduktion in vitro und in vivo zeigen [176]. Die Arbeitsgruppe um Wang et al. konnte ebenfalls bei der Charakterisierung einer Plasmawirkung auf *Bacillus subtilis* Sporen Änderungen der DNA-, Lipid- und Protein-Komponenten aufzeigen [177].

Die TCA ermöglichte die Extraktion von einzelnen Raman Spektren und die intensitätsgewichtete Darstellung der dazugehörigen Komponenten. Dies ermöglichte in der vorliegenden Arbeit die graphisch-morphologische Darstellung der untersuchten Fibroblasten und Mesothelzellen. Die Methodik wurde bereits von Marzi et al. (2019) für die Identifikation von zellulären Komponenten im Rahmen der Typisierung glatter Muskelzellen beschrieben [118]. In der vorliegenden Studie konnten DNA, Lipide und Proteine als Komponenten identifiziert und analysiert werden. Rein morphologisch zeigte sich kein

Unterschied zwischen 1:2-behandelten Zellen und den Kontrollen der Fibroblasten und Mesothelzellen. Die PCA zeigte signifikante spektrale Veränderungen nach einer Plasmabehandlung mit 1:2 sowohl in Fibroblasten als auch in Mesothelzellen. Insbesondere die Komponenten der nukleären DNA, Lipide und Proteine zeigten plasmazuspezifische Veränderungen. Durch die Analyse der Raman Spektren der verschiedenen Komponenten, konnten für beide Zelltypen spezifische spektrale Banden gewonnen werden. Dies erlaubte die Diskussion einer plasmazuspezifischen Wirkung auf Ebene der DNA, RNA und des DNA-Rückgrats unter anderem durch Banden bei 722, 725 und 1333 cm^{-1} (Fibroblasten) oder 722, 785 und 1068 cm^{-1} (Mesothelzellen). Die Analyse der gemessenen Veränderungen in Fettsäuren, C-C Schwingungen und Phospholipiden ermöglichte den Rückschluss einer plasmazuspezifischen Wirkung auf die Lipid-Komponente, unter anderem durch Banden bei 1302, 1446 und 1657 (Fibroblasten) und 1121, 1166 und 1436 cm^{-1} (Mesothelzellen). Die Untersuchung der Banden von Aminosäuren und verschiedenen Amidgruppen (I bis III) ermöglichte die Diskussion der plasmazuspezifischen Wirkung auf die Protein-Komponente: 735, 1298 und 1652 (Fibroblasten) und 659, 808, 1113 cm^{-1} (Mesothelzellen). Die spektroskopische Analyse der 1:2-behandelten Fibroblasten und Mesothelzellen konnte eine plasmazuspezifische statistisch signifikante molekulare Wirkung auf Ebene der nukleären DNA, Lipide und Proteine aufzeigen. Die Raman Mikrospektroskopie, als mögliche zukünftige Methode zum Monitoring von Plasmabehandlungen muss in zusätzlichen Studien weiter untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Studie war es, Effekte einer PAM-Behandlung auf peritoneale Fibroblasten und Mesothelzellen im Hinblick auf eine mögliche Prävention von postoperativen Adhäsionen zu untersuchen.

Hierfür wurde ein geeignetes Verfahren zur Isolation primärer humaner Mesothelzellen über intraoperative Spülzytologien des Douglasraums etabliert, um zuverlässig und mit hoher Reinheit homogene Mesothelzellpopulationen mit typischer Morphologie und charakteristischer Expression von zellulären Bestandteilen zu isolieren und zu kultivieren. Die Raman Mikrospektroskopie ermöglichte die molekulare Untersuchung isolierter Mesothelzellen, die sich im Vergleich zu in-situ-Peritoneumproben nicht signifikant unterschieden.

Dosisabhängige PAM-Effekte auf die Proliferation, Zellzyklusregulation, Zytotoxizität, Apoptose- und Nekroseinduktion von peritonealen Fibroblasten und Mesothelzellen wurden mit verschiedenen molekularbiologischen Methoden untersucht. Die PAM-Verdünnungsstufe 1:2 wurde als therapeutisches Dosis-Fenster mit selektiven Effekten auf Fibroblasten identifiziert. Im Gegensatz zu Fibroblasten konnte für Mesothelzellen auf Ebene der nukleären DNA und Zellzyklusregulation kein statistisch signifikanter Einfluss gezeigt werden. Auch apoptotische und zytotoxische Prozesse wurden selektiv in Fibroblasten nachgewiesen. Die plasmaspezifischen Einflüsse einer PAM-Behandlung konnten auf molekularer Ebene mittels kontaktloser und markerunabhängiger Raman Mikrospektroskopie nachgewiesen werden.

Die Anwendung von PAM stellt eine vielversprechende Neuerung in vielen medizinischen Bereichen dar. Basierend auf den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen, kann die klinische Anwendung von PAM eine Möglichkeit zur Prävention postoperativer peritonealer Adhäsionen darstellen. Peri- oder postoperatives Spülen der Bauchhöhle mit PAM könnte zu einer ausreichenden Hemmung pro-adhäsiver Prozesse von peritonealen Fibroblasten führen, ohne die Wundheilung zu beeinflussen. Die Resultate der vorliegenden Arbeit müssen künftig in weiterführenden klinischen Studien validiert werden.

6 Anhang

Anhang 1: Peak-Zuweisung Isolation Mesothelzellen.

Peaks (cm ⁻¹)	Zuordnung	Referenz
756	Tryptophan	[89]
788	O-P-O Streckschwingung	[77]
818	C-C Streckschwingung in Kollagen	[85]
918	Prolin	[86]
929	C-C Streckschwingung in Aminosäuren (z.B. Prolin, Valin)	[83]
1005	Phenylalanin	[77]
1011	Kohlenhydrate	[80]
1076	C-C in Lipiden	[78]
1095	DNA Rückgrat	[78]
1124	Lipid Rückgrat	[86]
1247	Amid III in Kollagen	[85]
1269	C-C Schwingung	[88]
1302	CH ₂ Wippschwingung	[90]
1369	Lipide	[89]
1442	C-C in Fettsäuren	[80]
1444	CH ₂ Deformationsschwingung	[87]
1453	CH ₃ Bindung, CH ₂ Deformationsschwingung in Kollagen	[83]
1592	C=C	[91]
1628	C=C	[92]
1657	C=C Streckschwingung	[79, 80]
1658	Amid I	[84]
1680	Amid I	[84]
1774	Carbonyl-Gruppe in Fettsäuren	[81]
2852	CH ₂ Streckschwingung in Lipiden	[82]
2912	CH Streckschwingungen in Proteinen	[82]

	G0/G1		S		G2/M	
F 4h	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
ctrl	0,717	0,025	0,108	0,030	0,175	0,034
1:5	0,695	0,021	0,141	0,034	0,164	0,014
1:2	0,702	0,037	0,150	0,034	0,149	0,028
1:1	0,703	0,034	0,145	0,026	0,152	0,011

	G0/G1		S		G2/M	
F 24h	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
ctrl	0,741	0,065	0,125	0,052	0,134	0,013
1:5	0,766	0,012	0,055	0,037	0,179	0,027
1:2	0,708	0,045	0,051	0,021	0,242	0,048
1:1	0,732	0,061	0,049	0,020	0,219	0,060

	G0/G1		S		G2/M	
F 72h	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
ctrl	0,927	0,039	0,026	0,013	0,047	0,026
1:5	0,890	0,022	0,029	0,007	0,081	0,015
1:2	0,740	0,020	0,046	0,020	0,213	0,023
1:1	0,749	0,042	0,046	0,027	0,205	0,034

Anhang 2: Zellzyklusanalyse Fibroblasten. Die absoluten Werte der Zellzyklusanalysen der Fibroblasten (F) wurden für die Kontrolle (ctrl) und die Verdünnungsstufen 1:5, 1:2 und 1:1 zu den Zeitpunkten t = 4h, 24h und 72h zusammengefasst. Dargestellt wurden die Werte der G0/G1-, S- und G2/M-Phasen als Mittelwert (Mean) und Standardabweichung (SD) für n = 3.

MZ 4h	G0/G1		S		G2/M	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
ctrl	0,881	0,017	0,063	0,021	0,056	0,012
1:5	0,885	0,012	0,056	0,013	0,059	0,009
1:2	0,874	0,032	0,065	0,024	0,061	0,012
1:1	0,873	0,035	0,070	0,030	0,057	0,009

MZ 24h	G0/G1		S		G2/M	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
ctrl	0,834	0,012	0,058	0,004	0,108	0,014
1:5	0,835	0,016	0,055	0,013	0,109	0,004
1:2	0,880	0,021	0,041	0,017	0,078	0,012
1:1	0,891	0,012	0,037	0,013	0,071	0,017

MZ 72h	G0/G1		S		G2/M	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
ctrl	0,829	0,042	0,062	0,013	0,109	0,029
1:5	0,835	0,043	0,055	0,017	0,110	0,027
1:2	0,855	0,018	0,045	0,007	0,100	0,012
1:1	0,871	0,031	0,030	0,007	0,099	0,027

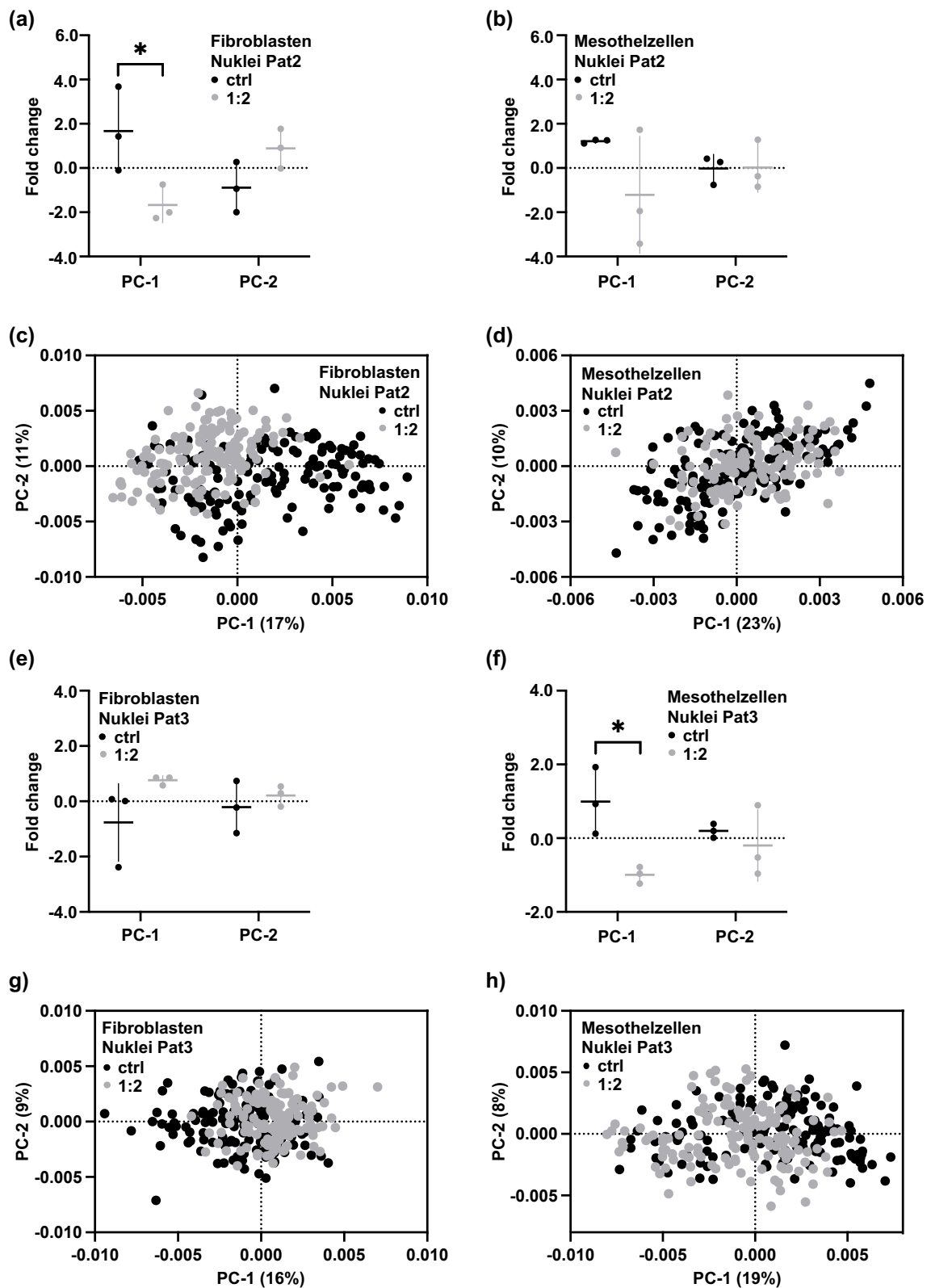
Anhang 3: Zellzyklusanalyse Mesothelzellen. Die absoluten Werte der Zellzyklusanalysen der Mesothelzellen (MZ) wurden für die Kontrolle (ctrl) und die Verdünnungsstufen 1:5, 1:2 und 1:1 zu den Zeitpunkten t = 4h, 24h und 72h zusammengefasst. Dargestellt wurden die Werte der G0/G1-, S- und G2/M-Phasen als Mittelwert (Mean) und Standardabweichung (SD) für n = 3.

Anhang 4: Peak-Zuweisung PAM-Behandlung.

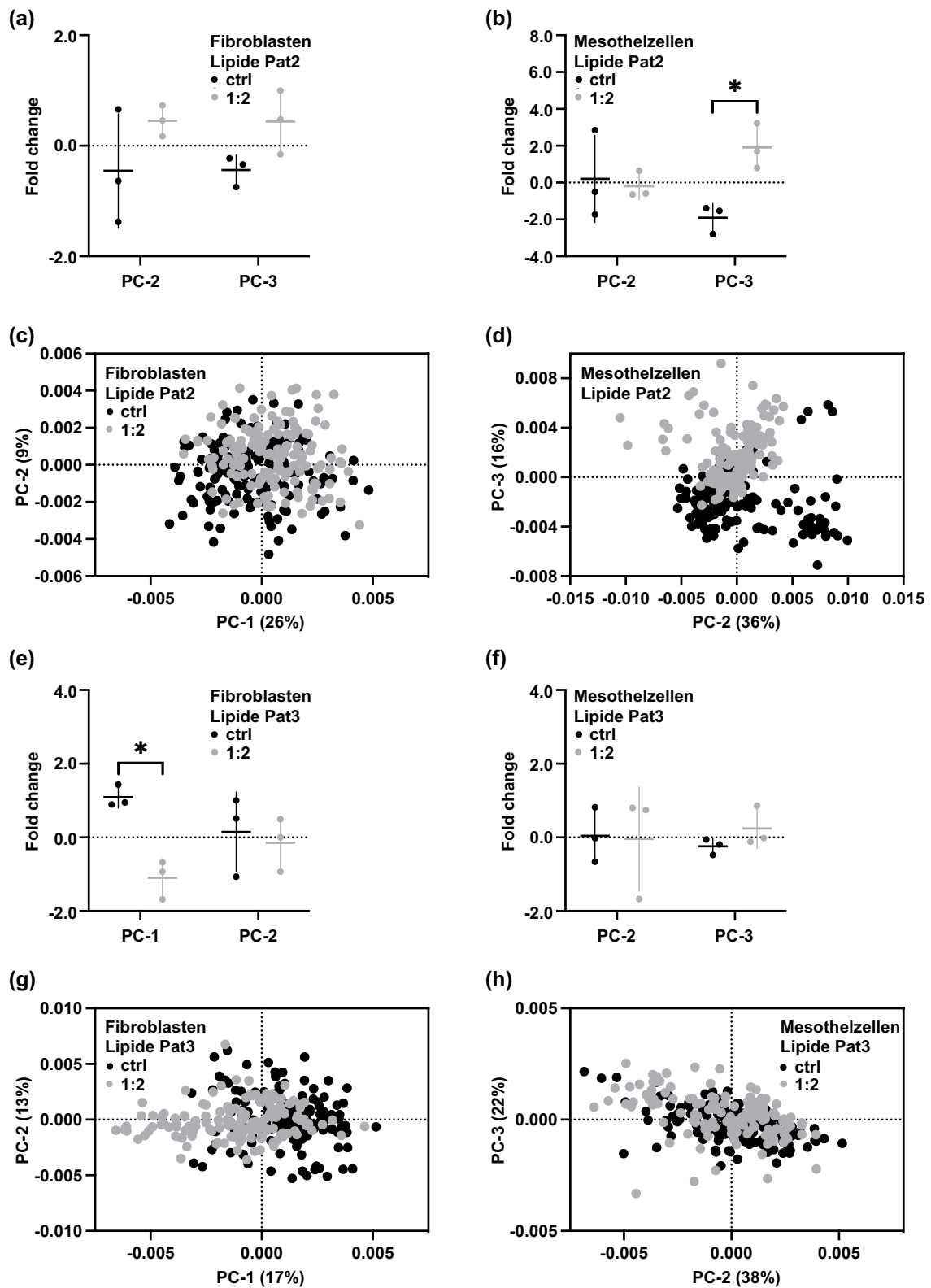
Peaks (cm ⁻¹)	Zuordnung	Referenz
659	g-Konformation Methionin	[87]
690	Nukleotid-Konformation	[93]
702	Cholesterol, Cholesterol-Ester	[178]
722	DNA	[179]
725	Adenin (DNA, RNA Base)	[93]
734	trans-Konformation Methionin	[87]
755	Tryptophan	[89, 90, 180]
785	Uracil, Thymin, Cytosin (DNA, RNA Basen), O-P-O Rückgrat	[93]
808	Nukleinsäure Rückgrat-Geometrie	[93]
915	Ribose	[93]
996	C-O Ribose, C-C Bindung	[80]
1000	Phenylalanin, gebundenes und freies NADH	[78]
1063	C-C Streckschwingung	[98]
1068	PO ₂ ⁻ Schwingung DNA/RNA	[77]
1071	Glucose	[178]
1113	Banden Amide III und verschiedene Gruppen von Proteinen	[99]
1121	C-C Bindung Lipide, Fettsäuren	[87]
1163	Tyrosin (Kollagen Typ I)	[86]
1182	Cytosin, Guanin, Adenin	[89]
1226	Amid III	[77, 181]
1231	Amid III	[80]
1249	Amid III	[80]
1258	Amid III	[89]
1263	Amid III, -CH Bindung Proteine	[77, 78, 93]
1266	Protein-Zuordnung	[86, 90]

1300	-CH Bindung	[95]
1302	CH ₂ Dreh- und Wippschwingung in Phospholipiden, -CH ₃ und -CH ₂ Wippschwingung und Biegung von Lipiden	[86, 90, 96]
1328	-CH Bindung	[95]
1333	-CH Bindung	[95]
1428	C=O Bindung AS Aspartat und Glutamin, -CH ₂ Bindung Proteine	[83, 87]
1436	-CH ₂ Scher-/Deformationsschwingung Lipide, CH-Bindung Lipide und Proteine,	[77, 83, 98]
1443	Guanin, Adenin (DNA und RNA Basen), -CH Deformation (DNA und RNA)	[77]
1446	-CH ₂ Bindung und Deformation Lipide	[85, 89, 180]
1451	-CH ₂ Deformation	[82]
1457	Desoxyribose	[94]
1462	CH ₂ Bindung Lipide	[87]
1493	Amid II (C-N Bindung, N-H Bindung)	[80]
1498	Amid II	[80]
1520	Amid II (C-N Bindung)	[80]
1555	Amide	[182]
1621	Doppelendenschwingungen von Basen, Amid	[80]
1632	Amid I Bande (C=O Bindung)	[183]
1633	Amid I Bande Proteine (C=O Bindung), Amid I mol. Geometrie Proteine (C=O Bindung)	[80, 93, 183]
1652	Amide I Proteine	[184]
1657	Fettsäuren und Triacylglyceride	[79, 80, 97]
1659	Amid I	[185]
1674	Amid I Bande (Proteine)	[184]
1746	C=O Bindung Lipide	[89]

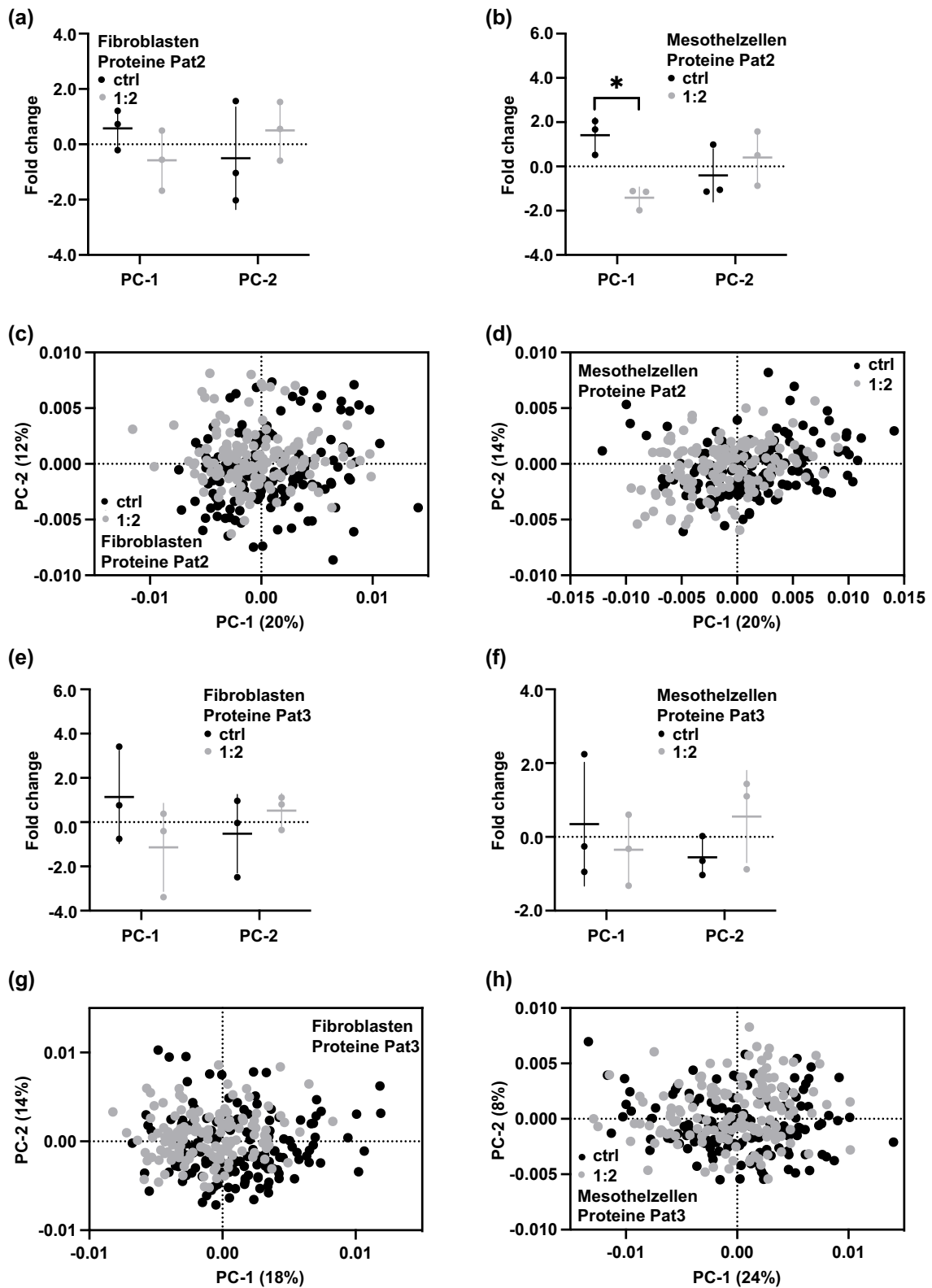
1747	-OH Bindung Aminosäure (Aspartat und Glutamin)	[87]
1749	Amid I (C=O Bindung)	[172]



Anhang 5: Molekulare Analyse der Nuklei von Fibroblasten und Mesothelzellen. Isolierte Fibroblasten und Mesothelzellen der Patientinnen 2 und 3 (Pat2 und Pat3) wurden mit 1:2-verdünntem PAM behandelt und die Zellkern-Komponente mittels Raman Mikrospektroskopie analysiert.



Anhang 6: Molekulare Analyse der Lipide von Fibroblasten und Mesothelzellen. Isolierte Fibroblasten und Mesothelzellen der Patientinnen 2 und 3 (Pat2 und Pat3) wurden mit 1:2-verdünntem PAM behandelt und die Lipid-Komponente mittels Raman Mikrospektroskopie analysiert.



Anhang 7: Molekulare Analyse der Proteine von Fibroblasten und Mesothelzellen. Isolierte Fibroblasten und Mesothelzellen der Patientinnen 2 und 3 (Pat2 und Pat3) wurden mit 1:2-verdünntem PAM behandelt und die Protein-Komponente mittels Raman Mikrospektroskopie analysiert.

7 Literaturverzeichnis

1. Menzies, D. and H. Ellis, *Intestinal obstruction from adhesions--how big is the problem?* Annals of the Royal College of Surgeons of England, 1990. **72**(1): p. 60-63.
2. Pittaway, D.E., J.F. Daniell, and W.S. Maxson, *Ovarian surgery in an infertility patient as an indication for a short-interval second-look laparoscopy: a preliminary study***Presented in part at the Fortieth Annual Meeting of The American Fertility Society, April 2 to 7, 1984, New Orleans, Louisiana. Fertility and Sterility, 1985. **44**(5): p. 611-614.
3. Kamel, R.M., *Prevention of postoperative peritoneal adhesions.* European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 2010. **150**(2): p. 111-118.
4. Beyene, R.T., S.L. Kavalukas, and A. Barbul, *Intra-abdominal adhesions: Anatomy, physiology, pathophysiology, and treatment.* Current Problems in Surgery, 2015. **52**(7): p. 271-319.
5. Tulandi, T., et al., *Treatment-dependent and treatment-independent pregnancy among women with periadnexal adhesions.* American Journal of Obstetrics and Gynecology, 1990. **162**(2): p. 354-357.
6. *Postoperative adhesion development after operative laparoscopy: evaluation at early second-look procedures***Presented in part at the 46th Annual Meeting of The American Fertility Society, Washington D.C., October 15 to 18, 1990. Fertility and Sterility, 1991. **55**(4): p. 700-704.
7. Drollette, C.M. and S.Z. Badawy, *Pathophysiology of pelvic adhesions. Modern trends in preventing infertility.* J Reprod Med, 1992. **37**(2): p. 107-21; discussion 121-2.
8. Ellis, H., *The clinical significance of adhesions: focus on intestinal obstruction.* Eur J Surg Suppl, 1997(577): p. 5-9.
9. Lower, A.M., et al., *Adhesion-related readmissions following gynaecological laparoscopy or laparotomy in Scotland: an epidemiological study of 24 046 patients.* Human Reproduction, 2004. **19**(8): p. 1877-1885.
10. Ivarsson, M.L., et al., *Cost of bowel obstruction resulting from adhesions.* Eur J Surg, 1997. **163**(9): p. 679-84.
11. Ray, N.F., et al., *Economic impact of hospitalizations for lower abdominal adhesiolysis in the United States in 1988.* Surg Gynecol Obstet, 1993. **176**(3): p. 271-6.
12. Ray, N.F., et al., *Abdominal Adhesiolysis: Inpatient Care and Expenditures in the United States in 1994.* Journal of the American College of Surgeons, 1998. **186**(1): p. 1-9.
13. Schäfer, M., L. Krähenb hl, and M.W. Büchler, *Comparison of adhesion formation in open and laparoscopic surgery.* Dig Surg, 1998. **15**(2): p. 148-52.
14. Tabibian, N., et al., *Abdominal adhesions: A practical review of an often overlooked entity.* Annals of medicine and surgery (2012), 2017. **15**: p. 9-13.

15. Levrant, S.G., E.J. Bieber, and R.B. Barnes, *Anterior abdominal wall adhesions after laparotomy or laparoscopy*. J Am Assoc Gynecol Laparosc, 1997. **4**(3): p. 353-6.
16. Holmdahl, L., et al., *Adhesions: pathogenesis and prevention-panel discussion and summary*. Eur J Surg Suppl, 1997(577): p. 56-62.
17. Liakakos, T., et al., *Peritoneal Adhesions: Etiology, Pathophysiology, and Clinical Significance*. Digestive Surgery, 2001. **18**(4): p. 260-273.
18. Van Goor, H., *Consequences and complications of peritoneal adhesions*. Colorectal Disease, 2007. **9**(s2): p. 25-34.
19. Diamond, M.P. and M.L. Freeman, *Clinical implications of postsurgical adhesions*. Human Reproduction Update, 2001. **7**(6): p. 567-576.
20. Van Baal, J.O., et al., *The histophysiology and pathophysiology of the peritoneum*. Tissue Cell, 2017. **49**(1): p. 95-105.
21. Herrick, S.E. and S.E. Mutsaers, *Mesothelial progenitor cells and their potential in tissue engineering*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2004. **36**(4): p. 621-642.
22. Mutsaers, S.E., *The mesothelial cell*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2004. **36**(1): p. 9-16.
23. Mutsaers, S.E., et al., *Mesothelial cells and peritoneal homeostasis*. Fertility and Sterility, 2016. **106**(5): p. 1018-1024.
24. Capobianco, A., et al., *The peritoneum: healing, immunity, and diseases*. J Pathol, 2017. **243**(2): p. 137-147.
25. Melichar, B. and R.S. Freedman, *Immunology of the peritoneal cavity: Relevance for host-tumor relation*. International Journal of Gynecologic Cancer, 2002. **12**(1): p. 3.
26. Paolo, N.D., G.A. Nicolai, and G. Garosi, *The Peritoneum: From Histological Studies to Mesothelial Transplant through Animal Experimentation*. Peritoneal Dialysis International, 2008. **28**(5_suppl): p. 5-9.
27. Dauleh, S., et al., *Characterisation of Cultured Mesothelial Cells Derived from the Murine Adult Omentum*. PLOS ONE, 2016. **11**(7): p. e0158997.
28. Lee, H.B. and H. Ha, *Mechanisms of epithelial-mesenchymal transition of peritoneal mesothelial cells during peritoneal dialysis*. Journal of Korean medical science, 2007. **22**(6): p. 943-945.
29. van Baal, J.O.A.M., et al., *The histophysiology and pathophysiology of the peritoneum*. Tissue and Cell, 2017. **49**(1): p. 95-105.
30. Dizerega, G.S., *Biochemical events in peritoneal tissue repair*. Eur J Surg Suppl, 1997. **577**: p. 10-16.
31. Badia, J.M., et al., *Peritoneal and systemic cytokine response to laparotomy*. BJS (British Journal of Surgery), 1996. **83**(3): p. 347-348.
32. Binda, M.M., C.R. Molinas, and P.R. Koninckx, *Reactive oxygen species and adhesion formation: clinical implications in adhesion prevention*. Hum Reprod, 2003. **18**(12): p. 2503-7.
33. Rodgers, K.E. and G.S. Dizerega, *Function of Peritoneal Exudate Cells after Abdominal Surgery*. Journal of Investigative Surgery, 1993. **6**(1): p. 9-23.
34. Le, A.D. and J.J. Brown, *Chapter 2 - Wound Healing: Repair Biology and Wound and Scar Treatment*, in *Current Therapy In Oral and Maxillofacial*

- Surgery, S.C. Bagheri, R.B. Bell, and H.A. Khan, Editors. 2012, W.B. Saunders: Saint Louis. p. 6-10.
35. Raftery, A.T., *Effect of Peritoneal Trauma on Peritoneal Fibrinolytic Activity and Intraperitoneal Adhesion Formation*. European Surgical Research, 1981. **13**(6): p. 397-401.
 36. Sutton, C., *Adhesions and their prevention*. The Obstetrician & Gynaecologist, 2005. **7**(3): p. 168-176.
 37. Pados, G.A. and P. Devroey, *Adhesions*. Curr Opin Obstet Gynecol, 1992. **4**(3): p. 412-8.
 38. Danø, K., et al., *Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer*. Adv Cancer Res, 1985. **44**: p. 139-266.
 39. Książek, K., *Mesothelial cell: A multifaceted model of aging*. Ageing Research Reviews, 2013. **12**(2): p. 595-604.
 40. Saed, G.M. and M.P. Diamond, *Molecular Characterization of Postoperative Adhesions: The Adhesion Phenotype*. The Journal of the American Association of Gynecologic Laparoscopists, 2004. **11**(3): p. 307-314.
 41. Brüggmann, D., et al., *Intra-abdominal adhesions: definition, origin, significance in surgical practice, and treatment options*. Dtsch Arztebl Int, 2010. **107**(44): p. 769-75.
 42. Moisan, M., et al., *Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms*. International Journal of Pharmaceutics, 2001. **226**(1): p. 1-21.
 43. Graves, D.B., *The emerging role of reactive oxygen and nitrogen species in redox biology and some implications for plasma applications to medicine and biology*. Journal of Physics D: Applied Physics, 2012. **45**(26): p. 263001.
 44. Vajenine, G.V., *Use of plasma-activated gases in synthesis of solid-state nitrides*. Dalton Transactions, 2010. **39**(26): p. 6013-6017.
 45. Gay-Mimbrera, J., et al., *Clinical and Biological Principles of Cold Atmospheric Plasma Application in Skin Cancer*. Adv Ther, 2016. **33**(6): p. 894-909.
 46. Weiss, M., et al., *Dose-Dependent Tissue-Level Characterization of a Medical Atmospheric Pressure Argon Plasma Jet*. ACS Appl Mater Interfaces, 2019. **11**(22): p. 19841-19853.
 47. Wenzel, T., et al., *Trans-Mucosal Efficacy of Non-Thermal Plasma Treatment on Cervical Cancer Tissue and Human Cervix Uteri by a Next Generation Electrosurgical Argon Plasma Device*. Cancers (Basel), 2020. **12**(2).
 48. Feil, L., et al., *Cancer-Selective Treatment of Cancerous and Non-Cancerous Human Cervical Cell Models by a Non-Thermally Operated Electrosurgical Argon Plasma Device*. Cancers, 2020. **12**(4): p. 1037.
 49. Hoffmann, C., C. Berganza, and J. Zhang, *Cold Atmospheric Plasma: methods of production and application in dentistry and oncology*. Med Gas Res, 2013. **3**(1): p. 21.

50. Tanaka, H., et al., *Plasma Medical Science for Cancer Therapy: Toward Cancer Therapy Using Nonthermal Atmospheric Pressure Plasma*. IEEE Transactions on Plasma Science, 2014. **42**(12): p. 3760-3764.
51. Bauer, G., et al., *Cold Atmospheric Plasma and Plasma-Activated Medium Trigger RONS-Based Tumor Cell Apoptosis*. Scientific Reports, 2019. **9**(1): p. 14210.
52. Braný, D., et al., *Cold Atmospheric Plasma: A Powerful Tool for Modern Medicine*. International Journal of Molecular Sciences, 2020. **21**(8).
53. Adachi, T., et al., *Plasma-activated medium induces A549 cell injury via a spiral apoptotic cascade involving the mitochondrial-nuclear network*. Free Radic Biol Med, 2015. **79**: p. 28-44.
54. Mohades, S., et al., *Evaluation of the effects of a plasma activated medium on cancer cells*. Physics of Plasmas, 2015. **22**(12): p. 122001.
55. Daeschlein, G., et al., *Skin decontamination by low-temperature atmospheric pressure plasma jet and dielectric barrier discharge plasma*. J Hosp Infect, 2012. **81**(3): p. 177-83.
56. Heinlin, J., et al., *Plasma applications in medicine with a special focus on dermatology*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2011. **25**(1): p. 1-11.
57. Leonarduzzi, G., B. Sottero, and G. Poli, *Targeting tissue oxidative damage by means of cell signaling modulators: The antioxidant concept revisited*. Pharmacology & Therapeutics, 2010. **128**(2): p. 336-374.
58. Mohd Nasir, N., et al., *Cold plasma inactivation of chronic wound bacteria*. Arch Biochem Biophys, 2016. **605**: p. 76-85.
59. Zuo, X., et al., *Non-equilibrium atmospheric pressure microplasma jet: An approach to endoscopic therapies*. Physics of Plasmas, 2013. **20**(8): p. 083507.
60. Hasse, S., et al., *Induction of proliferation of basal epidermal keratinocytes by cold atmospheric-pressure plasma*. Clinical and Experimental Dermatology, 2016. **41**(2): p. 202-209.
61. Rajasekaran, P., et al., *DBD plasma source operated in single-filamentary mode for therapeutic use in dermatology*. Journal of Physics D: Applied Physics, 2009. **42**(22): p. 225201.
62. Yan, D., J.H. Sherman, and M. Keidar, *Cold atmospheric plasma, a novel promising anti-cancer treatment modality*. Oncotarget, 2017. **8**(9): p. 15977-15995.
63. Weiss, M. and M.B. Stope, *Physical plasma: a new treatment option in gynecological oncology*. Archives of Gynecology and Obstetrics, 2018. **298**(5): p. 853-855.
64. Kim, S.J., et al., *Induction of apoptosis in human breast cancer cells by a pulsed atmospheric pressure plasma jet*. Applied Physics Letters, 2010. **97**(2): p. 023702.
65. Koensgen, D., et al., *Cold Atmospheric Plasma (CAP) and CAP-Stimulated Cell Culture Media Suppress Ovarian Cancer Cell Growth - A Putative Treatment Option in Ovarian Cancer Therapy*. Anticancer Res, 2017. **37**(12): p. 6739-6744.
66. Zenker, M., *Argon plasma coagulation*. GMS Krankenhaushygiene interdisziplinär, 2008. **3**(1): p. Doc15-Doc15.

67. Bekeschus, S., et al., *Hydrogen peroxide: A central player in physical plasma-induced oxidative stress in human blood cells*. *Free Radic Res*, 2014. **48**(5): p. 542-9.
68. Bernhardt, T., et al., *Plasma Medicine: Applications of Cold Atmospheric Pressure Plasma in Dermatology*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019. **2019**: p. 3873928.
69. von Woedtke, T., et al., *Plasmas for medicine*. *Physics Reports*, 2013. **530**(4): p. 291-320.
70. Keidar, M., et al., *Cold atmospheric plasma in cancer therapy*. *Physics of Plasmas*, 2013. **20**(5): p. 057101.
71. Schmidt, A., T. von Woedtke, and S. Bekeschus, *Periodic Exposure of Keratinocytes to Cold Physical Plasma: An In Vitro Model for Redox-Related Diseases of the Skin*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016. **2016**: p. 9816072.
72. Risberg, B., *Adhesions: preventive strategies*. *Eur J Surg Suppl*, 1997(577): p. 32-9.
73. Holl, M., et al., *Laparoscopic Peritoneal Wash Cytology-Derived Primary Human Mesothelial Cells for In Vitro Cell Culture and Simulation of Human Peritoneum*. *Biomedicines*, 2021. **9**(2): p. 176.
74. Takashima, A., *Establishment of Fibroblast Cultures*. *Current Protocols in Cell Biology*, 1998. **00**(1): p. 2.1.1-2.1.12.
75. Holl, M., et al., *Cell Type-Specific Anti-Adhesion Properties of Peritoneal Cell Treatment with Plasma-Activated Media (PAM)*. *Biomedicines*, 2022. **10**(4).
76. Wenzel, T., et al., *Molecular Effects and Tissue Penetration Depth of Physical Plasma in Human Mucosa Analyzed by Contact- and Marker-Independent Raman Microspectroscopy*. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019. **11**(46): p. 42885-42895.
77. Notingher, I., et al., *Discrimination between ricin and sulphur mustard toxicity in vitro using Raman spectroscopy*. *Journal of the Royal Society, Interface*, 2004. **1**(1): p. 79-90.
78. Malini, R., et al., *Discrimination of normal, inflammatory, premalignant, and malignant oral tissue: a Raman spectroscopy study*. *Biopolymers*, 2006. **81**(3): p. 179-93.
79. Hanlon, E.B., et al., *Prospects for in vivo Raman spectroscopy*. *Phys Med Biol*, 2000. **45**(2): p. R1-59.
80. Dukor, R.K., *Vibrational Spectroscopy in the Detection of Cancer*, in *Handbook of Vibrational Spectroscopy*. 2001, John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA.
81. Kline, N.J. and P.J. Treado, *Raman Chemical Imaging of Breast Tissue*. *Journal of Raman Spectroscopy*, 1997. **28**(2-3): p. 119-124.
82. Koljenović, S., et al., *Detection of Meningioma in Dura Mater by Raman Spectroscopy*. *Analytical Chemistry*, 2005. **77**(24): p. 7958-7965.
83. Lau, D.P., et al., *Raman spectroscopy for optical diagnosis in normal and cancerous tissue of the nasopharynx-preliminary findings*. *Lasers Surg Med*, 2003. **32**(3): p. 210-4.

84. Jyothi Lakshmi, R., et al., *Tissue Raman spectroscopy for the study of radiation damage: brain irradiation of mice*. Radiat Res, 2002. **157**(2): p. 175-82.
85. Frank, C.J., R.L. McCreery, and D.C. Redd, *Raman spectroscopy of normal and diseased human breast tissues*. Anal Chem, 1995. **67**(5): p. 777-83.
86. Cheng, W.T., et al., *Micro-Raman spectroscopy used to identify and grade human skin pilomatrixoma*. Microsc Res Tech, 2005. **68**(2): p. 75-9.
87. Shetty, G., et al., *Raman spectroscopy: elucidation of biochemical changes in carcinogenesis of oesophagus*. Br J Cancer, 2006. **94**(10): p. 1460-4.
88. Viehoveer, A.R., et al., *Organotypic raft cultures as an effective in vitro tool for understanding Raman spectral analysis of tissue*. Photochem Photobiol, 2003. **78**(5): p. 517-24.
89. Stone, N., et al., *Raman spectroscopy for identification of epithelial cancers*. Faraday Discuss, 2004. **126**: p. 141-57.
90. Huang, Z., et al., *Near-infrared Raman spectroscopy for optical diagnosis of lung cancer*. Int J Cancer, 2003. **107**(6): p. 1047-52.
91. Naumann, D., *Infrared and NIR Raman spectroscopy in medical microbiology*. BIOS '98 International Biomedical Optics Symposium. Vol. 3257. 1998: SPIE.
92. Schulz, H. and M. Baranska, *Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy*. Vibrational Spectroscopy, 2007. **43**(1): p. 13-25.
93. Chan, J.W., et al., *Micro-Raman spectroscopy detects individual neoplastic and normal hematopoietic cells*. Biophys J, 2006. **90**(2): p. 648-56.
94. Ruiz-Chica, A.J., et al., *Characterization by Raman spectroscopy of conformational changes on guanine–cytosine and adenine–thymine oligonucleotides induced by aminoxy analogues of spermidine*. Journal of Raman Spectroscopy, 2004. **35**(2): p. 93-100.
95. Kachrimanis, K., D.E. Braun, and U.J. Griesser, *Quantitative analysis of paracetamol polymorphs in powder mixtures by FT-Raman spectroscopy and PLS regression*. J Pharm Biomed Anal, 2007. **43**(2): p. 407-12.
96. Katainen, E., et al., *Quantification of the amphetamine content in seized street samples by Raman spectroscopy*. J Forensic Sci, 2007. **52**(1): p. 88-92.
97. Vo-Dinh, T., L.R. Allain, and D.L. Stokes, *Cancer gene detection using surface-enhanced Raman scattering (SERS)*. Journal of Raman Spectroscopy, 2002. **33**(7): p. 511-516.
98. Ó Faoláin, E., et al., *A study examining the effects of tissue processing on human tissue sections using vibrational spectroscopy*. Vibrational Spectroscopy, 2005. **38**(1): p. 121-127.
99. Lakshmi, R.J., et al., *Tissue Raman Spectroscopy for the Study of Radiation Damage: Brain Irradiation of Mice*. Radiation Research, 2002. **157**(2): p. 175-182.

100. Harley, J.C., N. Suchowerska, and D.R. McKenzie, *Cancer treatment with gas plasma and with gas plasma-activated liquid: positives, potentials and problems of clinical translation*. *Biophysical reviews*, 2020. **12**(4): p. 989-1006.
101. Stylianou, E., et al., *Isolation, culture and characterization of human peritoneal mesothelial cells*. *Kidney International*, 1990. **37**(6): p. 1563-1570.
102. Liu, F.Y., S.B. Duan, and Z.G. Long, *Culture and characterization of human peritoneal mesothelial cells*. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2001. **26**(4): p. 321-4.
103. Fang, C.C., et al., *Pentoxifylline inhibits human peritoneal mesothelial cell growth and collagen synthesis: effects on TGF-beta*. *Kidney Int*, 2000. **57**(6): p. 2626-33.
104. Chung-Welch, N., et al., *Human omental microvascular endothelial and mesothelial cells: characterization of two distinct mesodermally derived epithelial cells*. *Microvasc Res*, 1997. **54**(2): p. 108-20.
105. Yáñez-Mó, M., et al., *Peritoneal Dialysis and Epithelial-to-Mesenchymal Transition of Mesothelial Cells*. *New England Journal of Medicine*, 2003. **348**(5): p. 403-413.
106. Yamamoto, T., et al., *Morphological studies of mesothelial cells in CAPD effluent and their clinical significance*. *American Journal of Kidney Diseases*, 1998. **32**(6): p. 946-952.
107. Chan, T.M., et al., *Different effects of amino acid-based and glucose-based dialysate from peritoneal dialysis patients on mesothelial cell ultrastructure and function*. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2003. **18**(6): p. 1086-1094.
108. Betjes, M.G., et al., *The mesothelial cells in CAPD effluent and their relation to peritonitis incidence*. *Perit Dial Int*, 1991. **11**(1): p. 22-6.
109. Fetsch, P.A., A. Sirmsir, and A. Abati, *Comparison of antibodies to HBME-1 and calretinin for the detection of mesothelial cells in effusion cytology*. *Diagnostic Cytopathology*, 2001. **25**(3): p. 158-161.
110. Czernobilsky, B., et al., *Co-expression of Cytokeratin and Vimentin Filaments in Mesothelial, Granulosa and Rete Ovarii Cells of the Human Ovary*. *European Journal of Cell Biology*, 1985. **37**: p. 175-190.
111. van Hinsbergh, V.W., et al., *Characterization and fibrinolytic properties of human omental tissue mesothelial cells. Comparison with endothelial cells*. *Blood*, 1990. **75**(7): p. 1490-7.
112. Makin, C.A., L.G. Bobrow, and W.F. Bodmer, *Monoclonal antibody to cytokeratin for use in routine histopathology*. *Journal of Clinical Pathology*, 1984. **37**(9): p. 975.
113. Von Koskull, H. and I. Virtanen, *Induction of cytokeratin expression in human mesenchymal cells*. *Journal of Cellular Physiology*, 1987. **133**(2): p. 321-329.
114. Moll, R., et al., *The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells*. *Cell*, 1982. **31**(1): p. 11-24.
115. Yang, A.H., J.Y. Chen, and J.K. Lin, *Myofibroblastic conversion of mesothelial cells*. *Kidney International*, 2003. **63**(4): p. 1530-1539.

116. Lugli, A., et al., *Calretinin expression in human normal and neoplastic tissues: a tissue microarray analysis on 5233 tissue samples*. Human Pathology, 2003. **34**(10): p. 994-1000.
117. Harvey, W. and P.L. Amlot, *Collagen production by human mesothelial cells in vitro*. The Journal of Pathology, 1983. **139**(3): p. 337-347.
118. Marzi, J., et al., *Non-invasive functional molecular phenotyping of human smooth muscle cells utilized in cardiovascular tissue engineering*. Acta Biomater, 2019. **89**: p. 193-205.
119. Brauchle, E. and K. Schenke-Layland, *Raman spectroscopy in biomedicine - non-invasive in vitro analysis of cells and extracellular matrix components in tissues*. Biotechnology journal, 2013. **8**(3): p. 288-297.
120. Gaifulina, R., et al., *Label-free Raman spectroscopic imaging to extract morphological and chemical information from a formalin-fixed, paraffin-embedded rat colon tissue section*. International journal of experimental pathology, 2016. **97**(4): p. 337-350.
121. Parlatan, U., et al., *Raman spectroscopy as a non-invasive diagnostic technique for endometriosis*. Scientific Reports, 2019. **9**(1): p. 19795.
122. Falk, P., et al., *An ex vivo model using human peritoneum to explore mesh-tissue integration*. Biology open, 2017. **6**(9): p. 1391-1395.
123. Jayne, D.G., et al., *A three-dimensional in-vitro model for the study of peritoneal tumour metastasis*. Clinical & Experimental Metastasis, 1999. **17**(6): p. 515-523.
124. Low, L.A., et al., *Organs-on-chips: into the next decade*. Nature Reviews Drug Discovery, 2021. **20**(5): p. 345-361.
125. Kössi, J., et al., *The effect of 4% icodextrin solution on adhesiolysis surgery time at the Hartmann's reversal: a pilot, multicentre, randomized control trial vs lactated Ringer's solution*. Colorectal Dis, 2009. **11**(2): p. 168-72.
126. Menzies, D., et al., *Use of icodextrin 4% solution in the prevention of adhesion formation following general surgery: from the multicentre ARIEL Registry*. Ann R Coll Surg Engl, 2006. **88**(4): p. 375-82.
127. diZerega, G.S., J. Coad, and J. Donnez, *Clinical evaluation of endometriosis and differential response to surgical therapy with and without application of Oxiplex/AP* adhesion barrier gel*. Fertil Steril, 2007. **87**(3): p. 485-9.
128. Mais, V., et al., *Reduction of postoperative adhesions with an auto-crosslinked hyaluronan gel in gynaecological laparoscopic surgery: a blinded, controlled, randomized, multicentre study*. Hum Reprod, 2006. **21**(5): p. 1248-54.
129. Krämer, B., et al., *Peritoneal Adhesions and their Prevention - Current Trends*. Surg Technol Int, 2021. **38**: p. 221-233.
130. Fazio, V.W., et al., *Reduction in adhesive small-bowel obstruction by Seprafilm adhesion barrier after intestinal resection*. Dis Colon Rectum, 2006. **49**(1): p. 1-11.
131. Becker, J.M., et al., *Prevention of postoperative abdominal adhesions by a sodium hyaluronate-based bioresorbable membrane: a prospective,*

- randomized, double-blind multicenter study.* J Am Coll Surg, 1996. **183**(4): p. 297-306.
132. Vrijland, W.W., et al., *Fewer intraperitoneal adhesions with use of hyaluronic acid-carboxymethylcellulose membrane: a randomized clinical trial.* Ann Surg, 2002. **235**(2): p. 193-9.
 133. Mettler, L., et al., *Prospective clinical trial of SprayGel as a barrier to adhesion formation: an interim analysis.* J Am Assoc Gynecol Laparosc, 2003. **10**(3): p. 339-44.
 134. Ahmad, G., et al., *Barrier agents for adhesion prevention after gynaecological surgery.* Cochrane Database Syst Rev, 2008(2): p. Cd000475.
 135. Metwally, M., et al., *Fluid and pharmacological agents for adhesion prevention after gynaecological surgery.* Cochrane Database Syst Rev, 2006(2): p. Cd001298.
 136. Foest, R., et al., *Non-thermal atmospheric pressure discharges for surface modification.* Plasma Physics and Controlled Fusion, 2005. **47**(12B): p. B525-B536.
 137. Brethnach, R., et al., *Evaluation of the effectiveness of kINPen Med plasma jet and bioactive agent therapy in a rat model of wound healing.* Biointerphases, 2018. **13**(5): p. 051002.
 138. Yan, D., et al., *Principles of using Cold Atmospheric Plasma Stimulated Media for Cancer Treatment.* Scientific Reports, 2015. **5**(1): p. 18339.
 139. Sato, Y., et al., *Effect of Plasma-Activated Lactated Ringer's Solution on Pancreatic Cancer Cells In Vitro and In Vivo.* Annals of Surgical Oncology, 2018. **25**(1): p. 299-307.
 140. Takeda, S., et al., *Intraperitoneal Administration of Plasma-Activated Medium: Proposal of a Novel Treatment Option for Peritoneal Metastasis From Gastric Cancer.* Annals of Surgical Oncology, 2017. **24**(5): p. 1188-1194.
 141. Bekeschus, S., et al., *The plasma jet kINPen – A powerful tool for wound healing.* Clinical Plasma Medicine, 2016. **4**(1): p. 19-28.
 142. Arndt, S., et al., *Cold Atmospheric Plasma (CAP) Changes Gene Expression of Key Molecules of the Wound Healing Machinery and Improves Wound Healing In Vitro and In Vivo.* PLOS ONE, 2013. **8**(11): p. e79325.
 143. Bourdens, M., et al., *Short exposure to cold atmospheric plasma induces senescence in human skin fibroblasts and adipose mesenchymal stromal cells.* Scientific Reports, 2019. **9**(1): p. 8671.
 144. Nakamura, K., et al., *Novel Intraperitoneal Treatment With Non-Thermal Plasma-Activated Medium Inhibits Metastatic Potential of Ovarian Cancer Cells.* Scientific Reports, 2017. **7**(1): p. 6085.
 145. Cheng, Y.-J., et al., *Plasma-activated medium as adjuvant therapy for lung cancer with malignant pleural effusion.* Scientific reports, 2020. **10**(1): p. 18154-18154.
 146. Siu, A., et al., *Differential Effects of Cold Atmospheric Plasma in the Treatment of Malignant Glioma.* PLOS ONE, 2015. **10**(6): p. e0126313.
 147. Von Woedtke, T., et al., *Plasma Medicine: A Field of Applied Redox Biology.* In Vivo, 2019. **33**(4): p. 1011.

148. Xu, X., et al., *Role of mast cells and myofibroblasts in human peritoneal adhesion formation*. *Annals of surgery*, 2002. **236**(5): p. 593-601.
149. Liou, G.-Y. and P. Storz, *Reactive oxygen species in cancer*. *Free Radical Research*, 2010. **44**(5): p. 479-496.
150. Torii, K., et al., *Effectiveness of plasma treatment on gastric cancer cells*. *Gastric Cancer*, 2015. **18**(3): p. 635-643.
151. Tanaka, H., et al., *Plasma-Activated Medium Selectively Kills Glioblastoma Brain Tumor Cells by Down-Regulating a Survival Signaling Molecule, AKT Kinase*. 2011. **1**(3-4): p. 265-277.
152. Ambrosio, S., et al., *Cell cycle-dependent resolution of DNA double-strand breaks*. *Oncotarget*, 2015. **7**(4).
153. Judée, F., et al., *Short and long time effects of low temperature Plasma Activated Media on 3D multicellular tumor spheroids*. *Scientific Reports*, 2016. **6**(1): p. 21421.
154. Plewa, J.-M., et al., *Low-temperature plasma-induced antiproliferative effects on multi-cellular tumor spheroids*. *New Journal of Physics*, 2014. **16**(4): p. 043027.
155. Bekeschus, S., et al., *Elevated H2AX Phosphorylation Observed with kINPen Plasma Treatment Is Not Caused by ROS-Mediated DNA Damage but Is the Consequence of Apoptosis*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019. **2019**: p. 8535163.
156. Marzi, J., et al., *Noninvasive Physical Plasma as Innovative and Tissue-Preserving Therapy for Women Positive for Cervical Intraepithelial Neoplasia*. *Cancers*, 2022. **14**(8): p. 1933.
157. Arndt, S., et al., *Cold atmospheric plasma, a new strategy to induce senescence in melanoma cells*. *Experimental Dermatology*, 2013. **22**(4): p. 284-289.
158. Shi, X., et al., *Effect of Cold Plasma on Cell Viability and Collagen Synthesis in Cultured Murine Fibroblasts*. *Plasma Science and Technology*, 2016. **18**(4): p. 353-359.
159. Vandamme, M., et al., *ROS implication in a new antitumor strategy based on non-thermal plasma*. *International Journal of Cancer*, 2012. **130**(9): p. 2185-2194.
160. Yan, X., et al., *On the Mechanism of Plasma Inducing Cell Apoptosis*. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 2010. **38**(9): p. 2451-2457.
161. Ahn, H.J., et al., *Atmospheric-Pressure Plasma Jet Induces Apoptosis Involving Mitochondria via Generation of Free Radicals*. *PLOS ONE*, 2011. **6**(11): p. e28154.
162. Ishaq, M., M. Evans, and K. Ostrikov, *Effect of atmospheric gas plasmas on cancer cell signaling*. *International Journal of Cancer*, 2014. **134**(7): p. 1517-1528.
163. Cadenas, E., *Mitochondrial free radical production and cell signaling*. *Mol Aspects Med*, 2004. **25**(1-2): p. 17-26.
164. Simon, H.U., A. Haj-Yehia, and F. Levi-Schaffer, *Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction*. *Apoptosis*, 2000. **5**(5): p. 415-8.
165. Nicco, C., et al., *Differential modulation of normal and tumor cell proliferation by reactive oxygen species*. *Biomed Pharmacother*, 2005. **59**(4): p. 169-74.

166. Hamouda, I., et al., *Selectivity of direct plasma treatment and plasma-conditioned media in bone cancer cell lines*. Scientific Reports, 2021. **11**(1): p. 17521.
167. Habib, S.A., et al., *Anti-apoptotic effect of vinpocetine on cisplatin-induced hepatotoxicity in mice: The role of Annexin-V, Caspase-3, and Bax*. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 2020. **34**(10): p. e22555.
168. van Nieuwenhuijze, A.E.M., et al., *Time between onset of apoptosis and release of nucleosomes from apoptotic cells: putative implications for systemic lupus erythematosus*. Annals of the Rheumatic Diseases, 2003. **62**(1): p. 10.
169. Vermes, I., et al., *A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V*. Journal of Immunological Methods, 1995. **184**(1): p. 39-51.
170. Ryder, A.G., G.M. O'Connor, and T.J. Glynn, *Identifications and quantitative measurements of narcotics in solid mixtures using near-IR Raman spectroscopy and multivariate analysis*. Journal of Forensic Sciences, 1999. **44**: p. 1013-1019.
171. Kister, G., et al., *Structural characterization and hydrolytic degradation of solid copolymers of d,l-lactide-co-ε-caprolactone by Raman spectroscopy*. Polymer, 2000. **41**(3): p. 925-932.
172. Movasaghi, Z., S. Rehman, and I.U. Rehman, *Raman Spectroscopy of Biological Tissues*. Applied Spectroscopy Reviews, 2007. **42**(5): p. 493-541.
173. Talari, A.C.S., et al., *Raman Spectroscopy of Biological Tissues*. Applied Spectroscopy Reviews, 2015. **50**(1): p. 46-111.
174. Brauchle, E., et al., *Cell death stages in single apoptotic and necrotic cells monitored by Raman microspectroscopy*. Scientific Reports, 2014. **4**(1): p. 4698.
175. Reiazi, R., et al., *Application of Cold Atmospheric Plasma (CAP) in Cancer Therapy: A Review*. 2017. **10**(3): p. e8728.
176. Partecke, L.I., et al., *Tissue tolerable plasma (TTP) induces apoptosis in pancreatic cancer cells in vitro and in vivo*. BMC cancer, 2012. **12**: p. 473-473.
177. Wang, S., et al., *Use of Raman Spectroscopy and Phase-Contrast Microscopy To Characterize Cold Atmospheric Plasma Inactivation of Individual Bacterial Spores*. Applied and Environmental Microbiology, 2016. **82**(19): p. 5775-5784.
178. Krafft, C., et al., *Near infrared Raman spectra of human brain lipids*. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2005. **61**(7): p. 1529-35.
179. Binoy, J., et al., *NIR-FT Raman and FT-IR spectral studies and ab initio calculations of the anti-cancer drug combretastatin-A4*. Journal of Raman Spectroscopy, 2004. **35**(11): p. 939-946.
180. Stone, N., et al., *Near-infrared Raman spectroscopy for the classification of epithelial pre-cancers and cancers*. Journal of Raman Spectroscopy, 2002. **33**(7): p. 564-573.

181. Gniadecka, M., et al., *Diagnosis of Basal Cell Carcinoma by Raman Spectroscopy*. Journal of Raman Spectroscopy, 1997. **28**(2-3): p. 125-129.
182. Wood, B.R., et al., *FTIR microspectroscopic study of cell types and potential confounding variables in screening for cervical malignancies*. Biospectroscopy, 1998. **4**(2): p. 75-91.
183. Sigurdsson, S., et al., *Detection of skin cancer by classification of Raman spectra*. IEEE Trans Biomed Eng, 2004. **51**(10): p. 1784-93.
184. Agarwal, R., P. Tandon, and V.D. Gupta, *Phonon dispersion in poly(dimethylsilane)*. Journal of Organometallic Chemistry, 2006. **691**(13): p. 2902-2908.
185. Mordechai, S., et al., *Possible common biomarkers from FTIR microspectroscopy of cervical cancer and melanoma*. J Microsc, 2004. **215**(Pt 1): p. 86-91.

8 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde am Department für Frauengesundheit Tübingen, sowie am NMI Naturwissenschaftliches und Medizinisches Institut an der Universität Tübingen in Reutlingen und dem Institute of Biomedical Engineering Tübingen unter der Betreuung von Prof. Dr. Martin Weiss durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Martin Weiss (Doktorvater).

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Labormitglieder (Laura Schultze-Rhonhof, Anna-Lena Keller, Nora Feuerer, Lucas Becker, Dr. rer. nat. Julia Marzi und Prof. Dr. Martin Weiss) von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig, nach Rücksprache mit Prof. Dr. Martin Weiss durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

Myriam Johanna Holl

9 Veröffentlichungen

Biomedicines - 02/2021

Holl M, Becker L, Keller AL, Feuerer N, Marzi J, Carvajal Berrio DA, Jakubowski P, Neis F, Pauluschke-Fröhlich J, Brucker SY, Schenke-Layland K, Krämer B, Weiss M. Laparoscopic Peritoneal Wash Cytology-Derived Primary Human Mesothelial Cells for In Vitro Cell Culture and Simulation of Human Peritoneum. doi: 10.3390/biomedicines9020176.

Biomedicines - 04/2022

Holl M, Rasch ML, Becker L, Keller AL, Schulze-Rhonhoff L, Ruoff F, Templin M, Keller S, Neis F, Keßler F, Andress J, Bachmann C, Krämer B, Schenke-Layland K, Brucker SY, Marzi J, Weiss M. Cell Type-Specific Anti-Adhesion Properties of Peritoneal Cell Treatment with Plasma-Activated Media (PAM). doi: 10.3390/biomedicines10040927.

Danksagung

Ich bedanke mich bei allen, die mich während meiner Laborzeit begleitet haben und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden sind.

Mein besonderer Dank gilt dabei meinem Doktorvater Prof. Dr. Martin Weiss für die exzellente Förderung, Betreuung und Unterstützung während der Forschungsarbeit.

Außerdem danke ich den aktiven und ehemaligen Mitgliedern des NMI und der AG Prof. Schenke-Layland, die mich bestmöglich unterstützt haben. Mein Dank gilt zudem der deutschen Forschungsgemeinschaft DFG für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Graduiertenkollegs GRK 2543 „Intraoperative multisensorische Gewebedifferenzierung“.

Ausdrücklich danken möchte ich an dieser Stelle Laura Schultze-Rhonhof, Anna-Lena Keller, Marie-Lena Rasch und Lucas Becker.