

Charakterisierung regenerativer Effekte auf ein Gewebemodell mit Netzimplantat durch die Behandlung mit Nicht-Invasivem Physikalischem Plasma

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med. dent.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Armin Babak

aus Köln

2025

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD. Dr. Dr. med. Matthias Stope
2. Gutachter: Prof. Dr. em. Matthias Frentzen

Tag der mündlichen Prüfung: 10.09.2025

Aus der Klinik für Gynäkologie und Gynäkologische Onkologie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung.....	8
1.1 Nicht-invasives physikalisches Plasma (NIPP)	8
1.2 Das Plasma Care®	10
1.3 Netzümplantate in der Hernienchirurgie.....	12
1.4 Das Optilene® Mesh Elastic	15
2. Zielsetzung	17
3. Material und Methoden.....	19
3.1 Materialien	19
3.1.1 Zelllinien.....	19
3.1.2 Geräte.....	19
3.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	20
3.1.4 Lösungen und Chemikalien	22
3.1.5 Zellkulturmedien- und Zusätze	22
3.2 Methoden	23
3.2.1 Kultivierung, Ernte und Passage von Zellen.....	23
3.2.2 NIPP-Behandlung mittels Plasma Care® und Zellzahlbestimmung	24
3.2.3 NIPP-Behandlung der 2-D-Kokultur.....	25
3.2.4 Integration von Netzümplantaten in Monokulturen	26
3.2.5 Integration von Netzümplantaten in NIPP-behandelter 2-D-Kokulturen	26
3.2.6 Etablierung eines direkten 3-D-Kokultur-Modells	27
3.2.7 D-Glukosemessung von Kulturmedien der 3-D-Kokulturen.....	28

3.2.8 NIPP-Behandlung von 3-D-Kokulturen mit integrierten Netziplantaten	30
3.2.9 Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Netziplantate	31
3.2.10 Quantifizierung der Zellzahl auf den Netziplantaten	33
3.2.11 Statistische Auswertung	36
4. Ergebnisse	37
4.1 Einfluss von NIPP auf die Zellproliferation	37
4.1.1 Wirkung von NIPP auf HGF-1-Zellen	37
4.1.2 Wirkung von NIPP auf MCF-7-Zellen	38
4.2. Etablierung einer 2-D-Kokultur und der Einfluss von NIPP auf ihr Wachstum	39
4.3 Einfluss von Netziplantaten auf Monokulturen	40
4.3.1 Einfluss von Netziplantaten auf HGF-1-Zellen	41
4.3.2 Einfluss von Netziplantaten auf MCF-7-Zellen	41
4.4. Einfluss von NIPP auf die 2-D-Kokultur mit Netziplantat	44
4.5. Charakterisierung einer 3-D-Kokultur aus HGF-1- und MCF-7-Zellen	46
4.5.1 Mikroskopische Analyse der 3-D-Kokultur	46
4.5.2 Stoffwechsellnachweis der 3-D-Kokultur	47
4.6. Einfluss von NIPP auf die 3-D-Kokultur mit Netziplantat	49
4.7. Fluoreszenzmikroskopische Analyse von Netziplantaten mittels DAPI	52
4.7.1 Untersuchung der Netziplantate auf Autofluoreszenz im UV-Bereich	52
4.7.2. Darstellung von Zellen auf den Netziplantaten mittels DAPI	54
4.8. Fluoreszenzmikroskopische Analyse von Netziplantaten mittels Falloidin	56
4.8.1 Untersuchung der Netziplantate auf Autofluoreszenz im blauen Bereich	56
4.8.2 Darstellung von Zellen auf den Netziplantaten mittels Falloidin	58
4.9. Quantifizierung der Zellen auf den Netziplantaten	59

4.9.1 Quantifizierung der Zellen mittel Neubauer-Zählkammer	59
4.9.2 Quantifizierung der Zellen mittels EVE™	60
4.9.3 Quantifizierung der Zellen mittels CASY	61
5. Diskussion	63
5.1. NIPP inhibiert das Wachstum der MCF-7-Zellen	63
5.2 NIPP führt zur leichten Wachstumsstimulation der HGF-1-Zellen	63
5.3 Regenerative Effekte von NIPP wurden bereits erfolgreich angewendet	64
5.4 Relevanz regenerativer Effekte von NIPP an Netzümplantaten	65
5.5 Charakterisierung eines Gewebemodells mittels direktem 3-D-Kokultur-Modell ...	66
5.6 Zellbesiedlung der Netzümplantate.....	67
5.7 Fluoreszenzmikroskopische Analyse ermöglicht keine Quantifizierung	67
5.8 NIPP fördert das Zellwachstum auf Netzümplantaten	68
5.9 Methodenkritik, Klinische Bedeutung und Ausblick	70
6. Anhang	73
7. Zusammenfassung.....	74
8. Abbildungsverzeichnis.....	75
9. Tabellenverzeichnis.....	77
10. Literaturverzeichnis	78
11. Erklärung zum Eigenanteil	89
12. Veröffentlichungen	90
13. Danksagung	91

Abkürzungsverzeichnis

2-D	Zweidimensional
3-D	Dreidimensional
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
C.	Candida
CE	Conformité Européenne
CHX	Chlorhexidin
d	Schichtdicke
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
Df	Reagenzverdünnungsfaktor
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
ε	Extinktionskoeffizient
E.	Escherichia coli
E1/E2	Extinktionsfaktor ^{1/2}
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F-Aktin	Filament-Aktin
FBS	Fetal Bovine Serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
G6P-DH	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
H ⁺	Proton/Wasserstoff-Kation
HGF-1	Human Gingival Fibroblast

HK	Hexokinase
Ktrl	Kontrolle
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7 Cells
MG	Molekulargewicht
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus
NIPP	Nicht-invasives physikalisches Plasma
P	Signifikanzniveau
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
S.	Seiten
s.	siehe
SD	Standardabweichung
SMD	Surface micro-discharge
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken

1. Einleitung

1.1 Nicht-invasives physikalisches Plasma (NIPP)

Unter nicht-invasives Physikalisches Plasma (NIPP) versteht man ein hoch reaktives Gas, welches im Vergleich zu natürlich vorkommenden physikalischen Plasmen wie der Sonne oder den Sternen eine deutlich niedrigere Temperatur von maximal 45 °C erreicht und somit seine Anwendung am Menschen ermöglicht (Gerling et al. 2016, Lee et al. 2009). Physikalisch besteht NIPP aus verschiedenen geladenen Teilchen wie freien Elektronen und Ionen sowie angeregten Molekülen und Radikalen, die in der Gasphase nebeneinander vorliegen und in ständiger Wechselwirkung untereinander und mit ihrer Umgebung stehen, wobei sich über ein bestimmtes Volumen gemittelt eine neutrale elektrische Ladung ergibt (Yan et al. 2017). Aufgrund seiner Eigenschaften wird es auch häufig als vierter Aggregatzustand bezeichnet (Gay-Mimbrera et al. 2016).

NIPP kann aus einem Gas gebildet werden, dem große Energie zugeführt wird, wie etwa Argon, Stickstoff, Helium oder selbst die Umgebungsluft (Conrads et al. 2000). In den letzten Jahrzehnten wurde NIPP intensiv zur biomedizinischen Anwendung erforscht und kam bereits in einem breiten Indikationsspektrum zum Einsatz, darunter zur Desinfektion und Sterilisation (Von Woedtke et al. 2008, Ziuzina et al. 2000) und zur Stimulation der Wundheilung akuter und chronischer Wunden (Arndt et al. 2013, Badr et al. 2023, Heinlein et al. 2011 und 2013, Isbary et al. 2010 und 2012). NIPP hat eine hohe bakterizide Effektivität ähnlich der von CHX und wird nicht nur in der Industrie zur Sterilisation und Desinfektion verwendet, sondern auch zur Bekämpfung von Wundpathogenen (Badr et al. 2023, Theinkom et al. 2019). Des Weiteren zeichnet sich NIPP durch eine behandlungszeitabhängige antiproliferative Wirkung auf zahlreiche Karzinomzellen aus und wird daher als eine neue Behandlungsmöglichkeit in der Tumorthherapie diskutiert (Koensgen et al. 2017, Nietsch 2020, Stope et al. 2020, Xia et al. 2019, Yan et al. 2017). Der Wirkmechanismus ist bis heute nicht vollständig geklärt und Gegenstand aktueller Forschung. Allerdings wird die antiproliferative Wirkung von NIPP durch die Ausbildung von Mikroporen in der eukaryotischen und prokaryotischen Membran über physikalische sowie chemische Prozesse erklärt. So können die reaktiven Sauerstoffspezies, die durch die Reaktion des NIPP mit Molekülen der Umgebungsluft entstehen, über die Poren in die Zelle diffundieren und so durch Einleitung von DNA-Oxidation und DNA-

Doppelstrangbrüche die Zellen abtöten (Helmka 2009, Leduc et al. 2009, Yonson et al. 2006).

Allerdings konnte bislang kein negativer Einfluss von NIPP auf die Zellphysiologie sowie Vitalität gesunder humaner Zellen nachgewiesen werden. Krebszellen und Mikroorganismen reagieren deutlich sensibler auf NIPP (Arndt et al. 2015, Isbary et al. 2012, Kluge et al. 2016, Schmidt et al. 2017, Stope et al. 2020). Vermutlich ist bei gesunden menschlichen Zellen die DNA durch die intakten zellulären Reparaturmechanismen besser geschützt (Von Woedtke et al. 2016). Bei kurzen Behandlungszeiten wurden sogar regenerative Effekte auf gesunden menschlichen Zellen beobachtet, die für die Wundheilung gewünscht sind. Wachstumsfördernde Wirkungen von NIPP auf Gingivazellen, Zementoblasten sowie Knochenzellen konnten nachgewiesen werden (Evert et al. 2021).

In dieser Arbeit liegt der Fokus auf den regenerativen Effekten von NIPP. Diese wurden bereits in zahlreichen Studien vor allem in der Dermatologie, aber auch in der Zahnmedizin nachgewiesen. In der Zahnmedizin fördert NIPP die Heilung von parodontalen Erkrankungen und führt zur signifikanten Abnahme parodontaler Leitkeime (Kleineidam et al. 2020, Stope et al. 2020). Es fördert die Einheilung von Implantaten unter anderem durch Besserung der Oberflächenhydrophilie (Eggers et al. 2020, Zheng et al. 2020) sowie die Heilung intraoraler Wunden (Eggers et al. 2020 und 2022). In der Dermatologie konnten verbesserte Behandlungsergebnisse durch die Anwendung von NIPP festgestellt werden, einschließlich der erfolgreichen Behandlung diabetischer Wunden (Badr et al. 2023), akuter und chronischer schwer heilender Wunden (Arndt et al. 2013, Hämmerle et al. 2023, Heinlein et al. 2013, Van Welzen et al. 2021), Verringerung des Schweregrads einer Strahlendermatitis (Djonckheere et al. 2023) sowie bei der Therapie von Onychomykosen (Scheper et al. 2021).

Die regenerativen Effekte wurden durch Senkung des pH-Wertes des Wundbereiches, Verkleinerung der Wundfläche sowie geringere Anzeichen einer Wundinfektion nachgewiesen. Ursache für den positiven Einfluss auf die Wundheilung sind verbesserte Sauerstoffsättigung, Hämoglobinverteilung und Gewebewasserverteilung (Van Welzen et al. 2021). Andere Studien zeigten eine Förderung der Reepithelialisierung, Senkung von Blutkrusten und Fibrinschichten sowie die Freisetzung von Zytokinen, die das

Zellwachstum und die Angiogenese stimulieren (Heinlein et al. 2011). Die schmerzfreie Behandlung und das Fehlen unerwünschter Therapiewirkungen machen die NIPP-Anwendung in der Medizin sehr attraktiv.

1.2 Das Plasma Care®

Das Plasma Care® ist ein tragbares, akkubetriebenes NIPP-Medizingerät, entwickelt von der Terraplasma Medical GmbH. Das Gerät besteht aus dem Gehäuse mit einem Touch-Button zum Ein- und Ausschalten, einer Plasmaquelle sowie einem sterilem Einweg-Abstandhalter. Es ist CE-zertifiziert und zur Anwendung bei entzündlichen und infektiösen Hauterkrankungen zugelassen. Das Plasma wird bei Atmosphärendruck und Raumtemperatur erzeugt. Die Plasmaquelle besteht aus einer Hochspannungselektrode, einem Dielektrikum und einer geerdeten strukturierten Elektrode. Basierend auf der Surface Micro-Discharge (SMD)-Technologie erzeugt das Anlegen einer Hochspannung von 3,5 kV Tausende von Mikroentladungen, die Umgebungsluft in NIPP umwandeln, ohne zusätzliche Trägergase. Diese plasmaaktivierte Luft enthält ROS, die für die antibakterielle und wundheilungsfördernde Wirkung des Geräts verantwortlich sind. Das erzeugte NIPP tritt durch den sterilen Einweg-Abstandhalter von der Plasmaquelle zur behandelten Oberfläche aus. Aktuell wird es insbesondere in der Dermatologie zur Behandlung von Wundflächen angewendet und zeichnet sich durch eine vollständig schmerzfreie und komplikationslose Behandlung aus. Die Behandlungsfläche beträgt 4 x 4 cm, und es werden Behandlungszeiten von 60 Sekunden pro Wundbereich bis zu 2–3-mal wöchentlich empfohlen (Terraplasma Medical 2024).

Zahlreiche präklinische Tests haben eine effiziente antimikrobielle Wirkung des Plasma Care® gegenüber zahlreichen Bakterienstämmen, Pilzen und Keimen, darunter *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, MRSA, VRE und *C. albicans*, gezeigt (Bernhardt et al. 2019, Bourke et al. 2017, Isbary et al. 2010). Dadurch bietet es eine alternative Behandlungsmöglichkeit zu Medikamenten wie Antibiotika, wodurch Resistenzen, Allergien und unerwünschte Nebenwirkungen reduziert werden. Auch die regenerativen Effekte durch die Förderung der Wundheilung von akuten sowie chronischen Wunden wurden bereits in zahlreichen klinischen Studien nachgewiesen (Arndt et al. 2013, Djonckheere et al. 2023, Hämmerle et al. 2023, Scheper et al. 2021). In einer diabetologischen Praxis konnte anhand von 10 Fallstudien eine signifikante Unterstützung

der Heilung von diabetischen Wunden beobachtet werden (Arndt et al. 2013). In einer weiteren Studie wurde festgestellt, dass bereits nach 1 min Behandlung mit dem Plasma Care® der pH-Wert der Wundbereiche gesenkt wurde, was zu einer signifikanten Verkleinerung der Wundfläche und Verringerung von Wundinfektionen führte (Hämmerle et al. 2023). Auch die Behandlung bestrahlter Brüste von 30 Patienten mit dem Plasma Care® konnte den Schweregrad der Strahlendermatitis sowie die akute strahleninduzierte Hauttoxizität verringern (Djonckheere et al. 2023).

Die Anwendung des Geräts ist jedoch momentan auf oberflächliche Wunden im Bereich unterhalb des Halses begrenzt. Die Anwendung in chirurgischen offenen Bereichen, Schleimhäuten sowie Wunden mit starken und akuten Blutungen ist aufgrund fehlender Studienlage kontraindiziert (terraplasma Medical 2024).

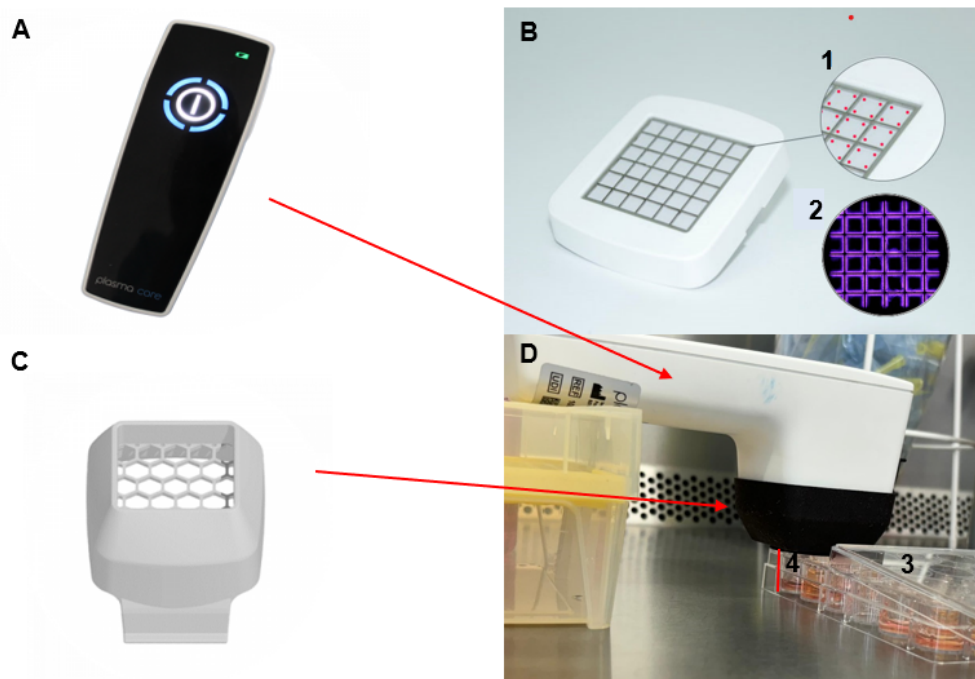


Abb. 1: Das Plasma Care® (terraplasma Medical 2024)

Das NIPP-Medizingerät Plasma Care® besteht aus einem Gehäuse mit dem Touch-Button zum Ein- und Ausschalten (A), einer Plasmaquelle (B) die über Mikroentladungen (1) das Plasma (2) erzeugt und einem sterilen Einweg-Abstandhalter (C), welche die Kontaktfläche zur Behandlungsoberfläche bildet. Zur Behandlung von Kulturen in 24-Well-Platten (3) wird das Plasma Care® nahezu parallel auf das zu behandelnde Well gelegt (D). Der Abstand zwischen dem Abstandhalter und der behandelten Kultur beträgt ca. 2 cm (4).

1.3 Netzimplantate in der Hernienchirurgie

Ein Netzimplantat ist ein synthetisches oder biologisches gestricktes bzw. gewebtes Netz, das zur Versorgung von Hernien und zur vollständigen Deckung der Bauchlücke verwendet wird. Diese Implantate sind weltweit die am häufigsten verwendeten Prothesen in der Leisten- und Narbenhernienchirurgie und werden seit 1958 erfolgreich eingesetzt (Rockenstiehl 2010, Usher et al. 1959).

Eine Hernie wird von der Europäischen Herniengesellschaft als jede Lücke in der Bauchwand, mit oder ohne Vorwölbung im Bereich einer postoperativen Narbe, definiert, die tast- oder erkennbar in einer klinischen Untersuchung oder Bildgebung ist (Korenkov et al. 2021). Mit einer weltweiten Inzidenz von etwa 25 Millionen Fällen pro Jahr, davon 200.000 allein in Deutschland, hat die Hernienchirurgie eine wichtige sozioökonomische Bedeutung (Ritz und Buhr 2006). Mit jährlich ca. 300.000 Operationen zählen Hernienoperationen in Deutschland zu den häufigsten elektiven Eingriffen (Köckerling et al. 2012).

Francis C. Usher war der erste Chirurg, der eine Operationstechnik unter Anwendung von Kunststoffnetzen zur Versorgung von Leisten- und Narbenhernien beschrieb (Usher 1959). Nach dem Zweiten Weltkrieg wurden polymere Netzimplantate zunehmend in der Hernienchirurgie verwendet (Rockenstiehl 2010). In den 70er Jahren entwickelten die französischen Chirurgen Stoppa, Rives, Chevrel und Flament verschiedene Operationstechniken zur Behandlung von Bauchwandhernien mit synthetischen Materialien (Stoppa 1989). Seit den 1990er Jahren haben laparoskopische Operationstechniken die Verwendung von Netzimplantaten weiterverbreitet und ihre Bedeutung gesteigert (Rockenstiehl 2010). Heute sind Netzimplantate aus der Hernienchirurgie nicht mehr wegzudenken.

Der Hintergrund für die Etablierung der Netzimplantate ist die signifikante Senkung der hohen Komplikations- und Rezidivrate in der Hernienchirurgie (Lawson et al. 2015). Die Komplikationsrate in der Hernienchirurgie ist recht hoch, wobei 10% der Patienten mit einem Rezidiv und 12% mit chronischen Leistenschmerzen rechnen müssen (Von Lenzen-Schulte 2016, Von Soleimanian 2008). Durch Netzimplantate konnten besonders bei großen und rezidivierenden Narbenhernien vielversprechende Erfolge

erzielt werden. Die Rezidivraten konnten von 30-50% bei den vormals dominierenden Faszien Doppelungsverschlüssen nach Mayo auf lediglich 2-10% bei den neuen Operationstechniken mit Netzen gesenkt werden (Conze et al. 2005, Dietz et al. 2007, Fleischhacker 2012, Horeyseck 1997, Langer et al. 2005, Paul et al. 1997, Schumpelick et al. 1996). Dies liegt vor allem daran, dass durch den Einsatz von Netzimplantaten neuere und einfachere Operationstechniken möglich wurden, insbesondere die laparoskopischen Methoden, die tendenziell bessere Ergebnisse zeigen (EU Hernia Trialist Collaboration 1999, Friedrich et al. 2008). In Europa besteht mittlerweile Einigkeit darüber, dass Netze zur Stabilisierung standardmäßig eingesetzt werden sollten (Muysoms et al. 2012).

Es gibt über 150 verschiedene Netzimplantatmodelle auf dem Markt, was die Entscheidung für das ideale Netz für den Operateur erschwert (Bittner und Schwarz 2012). Man unterscheidet zwischen synthetischen Netzimplantaten aus Kunststoffpolymeren und biologischen Netzimplantaten aus Kollagenen. Synthetische Netzimplantate haben sich aufgrund ihrer geringeren Rezidivrate in der Reparatur von kontaminierten ventralen Hernien und ihres etwa 200-mal günstigeren Preises durchgesetzt (Campanelli et al. 2004, Engelsman et al. 2008, Rosen et al. 2022). Heute werden hauptsächlich elastische Kunststoffmaterialien verwendet, die sich den Gewebe Anforderungen anpassen und eine deutlich bessere Biokompatibilität aufweisen (Vogels et al. 2017).

In der Hernienchirurgie unterscheidet man bei den synthetischen Netzen zwischen schwergewichtigen ($> 50\text{g/m}^2$) und leichtgewichtigen ($<50\text{g/m}^2$) sowie kleinporigen ($<1\text{mm}$) und großporigen ($>1\text{mm}$) Netzen. Aktuell wird ein leichtgewichtiges, großporiges Netzimplantat aus monofilem Polypropylen als ideal beschrieben (Köckerling et al. 2012, von Soleimanian 2008). Leichtgewichtige Netze führten in klinischen Studien zu geringerer Narbenbildung und somit weniger Schrumpfung, was zu geringeren postoperativen Komplikationen wie Schmerzen oder Serombildungen führte (Köckerling et al. 2012). Großporige Netze werden bevorzugt, da kleinporige Netze eine schlechtere Biokompatibilität aufweisen und zu mehr Narbenbildung sowie schmerzhaften Entzündungsreaktionen führen (Von Soleimanian 2008).

Im Rahmen der Weiterentwicklung optimaler Netzümplantate wurden titanbeschichtete Netze zur Verbesserung der Biokompatibilität entwickelt. Die Anwendung von oberflächenbeschichteten Netzümplantaten mit Titandioxid in der laparoskopischen Hernienchirurgie bringt leichte Vorteile bezüglich postoperativer Komplikationen (Deder 2015).

Unbestritten haben auch synthetische Netzümplantate spezifische Komplikationen wie Sensibilitätsstörungen, chronische Schmerzen (Rosch et al. 2003), Samenstranggranulome (Silich und McSherr 1996), Fisteln (Leber et al. 1998), Seromata (Amid et al. 1994), Steifigkeit bis hin zu Bewegungseinschränkungen (Klinge et al. 1997), Infektionen, Adhäsionen, Dislokationen, viszerale Erosionen und Perforationen (Klosterhafen et al. 2000). Infektionen treten in 4,8% der Fälle postoperativ auf, meist können die Netzümplantate unter entsprechender Therapie mit Antibiose und Wundreinigung im Situs belassen werden und müssen nicht operativ entfernt werden. Dabei handelt es sich meist um iatrogene Infektionen durch inokulierte Hautkeime (Deysine 1998, Langer et al. 2007, Stoppa et al. 1984). Als seltene Komplikation wurde die Verlagerung von intraperitoneal eingebrachten Netzen in die Harnblase und den Darm beschrieben (Soler et al. 1993). Abstoßungsreaktionen wurden nur in Einzelfällen beschrieben (Forsch et al. 1998, Hofbauer et al. 1998).

Eine mögliche Kanzerogenität von Netzümplantaten wird in der Literatur diskutiert (Gray et al. 1994). Bereits in den 40er Jahren wurde in einem Tierexperiment ein Zusammenhang zwischen der Implantation von Kunststoffnetzen und Malignomen, bekannt als Oppenheimer-Effekt, erwähnt (Oppenheimer et al. 1958). In Tierversuchen mit Ratten wurden nach Implantationen von Kunststoffnetzen Fremdkörpergranulome nachgewiesen, allerdings werden diese Ergebnisse stark kritisiert, da bei allen verwendeten Versuchstieren jegliche Fremdkörperimplantation zur Ausbildung von Sarkomen führte (Ott et al. 1963). Wissenschaftliche Arbeiten von V. Schumpelick zeigten jedoch, dass Netzümplantate zwar durch eine erhöhte Zellumsatzrate und anhaltende Stressreaktionen zur Ausbildung chronischer Wunden führen können, diese Erkenntnisse für die Annahme einer potenziellen Kanzerogenität jedoch unzureichend sind (Klosterhafen et al. 2000, Schumpelick und Klinge 2002 und Schumpelick et al. 1999).

Zudem werden weltweit über eine Million Kunststoffnetze jährlich implantiert, und bislang wurden keine malignen Transformationen berichtet

1.4 Das Optilene® Mesh Elastic

Das Optilene® Mesh Elastic (Abb. 2.1) ist ein Netzümplantat aus gestricktem, monofilem Polypropylen, hergestellt von B. Braun. Die Eigenschaften hinsichtlich des Materials und der Struktur entsprechen den Richtlinien der Internationalen Europäischen Herniengesellschaft (von Soleimanian 2008).

Polypropylen wird seit Usher's Arbeiten 1959 in der Hernienchirurgie verwendet, da es nur geringe chronische Entzündungsreaktionen hervorruft (Usher et al. 1959). Es erreicht die Festigkeit von Stahl und zeigt keine langfristige Degradation wie Polyester (Rockenstiehl 2010). Aufgrund seiner komplexen dreidimensionalen Maschenstruktur (Abb. 2.2) und Hydrophilie wird es leicht inkorporiert (Soler et al. 1993). Das Optilene® Mesh Elastic ist stabil (0,44 mm Dicke, 61 N/cm Reißkraft), rundum elastisch, leichtgewichtig (48 g/m²), und extragroßporig (3,2 mm Porengröße) (Braun 2024a). Die großen Poren fördern das Zusammenwachsen mit Narbengewebe und erhalten die Bauchwandmobilität (Campanelli et al. 2004). Es wird für Leistenhernien, primäre Ventralhernien und Narbenhernien verwendet und prophylaktisch bei Risikopatienten eingesetzt, um das Risiko einer Narbenhernie nach Bauchdeckenverschluss zu reduzieren (García-Ureña et al. 2015).

Das Netzümplantat ist in verschiedenen Größen erhältlich, wobei in dieser Arbeit eine Größe von 15 cm x 30 cm verwendet wurde. Das Modell „Blue Striped“ zeichnet sich durch blaue Entfaltungslinien aus, die eine gezielte und einfache Netzplatzierung erlauben (Abb. 2). Zur Fixierung werden Hystoacryl- und Fibrinkleber vom Hersteller angeboten (Braun 2024b).

Wie alle Netzümplantate können auch Polypropylenetze zu Komplikationen führen, wie Adhäsionen und chronischen Fisteln beim Darmkontakt. Während der Einheilung können sie aufgrund der kontraktilen Reaktion der Fibroblasten erheblich schrumpfen (Stoppa et al. 1984), was zu chronischen Verhärtungen, Nervenreizungen, Bewegungseinschränkungen und randständigen Bauchwanddefekten führen kann, die Hernienrezidive verursachen (Klosterhafen et al. 1998).

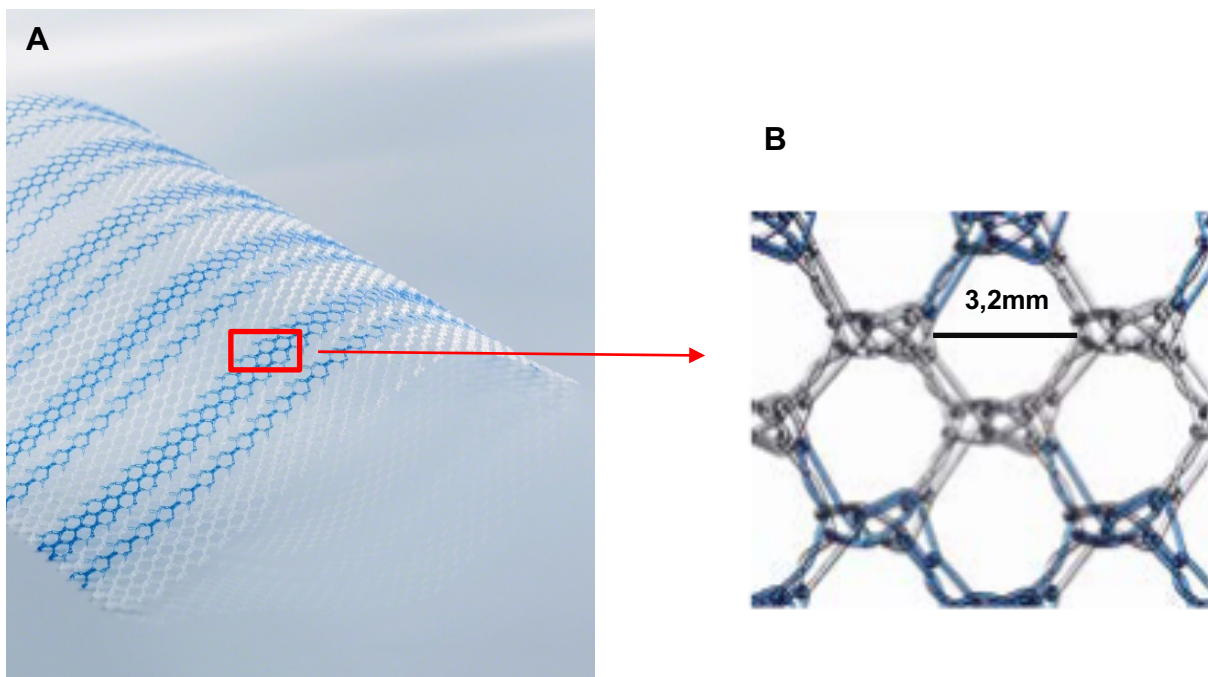


Abb. 2.1: Optilene® Mesh Elastic Blue Striped (Braun 2024a)

Das verwendete Netzümplantat besteht aus gestricktem monofilem Polypropylen, hat blaue Entfaltungslinien und hat eine Größe von 15 x 30 cm (A). Die Porengröße beträgt 3,2 cm (B).



Abb. 2.2: Darstellung des Optilene Netzümplantats in verschiedenen Ebenen

Derselbe Ausschnitt eines Optilene Netzümplantats wurde unter dem Mikroskop bei 10-Facher Vergrößerung bei 3 verschiedene Ebenen fokussiert und fotografiert. In jeder Ebene lässt sich ein anderer Abschnitt scharf darstellen. Dadurch wird die dreidimensionale komplexe Netzstruktur deutlich.

2. Zielsetzung

Jährlich werden in der Hernienchirurgie 300.000 Operationen durchgeführt. Die Patienten leiden häufig an postoperativen Komplikationen, insbesondere treten häufig Rezidive auf (Köckerling et al. 2012, Lawson et al. 2015, Muysoms et al. 2012, Rockenstiehl 2010, von Lenzen-Schulte 2016, von Soleimanian 2008). Mit der Einführung synthetischer Netzümplantate im Jahr 1958 konnten neue Operationstechniken entwickelt und das Rezidivrisiko signifikant gesenkt werden (Usher et al. 1959). Heute sind Netzümplantate die meistverwendeten Prothesen in der Hernienchirurgie. Dennoch verursachen sie auch Komplikationen wie Infektionen und chronische Schmerzen (Amid et al. 1994, Klinge et al. 1997, Leber et al. 1998, Rosch et al. 2003, Silich und McSherr 1996).

NIPP stellt eine innovative Behandlungsmöglichkeit dar. Es wurde bereits erfolgreich in verschiedenen medizinischen Bereichen eingesetzt, und seine antimikrobielle sowie antiproliferative Wirkung gegenüber diversen Tumorzellen wurde in zahlreichen Studien nachgewiesen (Badr et al. 2023, Gay-Mimbrera et al. 2016, Klämpfl et al. 2012, Lee et al. 2009, Maisch et al. 2012a und b, Nietsch 2020, Stope 2020, Stope et al. 2020, Theinkom et al. 2019, von Woedtke et al. 2008, Yan et al. 2017). Der Schwerpunkt aktueller Forschung liegt auf den regenerativen Effekten von NIPP. In der Dermatologie haben NIPP-Geräte positive Effekte auf die Heilung akuter und chronischer Wunden gezeigt (Arndt et al. 2013, Djonckheere et al. 2023, Hämmerle et al. 2023, Heinlein et al. 2013, Scheper et al. 2021, van Welzen et al. 2021). Auch in der Zahnmedizin wurde durch den Einsatz von NIPP ein positiver Einfluss auf das Einwachsen von Zahnimplantaten nachgewiesen (Modic et al. 2019, Park et al. 2012, Zheng et al. 2020). Die potenziell regenerativen Effekte von NIPP machen seinen Einsatz in weiteren medizinischen Bereichen, wie der Hernienchirurgie, interessant.

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der regenerativen Effekte von NIPP auf Gewebe im Hinblick auf das Einwachsen von Netzümplantaten. Dazu wurde ein In-vitro-Gewebemodell aus HGF-1- und MCF-7-Zellen etabliert und für die Interaktion von Zellen und Netzümplantate verwendet. Obwohl das entwickelte Gewebemodell aus zwei verschiedenen Zelllinien mit unterschiedlichem Genotyp besteht und somit als "Organmodell" bezeichnet werden könnte, ähnelt es aufgrund seiner zweischichtigen dreidimensionalen Struktur einem Gewebe sehr.

Anschließend wurde untersucht, ob die NIPP-Behandlung das Wachstum von Gewebe und Zellen auf dem Netziimplantat fördert. Dazu wurden die integrierten Netziimplantate zunächst mikroskopisch und fluoreszenzmikroskopisch analysiert und anschließend die Anzahl der Zellen, die auf den Netziimplantaten gewachsen sind, anhand gewonnener Zellsuspensionen über drei verschiedene Messmethoden quantifiziert.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Zelllinien

Die Zelllinie MCF-7 ist eine Brustkrebs-Zelllinie von einer kaukasischen 69-jährigen Frau, welche die erste Brustzelllinie war, die 1973 erfolgreich von Herbert Soule und sein Team kultiviert wurde. Die Zelllinie behält mehrere Merkmale des differenzierten Brustepithels einschließlich des zytoplasmatischen Östrogenrezeptors (Soule et al. 1973). Die Zellen wachsen zunächst in Monolayer und nach längere Kultivierzeit auch in mehreren Schichten (Siebel 2008).

Die Zelllinie HGF-1 ist eine Zelllinie mit Fibroblastenmorphologie, die 1989 aus der Gingiva eines kaukasischen 28-jährigen Mannes isoliert wurde. Sie sind an Prozessen der Gewebereparatur beteiligt, sowie ein wichtiger Hauptakteur bei den Entzündungsreaktionen auf äußere Reize, weswegen sie ein wichtiges Zellmodell zur Untersuchung der Reaktion der Gingiva auf Entzündungsreize stellen (Bozkurt et al. 2017, Brewer 1967, Komuro 1990, Tiroch et al. 2023, Vaday et al. 2000).

Die Bezugsquellen der Zelllinien sind in der folgenden Tabelle aufgeführt (Tab. 1).

Tab. 1: Bezugsquellen der Zelllinien

Zelllinie	Bezugsquelle
HFG-1	ATCC (American Type Culture Collection), Virginia (USA)
MCF-7	CLS (Cell Lines Service), Eppelheim

3.1.2 Geräte

Tab. 2: Geräte

Gerät	Hersteller
Absaugsystem uniVACUUSYS	LLG-Labware, Meckenheim
Autoklav VX-150	Systec, Wettenberg
CASY TT Cell Counter & Analyzer	OLS (OMNI Life Science), Bremen

Gerät	Hersteller
CO ₂ Inkubator Heracell 240	Heraeus Instruments, Hanau
CO ₂ Inkubator MCO-170 AICD	PHC Europe, Etten-Leur (Niederlande)
EVE™ Automated Cell Counter	NanoEntek Inc, Seoul (Südkorea)
Fein Waage	Sartorius AG, Göttingen
Kühl- und Gefrierschrank	Robert Bosch GmbH, Gerlingen
Laminar Flow Sterilbank	BDK, München
Mikroplatten-Reader infinite M200 Pro	TECAN, Männedorf (Schweiz)
Mikroskop Motic AE31E	Motic GmbH, Wetzlar
Zählkammer, Neubauer improved	Sigma-Aldich, Missouri (USA)
Plasmagerät Plasmacare©	terraplasma medical GmbH, Garching
Vortex RS-VA10	Phoenix Instrument GmbH, Garbsen
Wasserbad	GFL GmbH, Burgwedel
ZOE Fluorescent Cell Imager	Bio-Rad Laboratories GmbH, Düsseldorf
Zentrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tab. 3: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
5 ml serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
10 ml serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
25 ml serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht

Material	Hersteller
15 ml Zentrifugenröhrchen	Pan-Biotech GmbH, Aidenbach
50 ml Zentrifugenröhrchen	Pan-Biotech GmbH, Aidenbach
Block, 24x0,5ml, für Benchmark myBlock	Biozym 55BSW1520
Block, 24x1,5ml, für Benchmark myBlock	Biozym 55BSW1520
CASY-Röhrchen	Roche Innovatis, Reutlingen
Filterspitzen 10 µl-1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Handschuhe	Hartmann, Heidenheim
Insert für 24-Well Platten	Sarstedt, Nümbrecht
Optilene Mesh Elastic 30x50 cm	B.Braun Surgical, Barcelona (Spanien)
Parafilm® M	ibidi GmbH, Gräfelfing
Pasteurpipetten Glas 230 mm	VWR Collection, Darmstadt
Pinzette	Medicon eG, Tuttlingen
Pipettensatz 0,5 - 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettensatz 0,5 - 1000 µl	Carl Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Carl Roth, Karlsruhe
Scalpell (Einweg)	FEATHER®, Osaka (Japan)
TC-Platte 24 Well	Sarstedt, Nümbrecht
TC-Platte 96 Well	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflasche T25 mit Filterkappe	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflasche T75 mit Filterkappe	Sarstedt, Nümbrecht

3.1.4 Lösungen und Chemikalien

Tab. 4: Lösungen und Chemikalien

Stoff	Hersteller
CASYclean 500ml	OLS (OMNI Life Science), Bremen
CASYTon®	OLS (OMNI Life Science), Bremen
DAPI-Lösung	Invitrogen, Massachusetts (USA)
Destilliertes H ₂ O ₂	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg
Ethanol 96%	Carl Roth, Karlsruhe
Glucose Assay Kit	Abcam, Cambridge (USA)
Paraformaldehyd (Pulver)	Sigma-Aldrich, Missouri (USA)
Falloidin-FITC	Sigma-Aldrich, Missouri (USA)
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich, Missouri (USA)
Triton x-100 (Alkenylphenylpolyethylenglykol)	Sigma-Aldrich, Missouri (USA)

3.1.5 Zellkulturmedien- und Zusätze

Tab. 5: Zellkulturmedien- und Zusätze

Lösung	Hersteller
10× Trypsin-EDTA 0,5/0,2 % in DPBS	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
DMEM (high Glucose) Gibco	Thermo Fisher, Massachusetts (USA)
DMEM/F12	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
DPBS	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Fetal Bovine Serum (FBS)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Gentamycin LGC	ATCC, Virginia (USA)

Lösung	Hersteller
Penicillin/Streptomycin (P/S)	VWR International, Pennsylvania (USA)
Trypsin	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung, Ernte und Passage von Zellen

Die MCF-7- und HGF-1- Zellen wurden bei einer Temperatur von 37 °C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit in Zellkulturflaschen mit 25 und 75 cm² (T25- und T75-Zellkulturflaschen) kultiviert. Dabei wurden die MCF-7-Zellen ausschließlich in T-75-Zellkulturflaschen mit jeweils 10 ml DMEM-Kulturmedium kultiviert, welchen 10 % FBS, 1% Penicillin/Streptomycin und 0,125% Gentamycin zugesetzt wurden. Die HGF-1-Zellen wurden zunächst in T-25-Zellkulturflaschen mit jeweils 5 ml Kulturmedium kultiviert und später in T-75-Kulturflaschen mit jeweils 10 ml Kulturmedium passagiert. Dem DMEM-Kulturmedium wurden 10% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin zugesetzt. Das Kulturmedium wurde regelmäßig alle 2-3 Tage ausgetauscht. Die Zellkulturen wurden täglich bezüglich ihrer Konfluenz und Morphologie lichtmikroskopisch beurteilt und bei Erreichen einer Konfluenz von 80-90% in neue Zellkulturflaschen passagiert.

Zum Kulturmediumwechsel wurde das alte Medium abgesaugt und durch neues Medium ersetzt. Zum Passagieren der Zellen wurde das alte Kulturmedium abgesaugt, der Flaschenboden mit 1 x PBS gewaschen (bei T-25-Zellkulturflaschen 2 ml und bei T-75-Zellkulturflaschen 5 ml) und anschließend mit 10x Trypsin/EDTA-Lösung, welche mit DPBS im Verhältnis 1:10 verdünnt wurde, unterspült (bei T-25-Zellkulturflaschen 1 ml und bei T-75-Zellkulturflaschen 2 ml). Die Zellkulturflaschen mit dem Trypsin wurden für 5-8 Minuten bei 37 °C zum Ablösen der Zellen vom Flaschenboden inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend mit der doppelten Menge an Zellkulturmedium (bei T-25-Zellkulturflaschen 2 ml und bei T-75-Zellkulturflaschen 4 ml) gestoppt und die gesamte Suspension in 15 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und bei 18 °C für 3 min zentrifugiert, bis sich die Zellen von den Lösungen separiert hatten. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml

Kulturmedium verdünnt und entweder in bestimmten Verhältnissen (z.B. 1:2, 1:5, 1:10 usw.) in neue Kulturflaschen passagiert oder zur Zählzählung für weitere Versuche verwendet

3.2.2 NIPP-Behandlung mittels Plasma Care® und Zellzahlbestimmung

Für die Durchführung von Behandlungskinetiken wurden die Zellen in 24- Well-Platten mit einer Wachstumsfläche von 1,82 cm² pro Well ausgesät. Aufgrund der unterschiedlichen Wachstumseigenschaften der untersuchten Zellen wurden bei den MCF-7-Zellen 3×10^4 Zellen pro Well und bei den HGF-1-Zellen 5×10^4 Zellen pro Well ausgesät und in jeweils 1 ml Kulturmedium kultiviert. 24 h nach dem Aussäen wurden die Zellen mit dem Plasma Care® mit NIPP behandelt. Das Plasma Care® wurde auf der Basis der SMD-Technologie entwickelt und wandelt die Umgebungsluft in plasmaaktivierte Luft um.

Jedes Replikat bestand aus einer Gruppe die 1 min und einer Gruppe die 3 min mit Plasma Care® behandelt wurde. Alle Behandlungen fanden unter der sterilen Bank statt und wurden über einen 6-Well-Aufsatz mit einer Behandlungsfläche von 9 cm² durchgeführt. Dabei wurde das Plasma Care® mit dem 6-Well-Aufsatz auf den zu behandelnden Well zentral fixiert (Abb. 1D). Der Abstand zwischen Aufsatz und Oberfläche Zellen betrug in etwa 2 cm (Höhe der 24-Well-Platte). Vor der Behandlung wurde das Kulturmedium abgesaugt und 100 µl frisches Medium in die Wells pipettiert. Nach der Behandlung wurden zu den behandelten 100 µl Kulturmedium 900 µl frisches Medium hinzugegeben und anschließend die Kulturplatten bei 37 °C kultiviert. Die Zellzählung bei den MCF-7-Zellen erfolgte jeweils 3 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h nach der NIPP-Behandlung. Bei den HGF-1-Zellen wurde die Zellzahl jeweils 24 h, 96 h, 168 h und 240 h nach der NIPP-Behandlung bestimmt.

Alle Zellzahlmessungen erfolgten mit dem CASY Cell Counter & Analyser System Model TT (CASY TT). Das CASY TT verwendet die elektrische Impedanzmessung, um die Anzahl, Größe, sowie Vitalität von Zellen zu bestimmen. Dabei wird die elektrische Leitfähigkeit des Mediums, in dem sich die Zellen befinden, gemessen. Wenn eine Zelle durch den Messkanal fließt, verändert sie die elektrische Impedanz, was durch den Sensor erfasst wird. Da vitale Zellen sich in Ihrem elektrischen Widerstand von toten Zellen und Zelltrümmern unterscheiden, können Sie so gut voneinander differenziert

werden. Im System ist für jede Zelllinie entsprechend ihrer Größe eingestellt, welche Partikelgrößen als vitale Zellen, tote Zellen oder Zelltrümmern erkannt werden (Tab. 6).

Tab. 6: Messparameter CASY TT

Zelllinie	vitale Zellen	tote Zellen	Zelltrümmer
MCF-7	14,20-30 μm	4,87-14,19 μm	< 4,87 μm
HGF-1	14,19-30 μm	8,04-14,18 μm	< 8,04 μm

Zur Zellzahlbestimmung wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Wells mit jeweils 1 ml 1 x PBS gewaschen und anschließend mit jeweils 100 μl Trypsin für 5-8 min inkubiert. Nach dem sich Zellen vom Plattenboden abgelöst hatten, wurde die Reaktion mit 900 μl Kulturmedium gestoppt und jeweils 50 μl von der Suspension in CASY-Röhrchen mit 10 ml CASYTon® diluiert. Die Messung wurde in 3 Messzyklen durchgeführt. Das Gerät berücksichtigt bereits den Verdünnungsfaktor und gibt die Messergebnisse in Zellen/ml an. Alle Messungen wurden mittels einer 150 μl Messkapillare durchgeführt.

3.2.3 NIPP-Behandlung der 2-D-Kokultur

In 24-Well-Platten wurden 2-D-Kokulturen aus HGF-1- und MCF-7-Zellen angelegt. Pro Well wurden 9×10^3 HGF-1-Zellen und aufgrund der deutlich höheren Verdopplungsrate lediglich 1×10^3 MCF-7-Zellen ausgesät und in 1 ml HGF-1-Kulturmedium kultiviert. Eine 2-D-Kokultur pro Replikate diente als unbehandelte Kontrolle, während 2 weitere 2-D-Kokulturen jeweils für 1 min und 3 min mit NIPP behandelt wurden. Die Behandlung erfolgte 24 h nach dem Anlegen der Kokulturen. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt und 100 μl frisches Kulturmedium pro Well hinzugefügt. Zur Behandlung wurde ein 6-Well-Aufsatz verwendet und das Plasmagerät zentral auf die zu behandelnden 2-D-Kokulturen mit einem Abstand von ca. 2 cm zur Kulturoberfläche fixiert (Abb. 1D). Nach der Behandlung wurden zu 100 μl behandeltem Kulturmedium 900 μl frisches Kulturmedium hinzugefügt und die Kokulturen wurden für insgesamt 168 h kultiviert. Das Wachstum der Kokulturen wurde alle 24 h lichtmikroskopisch beobachtet und bei 10-facher Vergrößerung anhand von Fotos dokumentiert (Abb. 10). Das Kulturmedium wurde alle 2 Tage ausgetauscht.

3.2.4 Integration von Netziimplantaten in Monokulturen

Es wurden Monokulturen an HGF-1- sowie MCF-7-Zellen aus jeweils 3×10^4 Zellen/Well in 24-Well-Platten angelegt. 24 h nach dem Anlegen der Monokulturen wurden Netziimplantate integriert. Dazu wurden die Netziimplantate mit einem sterilen Skalpell auf die Größe der Wells in quadratischer Form zugeschnitten und mittels einer sterilen Pinzette in die Monokulturen eingebracht. Das Kulturmedium der Monokultur wurde nahezu vollständig abgesaugt und die Netziimplantate vor der Integration in etwas Kulturmedium befeuchtet, um die Anhaftung an den Kulturboden zu erleichtern. Die Netziimplantate wurden minimal größer als die Wells ausgeschnitten, sodass sie über den Randbereich der Wachstumsfläche hinausragten und dadurch besser fixiert waren. Um den vollständigen Kontakt der Netziimplantate mit den Kulturen zu gewährleisten, wurden die Netziimplantate vorsichtig mit dem Ende einer Pasteur-Glaspipette an den Kulturboden gedrückt, ohne die Kultur zu beschädigen. Anschließend wurde 1 ml Kulturmedium vorsichtig in die Wells pipettiert, um die adaptierten Netziimplantate nicht wieder vom Kulturboden zu lösen. Die Monokulturen wurden für 120 h kultiviert. Das Wachstumsverhalten der Monokulturen wurde alle 24 h lichtmikroskopisch beobachtet und bei 4-facher sowie 10-facher Vergrößerung photographisch dokumentiert (Abb. 11). Um die Netziimplantate möglichst nicht zu bewegen, wurde auf einen Wechsel des Kulturmediums verzichtet.

3.2.5 Integration von Netziimplantaten in NIPP-behandelter 2-D-Kokulturen

Nachdem 2-D-Kokulturen aus HGF-1- und MCF-7-Zellen in 24-Well-Platten wie oben beschrieben (s. 3.2.3) angesetzt wurden, erfolgte 24 h später eine 3-minütige NIPP-Behandlung. Pro Replikat wurde zur Kontrolle eine Kokultur unbehandelt belassen. Vor der NIPP-Behandlung wurde das Kulturmedium abgesaugt und 100 µl frisches Kulturmedium hinzugefügt. Die NIPP-Behandlung erfolgte mit dem Plasma Care® wie oben beschrieben (s. 3.2.3). Anschließend wurden die zurechtgeschnittenen Netziimplantate in die 2-D-Kokulturen integriert und 900 µl Kulturmedium vorsichtig in die Wells pipettiert. Die 2-D-Kokulturen wurden für 120 h kultiviert und ihr Wachstumsverhalten alle 24 h lichtmikroskopisch beobachtet. Zur Dokumentation wurden Fotos in 4-facher sowie 10-facher Vergrößerung gemacht (Abb.12).

3.2.6 Etablierung eines direkten 3-D-Kokultur-Modells

Ein direktes 3-D-Kokultur-Modell wurde in zylinderförmigen Filtereinsetzen (Inserts) für 24-Well-Platten etabliert. Seitliche Fortsätze an den Seitenwänden der Inserts ermöglichen eine optimale Positionierung in der Vertiefung der Kulturplatte. Dies führt zur Unterteilung des Wells in obere und untere Kammern, wodurch sowohl direkte als auch indirekte Kokultursysteme möglich sind (Abb. 3). Die transparente Membran der Inserts besitzt eine Porengröße von $0,4\ \mu\text{m}$, die einen Stoffaustausch zwischen den Kammern ermöglicht und gleichzeitig die Zellmigration verhindert. Die Wachstumsfläche eines Inserts beträgt $0,3\ \text{cm}^2$.

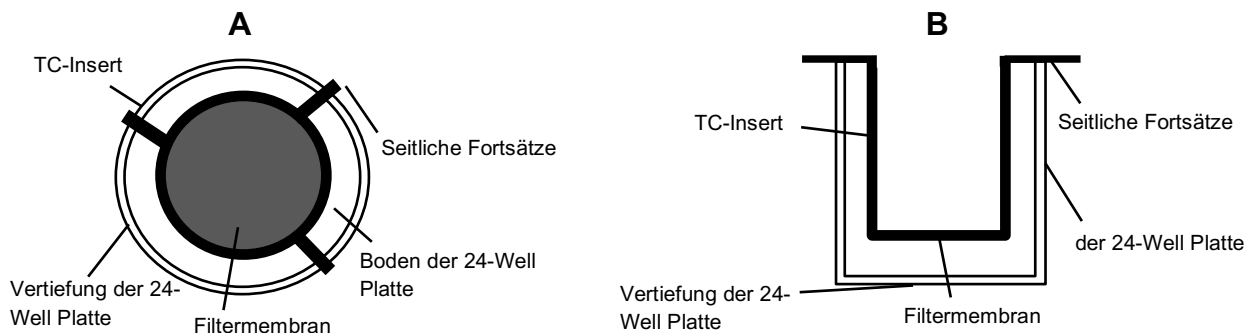


Abb. 3: Zweidimensionale Darstellung eines Inserts in einer 24-Well-Platte

Schematische Darstellung der Aufsicht (A) und Seitenansicht (B) eines Sarstedt TC (Tissue Culture) – Inserts in einer 24- Well-Platte.

Die Inserts wurden mit Hilfe einer sterilen Pinzette in die Wells platziert und jeweils 5×10^4 HGF-1-Zellen in die Inserts (obere Kammer) ausgesät (Abb. 4 A). Da jedes Insert ein Gesamtvolumen von $400\ \mu\text{l}$ aufnehmen kann, wurde der verbleibende Raum mit HGF-1 Kulturmedium aufgefüllt. In die Wells (untere Kammer) wurden jeweils $600\ \mu\text{l}$ HGF-1 Kulturmedium gegeben. Nach 7 Tagen wurde das Kulturmedium in der oberen und unteren Kammer abgesaugt und jeweils 1×10^4 MCF-7-Zellen in die obere Kammer ausgesät und bis auf einem Volumen von $400\ \mu\text{l}$ mit HGF-1 Kulturmedium aufgefüllt (Abb. 4 B). In die untere Kammer wurde erneut $600\ \mu\text{l}$ HGF-1 Kulturmedium gegeben. Während des gesamten Prozesses wurden die angelegten Kulturen täglich lichtmikroskopischen bezüglich Ihres Wachstums beobachtet und das Kulturmedium alle 2-3 Tage gewechselt. Der Wachstumsverlauf wurde photographisch nach 1 d, 4 d, 8 d, 10 d und 12 d dokumentiert (Abb. 13).

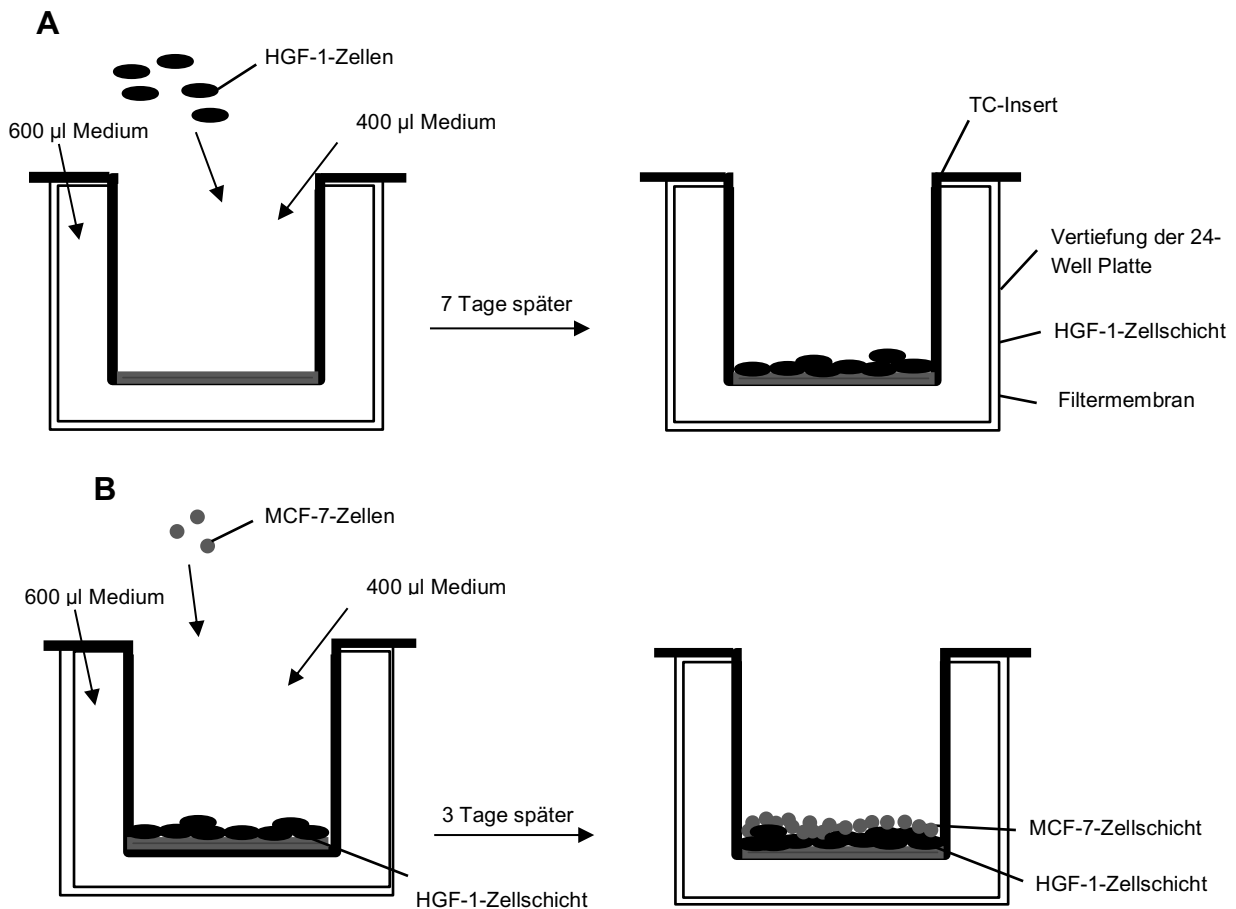


Abb. 4: Schematische Darstellung der Bildung einer 3-D-Kokultur im Insert

Zur Herstellung einer 3-D-Kokultur wurden zunächst 5×10^4 HGF-Zellen zusammen mit 400 µl Kulturmedium in dem Insert und 600 µl Kulturmedium in das Well gegeben. Nach 7 Tagen bildete sich eine HGF-1-Zellschicht (A). Daraufhin wurden 1×10^4 MCF-7-Zellen auf die vorhandene HGF-1-Zellschicht gegeben. Nach 3 Tagen bildete sich eine zweite Zellschicht aus MCF-7-Zellen (B). Das Ergebnis nach insgesamt 10 Tagen ist eine zweischichtige dreidimensionale Kokultur.

3.2.7 D-Glukosemessung von Kulturmedien der 3-D-Kokulturen

Die Konzentration der D-Glucose wurde mittels Glucose Assay Kits und eines Mikroplatten-Reader (TECAN infinite M200 pro) bestimmt. Das Prinzip beruht auf der enzymatischen Bildung des Oxidationsmittel Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NADH) durch die Enzyme Hexokinase (HK) und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH). Das verwendete Kit besteht aus 2 Reagenzien. Reagenz 1 enthält NAD und Puffer, während Reagenz 2 die Enzyme HK und G6P-DH enthält, welche die Reaktion 1 und 2 katalysieren (Abb. 5). Die HK wandelt D-Glucose in Glucose-6-Phosphat (G-6-P) um. Aus G-6-P und NAD wird durch die G6P-DH, NADH gebildet. Die Menge des gebildeten NADH

kann durch die Änderung der Absorption bei 340 nm photometrisch erfasst und mithilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes quantifiziert werden.



ATP = Adenosintriphosphat ADP = Adenosindiphosphat HK = Hexokinase G-6-P = Glucose-6-Phosphat
 NAD(H) = Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid H⁺ = Wasserstoff-Ion Gl-6-P = Gluconat-6-Phosphat

Abb. 5: Enzymatische Reaktion der Reagenzien des Glucose Assay Kits (r-biopharm® 2023)

Dargestellt sind die chemischen Reaktionen, die nach Zugabe von Reagenz 1 und 2 des Glucose Assay Kits zur Bildung von NADH führen. In der ersten Reaktion werden durch das Enzym Hexokinase (HK) aus D-Glucose und ATP die Substrate Glucose-6-Phosphat (G-6-P) und ADP gebildet. In der zweiten Reaktion katalysiert das Enzym Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) die Umwandlung von Glucose-6-Phosphat (G-6-p) und NAD⁺ zu Gluconat-6-Phosphat (Gl-6-P) und NADH + H⁺.

Die Reagenzien wurden vor der Benutzung auf Raumtemperatur (20 °C) gebracht. Zur Glukosemessung wurden 10 µl Proben entnommen. Diese Proben stammten aus dem Kulturmedium der oberen Kammer (Inserts) der 3-D-Kokulturen. Zusätzlich wurde eine Probe aus destilliertem Wasser entnommen, die für die spätere Berechnung benötigt wurde (s. unten). Die Proben wurden in 96-Well-Platten gegeben, jeweils mit 200 µl Lösung aus Reagenz 1 resuspendiert und für 1 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die 96-Well-Platte in den Mikroplatten-Reader gegeben, um die Extinktion 1 (E₁) bei 340 nm zu messen. Danach wurde die Platte aus dem Mikroplatten-Reader entfernt, die Proben mit jeweils 50 µl Lösung aus Reagenz 2 resuspendiert und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die 96-Well-Platte erneut in den Mikroplatten-Reader gelegt und die Extinktion 2 (E₂) bei 340 nm gemessen. Für die Berechnung der Glucosekonzentration wurde folgende Formel verwendet:

$$c_{\text{D-Glucose}} [\text{g}/100\text{g}] = (V \times \text{MG} \times \Delta A) / (\epsilon \times d \times v \times 1000)$$

V (Testvolumen) = 2,600 [ml] MG (Molekulargewicht) = 180,16 [g/mol] d (Schichtdicke) = 1,00 [cm]
 v (Probevolumen) = 0,100 [ml] ε (Extinktionskoeffizient NADH bei 340 nm) = 6,3 [l x mmol⁻¹ x cm⁻¹]

Wenn man nun die bekannten Parameter in die Formel einsetzt, ergibt sich für eine Messung bei 340 nm folgende Formel:

$$c_{\text{D-Glucose}} [\text{g}/100\text{g}] = 0,744 \times \Delta A$$

Dabei lässt sich ΔA mit den gemessenen Werten für E_1 und E_2 durch folgende Formel berechnen:

$$\Delta A = (E_2 - df \times E_1)_{\text{Probe}} - (E_2 - df \times E_1)_{\text{H}_2\text{O}}$$

df (Reagenzverdünnungsfaktor) = 0,808

Die Glukosekonzentration wurde einmal kurz nach dem Wechsel des Kulturmediums (0 h) und einmal 3 Tage später (72 h) gemessen. Nach dem Kulturmediumwechsel wurden die 3-D-Kokulturen täglich hinsichtlich ihrer Vitalität und ihres Wachstums beurteilt und der Farbwechsel des Kulturmediums photographisch dokumentiert (Abb. 14 A). Im verwendeten DMEM-Medium befindet sich Phenolrot als pH-Indikator, der seine Farbe im Bereich zwischen pH 6,8 und pH 8,2 von Rot auf Gelb ändert. Bei der Glykolyse wird Glucose in Pyruvat umgewandelt, wobei saure Zwischenprodukte entstehen, die den pH-Wert des Mediums verändern und so den Farbwechsel verursachen. Daher kann anhand des Farbwechsels der Glukoseverbrauch der 3-D-Kokultur festgestellt werden.

3.2.8 NIPP-Behandlung von 3-D-Kokulturen mit integrierten Netziimplantaten

Die 3-D-Kokulturen aus HGF-1- und MCF-7-Zellen wurden gemäß Abschnitt 3.2.6 in Inserts für 24-Well-Platten hergestellt. 3 Tage, nachdem die MCF-7-Zellen auf die HGF-1-Zellschicht ausgesät wurden, erreichten die 3-D-Kokulturen ausreichendes Wachstum und wurden für den Versuch verwendet. Jedes Replikat bestand aus zwei 3-D-Kokulturen, wobei eine für 3 min mit NIPP behandelt wurde und die andere als unbehandelte Kontrolle diente. Für die NIPP-Behandlung wurde das Kulturmedium aus den Inserts und den Wells vollständig abgesaugt und nach Zugabe von ca. 100 µl frischem HGF-1-Kulturmedium in die Inserts, die Behandlung durchgeführt. Die NIPP-Behandlung erfolgte gemäß Abschnitt 3.2.2, wobei der Aufsatz des Plasmageräts auf das jeweilige zu behandelnde Insert zentriert wurde.

Nach der Behandlung wurden Optilene Netziimplantate (Abb. 6 A) in passende quadratische Stücke (s. Abb. 6 B) mit einem sterilen Skalpell zugeschnitten und mit einer sterilen Pinzette in die Inserts eingesetzt. Die Netziimplantate wurden vorsichtig mit dem Ende eines 1000 µl Pipettenaufsatzes an den Boden der Inserts (Filtermembran) adaptiert, um einen direkten Kontakt zwischen Netziimplantat und Kokultur

sicherzustellen. Anschließend wurden jeweils 600 µl frisches Kulturmedium in die Wells und weitere 300 µl in die Inserts gegeben (insgesamt also 400 µl in den Inserts). Die 3-D-Kokulturen wurden für 96 h bei 37 °C inkubiert. Alle 24 h wurden die 3-D-Kokulturen mikroskopisch auf ihr Wachstum und ihre Vitalität überprüft. Zudem wurde überprüft, ob die Netzümplantate weiterhin vollständig Kontakt zum Boden haben. Zur Analyse wurden Fotos in 20-facher Vergrößerung jeweils nach 24 h und 96 h gemacht (Abb. 13).

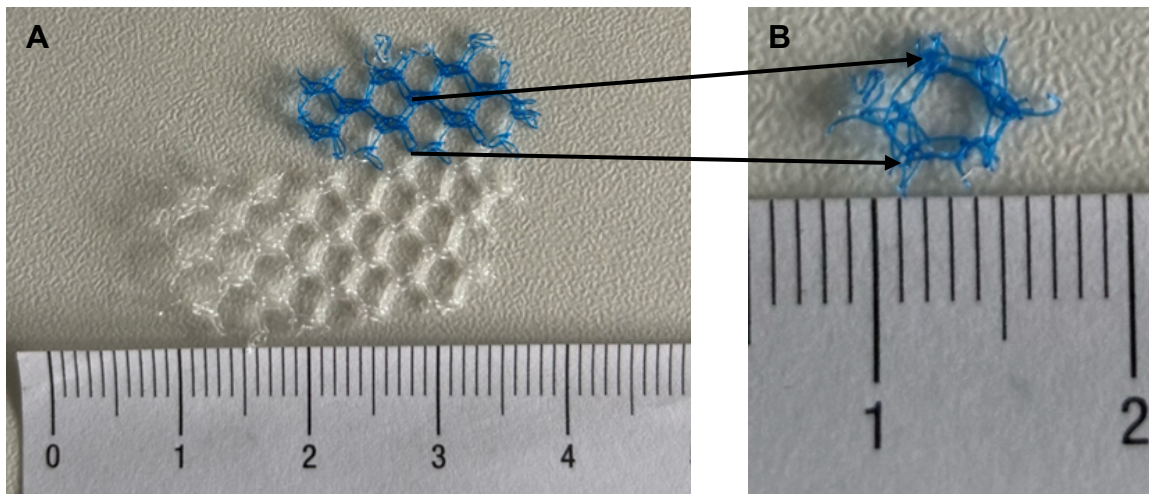


Abb. 6: Ausschnitte vom Netzümplantat Optilene Mesh Elastic BLUE STRIPED

Dargestellt ist ein manuell ausgeschnittenes Stück des Optilene Netzümplantats, das aus monofilament Polypropylen mit blauen Entfaltungslinien besteht und eine Porengröße von 1,5 mm aufweist (A). Für die Integration des Netzümplantats, in die 3-D-Kokulturen im Insert, wurden kleine Stücke mit einem Gesamtdurchmesser von ca. 5 mm mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten (B).

3.2.9 Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Netzümplantate

Zur Fluoreszenzmikroskopischen Analyse der Netzümplantate wurden die Fluoreszenzfarbstoffe DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) und Falloidin-FITC (Fluorescein-isothiocyanat) verwendet. DAPI bindet an die DNA und fluoresziert Blau, wenn es mit UV-Licht (ultraviolettem Licht) angeregt wird, wodurch Zellkerne blau gefärbt werden. Falloidin-FITC hingegen enthält das Toxin Falloidin, welches selektiv und stabil an Aktinfilamente bindet, einem wichtigen Bestandteil des Zellskeletts. Durch die Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC fluoresziert das Falloidin bei Anregung mit Licht im blauen Bereich Grün.

Die mikroskopische Analyse erfolgte mittels ZOE Fluoreszenz Zell Imager, einem Fluoreszenzmikroskop mit integrierter digitaler Kamera, drei Fluoreszenzkanälen sowie

einem Kanal für lichtmikroskopische Aufnahmen. Für die DAPI-gefärbten Netziplantate wurde der Blue Channel verwendet und für die Falloidin-gefärbten Netziplantate der Green Channel (Tab. 7) Mit Hilfe der eingebetteten Software können Aufnahmen bearbeitet, gespeichert sowie auf einem speziellen Stick des Herstellers exportiert werden. Es ist kein Dunkelraum zur Untersuchung nötig. Parameter wie etwa die Lichtintensität sind manuell einstellbar.

Tab. 7: Verwendete Fluoreszenzkanäle des ZOE-Fluoreszenz Cell Imager (BIO-RAD 2024)

Kanal	Lichtquelle	Anregung	Emission
Blue Channel	UV LED	355/40 nm	433/36 nm
Green Channel	Blue LED	480/17 nm	615/61 nm

Zunächst wurden zur Kontrollfärbung Netziplantatstücke manuell mit einem Skalpell auf die Größe von 24-Wells zugeschnitten, in die Wells eingelegt und mit 200 µl verdünnter DAPI-Lösung (1µg/ml DAPI in 1xPBS im Verhältnis 1:1000 verdünnt) benetzt und für 5 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die DAPI-gefärbten Netziplantate einmal mit 1000 µl/Well 1x PBS und einmal mit 1000 µl/Well destilliertem Wasser gewaschen und auf einen Objektträger unter UV-Licht (Blue Channel) bei niedriger und hoher Lichtintensität fluoreszenzmikroskopisch untersucht, sowie mit der integrierten Kamera fotografiert (Abb. 16). Dasselbe Verfahren wurde zur Anfärbung der Netziplantate mit Falloidin-FITC durchgeführt. Hier wurden die Netziplantate jedoch mit 200 µl Falloidin-FITC-Lösung (0,01 µg/ml in 1x PBS) benetzt und für 40 min im Dunkeln inkubiert. Die mikroskopische Analyse erfolgte unter blauem Licht (Green Channel).

Im nächsten Schritt wurden die in den 3-D-Kokulturen eingelagerten Netziplantate (s. 3.2.8) angefärbt. Jedes Replikat bestand aus einem Netziplantat, das 96 h in einer unbehandelten 3-D-Kokultur und einem Netziplantat, das in einer für 3 min mit NIPP behandelten 3-D-Kokultur integriert wurde. Nun sollten die Zellen auf den Netziplantaten mit Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt werden. Dazu musste die Zellen zunächst fixiert und anschließend permeabilisiert werden. Zudem waren die Netziplantatstücke aus den Inserts deutlich kleiner als die ausgeschnittenen Netziplantatstücke bei der Kontrollfärbung, weshalb die verwendeten Lösungsmengen angepasst wurden.

Zunächst wurden die Netziimplantate nach 96 h vorsichtig mit einer Pinzette aus den Inserts entfernt und in 24-Well transferiert. Anschließend wurden sie mit 500 µl/Well 1x PBS gewaschen und danach mit 500 µl/Well 4 %iger PFA-Lösung (Paraformaldehyd) zur Fixierung der Zellen benetzt. Zur Herstellung der 4 %igen PFA-Lösung wurden 0,4 g PFA in 9,6 ml 1x PBS bei 60-70 °C für 30-45 min unter Rühren gelöst. Nach 10 min Einwirkzeit wurde die PFA-Lösung mit 500 µl/Well 1x PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellen wurden die Netziimplantate anschließend für 5 min mit 500 µl/Well 0,1%iger Triton-Lösung behandelt. Zur Herstellung der 0,1%igen Triton-Lösung wurden 10 µl Triton X-100 in 10 ml 1x PBS verdünnt. Danach wurde die Triton-Lösung ebenfalls mit 500 µl/Well 1x PBS gewaschen.

Zur Anfärbung der Zellen auf den Netziimplantaten wurden die Netziimplantate mit 100 µl der jeweiligen Färbelösung (DAPI/Falloidin-FITC) benetzt. Bei der DAPI-Färbung wurden die Netziimplantate für 5 min und bei der Falloidin-Färbung für 40 min im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurden die Netziimplantate einmal mit 500 µl/Well 1x PBS und einmal mit 500 µl/Well destilliertem Wasser gewaschen, bevor Sie auf Objektträger fluoreszenzmikroskopisch analysiert und fotografiert wurden (Abb.17 und 19).

3.2.10 Quantifizierung der Zellzahl auf den Netziimplantaten

Zur Quantifizierung der Zellzahl auf den in den 3-D-Kokulturen integrierten Netziimplantaten wurden insgesamt 3 verschiedene Messgeräte verwendet. Zunächst wurden die Zellen von den Netziimplantaten abgelöst und eine Zellsuspension hergestellt, die für die Zellzahlmessung verwendet werden konnte. Die Vorgehensweise zur Gewinnung der Zellsuspension war für alle 3 Messgeräte identisch.

Nachdem Netziimplantate in unbehandelte sowie in für 3 min mit NIPP behandelte 3-D-Kokulturen für 96 h integriert worden waren (s. 3.2.8), wurden sie vorsichtig mit einer Pinzette aus den Inserts entfernt und für das weitere Vorgehen in 24-Well transferiert. Zuerst wurden die Netziimplantate mit 400 µl/Well 1x PBS gespült und der Überstand wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß abpipettiert. Danach wurden 200 µl/Well 10x Trypsin/EDTA-Lösung zur Ablösung der Zellen auf die Netziimplantate gegeben und die Wells für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde dann mit weiteren 400 µl/Well 1x PBS gestoppt und die gesamte 600 µl Suspension ebenfalls in das 1,5 ml Reaktionsgefäß

abpipettiert. Die Netzümplantate wurden ein letztes Mal mit 200 µl/Well 1x PBS gespült, um die letzten Zellen abzulösen. Diese Suspension wurde ebenfalls zu der restlichen 1000 µl Suspension gegeben, sodass insgesamt für jedes Netzümplantat eine Suspension von 1200 µl entstand.

Da bei der Fluoreszenzfärbung (s. 3.2.9) aufgefallen war, dass sich bereits viele Zellen durch das Waschen mit Lösungen ablösen, wurden hier alle Suspensionen abpipettiert, um eine möglichst korrekte Zellzahlmessung durchführen zu können. Um die Zellen von den Lösungen abzutrennen, wurde die gesamte Suspension für 5 min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Die Zellen wurden mit 20 µl 1x PBS resuspendiert und die gesamte Suspension mittels Vortex gemischt. Kurz vor der Zellzahlmessung wurden 2 µl Trypanblau-Farbstoff hinzugefügt und erneut mit Vortex gemischt. Trypanblau färbt als Diazofarbstoff membrangängige tote Zellen blau und ermöglicht so die Unterscheidung zwischen toten und vitalen Zellen. Das Ergebnis war also eine Zellsuspension von 22 µl für jedes Netzümplantat.

Für die Messung mittels des automatischen EVE™ Zellzählsystems (Abb. 7 B) wurden 10 µl der jeweiligen Zellsuspension in den Probenträger pipettiert (Abb. 7 A) und in die dafür vorgesehene Vorrichtung geschoben (Abb. 7 C). Durch modernste Optik und Bildanalyse misst das automatische Zellzählsystem die Zellzahl sowie die Viabilität der Zellen. Am Bildschirm des Zellzählsystems sind die gemessenen Zellen der jeweiligen Suspension sichtbar (Abb. 7 D). Der Größenbereich für die Zellzählung wurde von den in CASY-TT eingestellten Parameter für die Zellzahlmessung von MCF-7-Zellen übernommen (Tab. 6). Bei der Zellzahlmessung wurde am Ende der Verdünnungsfaktor von 2,2 berücksichtigt (10 µl der insgesamt 22 µl-Zellsuspension wurden zur Messung verwendet).



Abb. 7: Automatisches EVE™ Zellzählsystem (modifiziert nach NanoEntek 2024)

Dargestellt ist das Messprinzip des automatischen EVE™ Zellzählsystems (B). Zunächst werden 10 µl der zu messenden Proben in den Probenenträger pipettiert (A). Danach wird der Probenenträger in die dafür vorgesehene Vorrichtung eingeschoben (C). Auf dem Bildschirm des Gerätes werden sowohl die Zellzahl als auch eine mikroskopische Aufnahme der Zellsuspension angezeigt (D).

Die Neubauerkammer (Abb. 8 A) ist eine rechteckige Glasplatte, in welche 4 zu den kurzen Seiten parallele Vertiefungen und eine zusätzliche Vertiefung rechtwinklig dazu in der Mitte eingeschliffen sind. Dadurch entstehen 2 Außenstege und 1 geteilter Mittelsteg. Auf den Außenstegen, die geringfügig höher stehen als der Mittelsteg, wird ein Deckglas gelegt, wodurch sich ein Kapillarspalt bildet, der durch Teilung des Stegs 2 getrennte Kammer bildet. Mit Hilfe einer Pipette wurden 10 µl der Zellsuspension unter Kapillarkraft in eine Kammer eingebracht. Durch das in den Kammerboden eingeritzte Zählnetz, wurde unter Mikroskop bei 40-facher Vergrößerung, die Anzahl der Zellen pro Quadrat manuell ausgezählt. Das verwendete Modell (Neubauer improved hell-lining) besteht aus 9 Großquadraten mit jeweils einer Fläche von 1 mm². Zur Zellzahlbestimmung wurden 4 solcher Großquadrate ausgezählt, die wiederum jeweils aus 16 Gruppenquadraten mit einer Fläche von jeweils 0,0625 mm² bestehen (Abb. 8 B). Bei einer gesamten Zellzahl von unter 100 wurde ein fünftes Großquadrat mitgezählt. Der Zählvorgang erfolgte mäanderförmig, wobei Zellen auf nur 2 der Grenzlinien der Quadrate gezählt wurden, zum Beispiel oben und rechts (Abb. 8 C). Anschließend konnte die Zellzahl anhand folgender Formel errechnet werden:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{ausgezählte Zellen}}{\text{Ausgezählte Fläche (mm}^2\text{) x Kammertiefe (mm)}} \times 1000$$

Kammertiefe= 0,1 mm

ausgezählte Fläche= 4 mm² (4 x 1mm²)

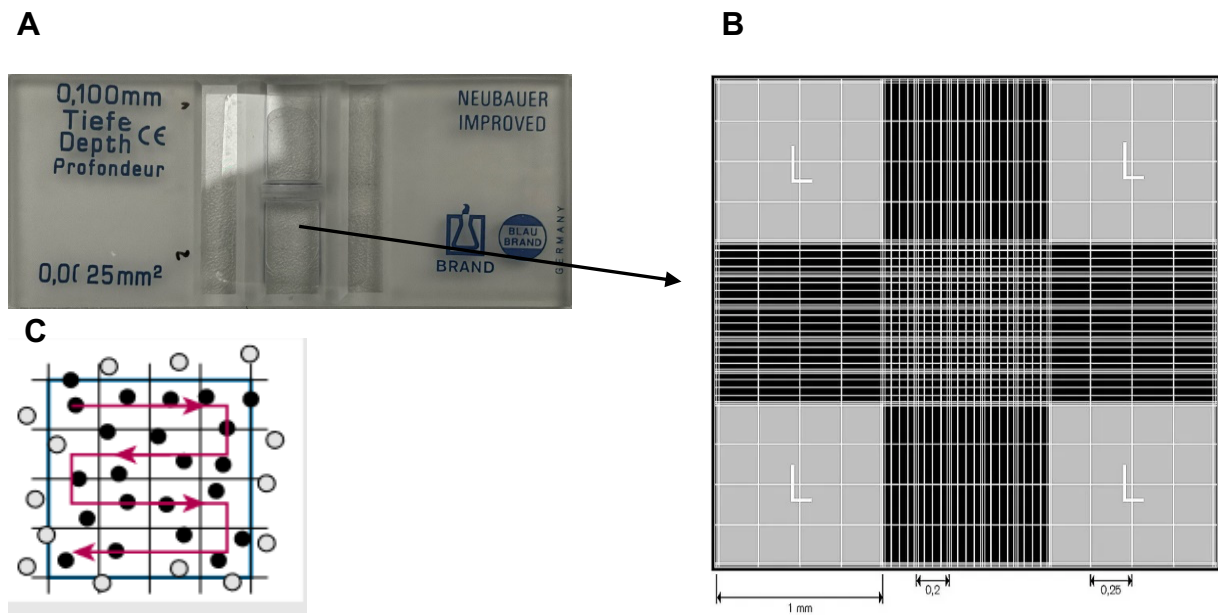


Abb. 8: Neubauer improved hell-lining Zählkammer (Brand® 2024)

Dargestellt ist eine Neubauer improved Zählkammer mit einer Kammertiefe von 0,1 mm (A). Der Kammerboden hat ein eingeritztes Zählnetz aus 9 Großquadraten mit jeweils einer Breite von 1 mm. Diese bestehen wiederum jeweils aus 16 Gruppenquadraten mit einer Breite von jeweils 0,25 mm (B). In Abbildung C ist die pro Gruppenquadrat mäanderförmige Auszählung dargestellt. Bei den Zellen auf den Begrenzungslinien werden lediglich die Zellen auf zwei ausgewählten Begrenzungslinien, hier oben und rechts, mitgezählt (schwarze Punkte).

Zur Zellzählung mittels des automatischen Zellzählgeräts CASY TT wurden 10 µl Zellsuspension mit 40 µl 1x PBS verdünnt, um eine 50 µl Suspension zu erhalten. Dies ist notwendig, da CASY die Zellzahl/ml auf Basis einer 50 µl Suspension berechnet. Das Messprinzip von CASY TT wurde bereits unter Abschnitt 3.2.2 erläutert. Für die Messung wurden die spezifischen Messparameter für die Zellzählung von MCF-7-Zellen verwendet (Tab. 6). Die Messwerte wurden anschließend entsprechend den Verdünnungsfaktoren umgerechnet.

3.2.11 Statistische Auswertung

Für die Berechnung aller statistischen Parameter (Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanznachweise durch t-Tests) sowie der Erstellung aller Graphiken und Diagramme wurde das Microsoft Excel 2021 Programm verwendet. Bei allen Versuchen wurden mindestens 4 unabhängige Durchgänge berücksichtigt. Alle Ergebnisse wurden anhand von Studentische t-Tests auf Signifikanz geprüft und die Signifikanzniveaus wie folgt dargestellt: (*) für $p \leq 0,05$; (**) für $p \leq 0,01$ und (***) für $p \leq 0,001$.

4. Ergebnisse

4.1 Einfluss von NIPP auf die Zellproliferation

Die antiproliferative Wirkung von NIPP auf Tumorzellen wurde bereits nachgewiesen. Es ist bekannt, dass dabei vor allem die Apoptoseinduktion durch die Bildung einer Vielzahl reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) eine wesentliche Rolle spielt (Helmka 2016, Koensgen et al. 2017, Leduc et al. 2009, Xia et al. 2019, Yan et al. 2017, Yonson et al. 2006).

Für die Untersuchung der NIPP-Wirkung auf die Zellproliferation wurden Zellen der Zelllinien MCF-7 und HGF-1 mittels des mobilen Plasmageräts Plasma care® bei zwei verschiedenen Behandlungszeiten (1 min und 3 min) behandelt und die Zellproliferation mittels CASY Cell Counter and Analyzer untersucht.

4.1.1 Wirkung von NIPP auf HGF-1-Zellen

Um den Einfluss von NIPP auf die HGF-1-Zellen, bei der es sich um menschliche Gingiva Fibroblasten handelt, ermitteln zu können, wurden in 24-Wellplatten 5×10^4 Zellen pro Well ausgesät und die Zellzahl alle 72 h, beginnend ab 24 h nach der Plasmabehandlung, bestimmt. Die HGF-1-Zellen zeigen insgesamt ein eher langsames Wachstum. Während bei der Kontrollgruppe (Ktrl) die Zellzahl innerhalb von 240 h durchschnittlich von $4,4 \times 10^4$ auf $5,5 \times 10^4$ um ca. 25% und bei der 1 min mit Plasma Care behandelten Gruppe (1 min) durchschnittlich von $4,6 \times 10^4$ auf $5,7 \times 10^4$ um ca. 24% steigt und somit kaum ein signifikanter Unterschied zu beobachten ist, zeigt die 3 min mit Plasma Care behandelte Gruppe (3 min) ein tendenziell besseres Wachstum (Abb. 9 A). Bei dieser Gruppe hat die Zellzahl innerhalb von 240 h durchschnittlich von $4,1 \times 10^4$ auf $6,5 \times 10^4$ um ca. 58,5% zugenommen, wobei der größte Anstieg zwischen 168 h und 240 h zu beobachten war. Somit zeigte NIPP keine antiproliferative Wirkung, sondern vielmehr sogar eine leicht wachstumsfördernde Wirkung auf die HGF-1-Zellen.

4.1.2 Wirkung von NIPP auf MCF-7-Zellen

Für die Untersuchung der Behandlungskinetik der Brustkrebs-Epithelzellen MCF-7 wurden in 24-Wellplatten 3×10^4 Zellen pro Well ausgesät und die Zellzahl nach 3 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h ermittelt. Im Vergleich zu den fibroblastären HGF-1-Zellen zeigten die epithelialen Tumorzellen MCF-7 ein deutlich stärkeres in-vitro-Zellwachstum. Dabei lässt sich insgesamt ein leichter antiproliferativer Effekt durch die Behandlung mit NIPP feststellen (Abb. 9 B). Bei der Kontrollgruppe (Ktrl) liegt die Zellzahl nach 120 h durchschnittlich bei $5,4 \times 10^4$. Währenddessen beträgt die Zellzahl bei der 1 min mit Plasma Care behandelten Gruppe (1 min) nach 120 h durchschnittlich $4,7 \times 10^4$ und ist somit ca. 15% geringer ($p=0,00026$, $n=6$) als bei der Kontrollgruppe (Ktrl). Bei der 3 min mit Plasma Care behandelten Gruppe (3 min) beträgt die Zellzahl nach 120 h durchschnittlich $4,2 \times 10^4$ und ist somit ca. 29% geringer ($p=0,0000011$, $n=6$) als bei der Kontrollgruppe.

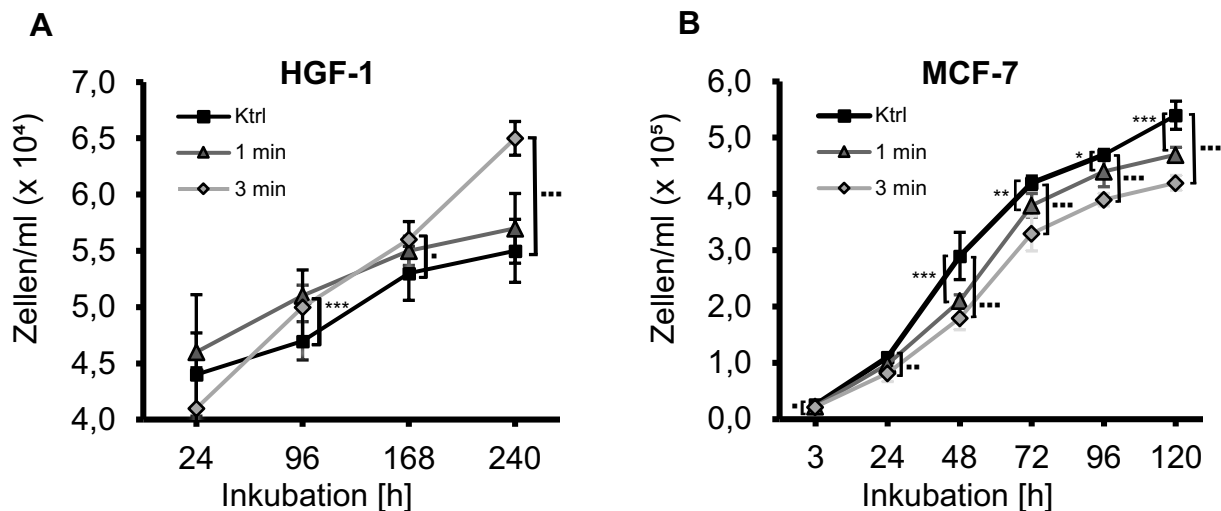


Abb. 9: NIPP-Behandlungskinetik von HGF-1- und MCF-7-Zellen

Die HGF-1- und MCF-7-Zellen wurden in 24-Wellplatten ausgesät und die Zellzahl zu den angegebenen Zeitpunkten mittels CASY Cell Counter and Analyzer ermittelt. Bei den HGF-1-Zellen (A) wurden 5×10^4 und bei den MCF-7-Zellen (B) wurden 3×10^4 Zellen pro Well ausgesät. Aufgrund der unterschiedlichen Wachstumsverhalten unterscheiden sich auch die Inkubationszeiten. Bei beiden Zellen wurden jeweils 6 Replikate mit je einer Kontrollgruppe ohne Behandlung (Ktrl), einer Gruppe die für 1 min mit Plasma Care® behandelt wurde (1 min), und einer Gruppe die für 3 min mit Plasma Care® behandelt wurde (3 min), untersucht. Die Messwerte wurden als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt. Sowohl der Unterschied zwischen der Kontrolle zu den 1 min mit NIPP behandelten Zellen (*= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; ***= $p \leq 0,001$) als auch der Unterschied der Kontrolle zu den 3 min mit NIPP behandelten Zellen (•= $p \leq 0,05$; ••= $p \leq 0,01$; •••= $p \leq 0,001$) wurde mittels Student's T-tests auf Signifikanz getestet.

4.2. Etablierung einer 2-D-Kokultur und der Einfluss von NIPP auf ihr Wachstum

Unter einem Gewebe versteht man einen Zellverband mit gemeinsamen Funktionen. Ein Gewebe besteht aus Zellen gleichen Genotyps. Verschiedene Gewebe bilden wiederum ein Organ. Auch wenn zwei verschiedene Zelltypen zur Bildung des Gewebemodells angewendet werden und daher das Modell eher einem Organmodell entsprechen würde, wird trotzdem der Begriff „Gewebemodell“ angewendet.

Die erste Annäherung an die Herstellung eines in-vitro-Gewebemodells ist die Bildung einer 2-D-Kokultur. Neben dem Wachstumsverhalten sollte auch der Einfluss von NIPP auf die 2-D-Kokultur beobachtet werden. Für die Untersuchung wurden in 24-Wellplatten 2-D-Kokulturen aus jeweils 9000 HGF-1- und 1000 MCF-7-Zellen pro Well ausgesät und für 168 h kultiviert. Jedes Replikat bestand aus einer unbehandelten Gruppe (Abb. 10 A), einer Gruppe die 1 min mit NIPP behandelt wurde (Abb. 10 B) und einer Gruppe die 3 min mit NIPP behandelt wurde (Abb. 10 C). Zur Analyse wurden jeweils nach 24 h, 72 h, 120 h und 168 h mikroskopische Aufnahmen in 10-facher Vergrößerung aufgenommen.

Das Wachstumsverhalten war bei allen drei Gruppen sehr ähnlich (Abb. 10). Zunächst sieht man nach 24 h eine unorganisierte Verteilung an HGF-1- und MCF-7-Zellen. Nach 72 h hatte sich bereits die Zellzahl sichtbar vermehrt und die MCF-7-Zellen fingen an sich von den HGF-1-Zellen abzugrenzen. Nach 120 h war bereits ein typisches Wachstumsmuster zu erkennen, bei dem die MCF-7-Zellen mit ihrem deutlich schnelleren in-vitro-Zellwachstum (Abb. 9) unabhängig von den HGF-1-Zellen organisiert in Gruppen wuchsen und Epithelinseln bildeten. Nach 168 h hatten sich die MCF-7-Epithelinseln vergrößert und bedeckten immer mehr Wachstumsfläche.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die 2-D-Kokulturen aus MCF-7-Zellen und HGF-1-Zellen bei allen drei Gruppen in einem typischen Wachstumsmuster gewachsen sind, bei dem sich organisierte Epithelinseln aus MCF-7-Zellen bildeten. Der organisierte Aufbau der 2-D-Kokultur erinnert damit an den Aufbau eines Gewebes. Zudem hatte die NIPP-Behandlung weder nach 1 min noch nach 3 min einen sichtbaren Einfluss auf das Wachstumsverhalten der 2-D Kokultur (Abb. 10).

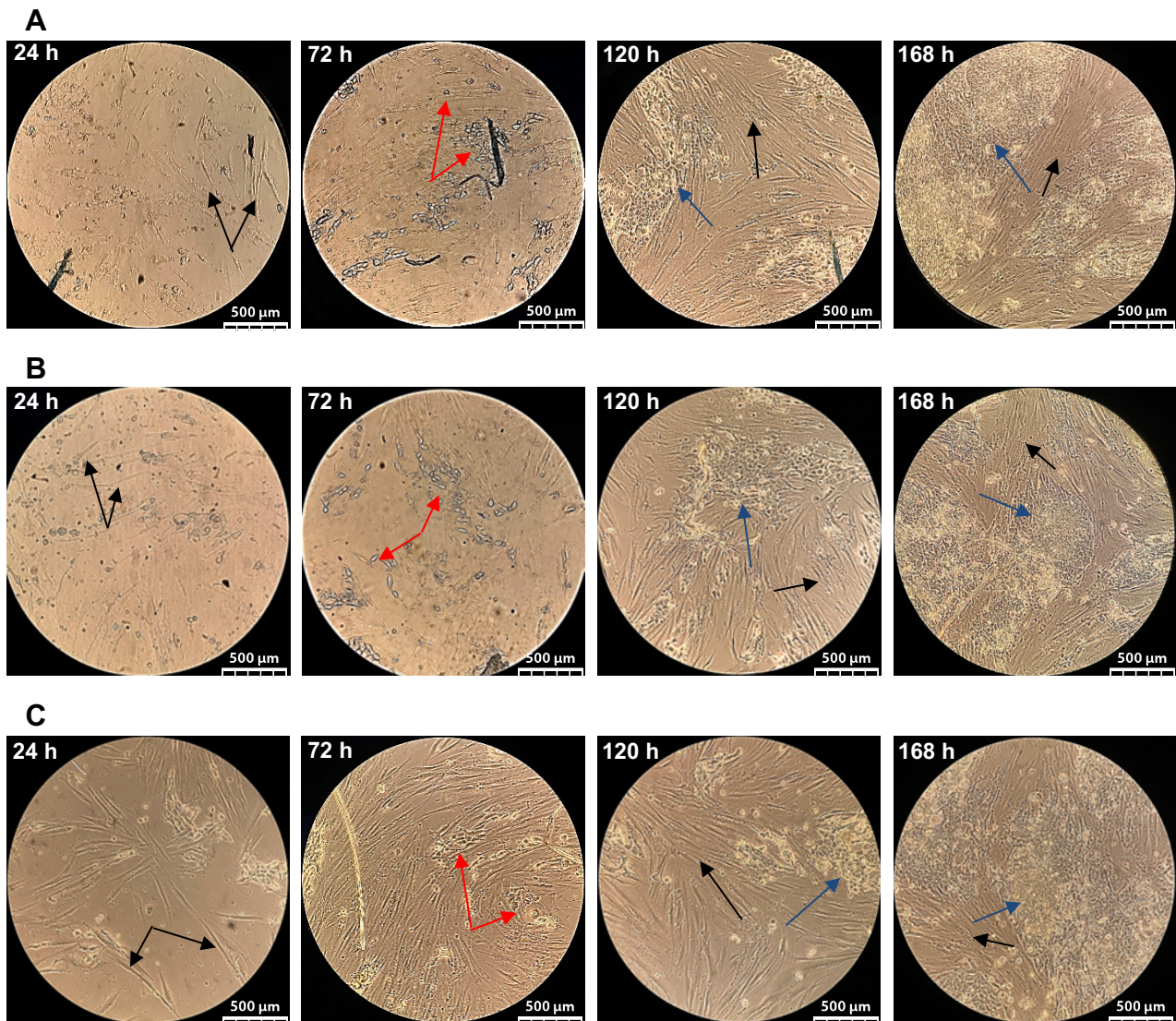


Abb. 10: Mikroskopische Analyse NIPP-Behandelter 2-D Kokultur aus HGF-1- und MCF-7-Zellen

Es wurden insgesamt 8 Replikate an 2-D Kokulturen in 24-Wellplatten ausgesät und über einen Zeitraum von 168 h unter dem Mikroskop beobachtet und bei 24 h, 72 h, 120 h und 168 h in 20-facher Vergrößerung dokumentiert. In der Abbildung ist exemplarisch die Fotoanalyse eines repräsentativen Replikates dargestellt. Eine 2-D-Kokultur bestand aus jeweils 9000 HGF-1-Zellen und 1000 MCF-7 Zellen, die in 1 ml HGF-1-Medium kultiviert wurden. Jedes Replikat bestand aus einer Gruppe ohne Behandlung (A), einer Gruppe die 1 min mit Plasma Care® (B) und einer Gruppe die 3 min mit Plasma Care® (C) behandelt wurde. Es sind die jeweils die HGF-1-Zellen mit schwarzen, die MCF-7-Zellen mit roten und die „MCF-7-Epithelinseln“ mit blauen Pfeilen dargestellt.

4.3 Einfluss von Netzümplantaten auf Monokulturen

Polypropylenetze sind seit 1959 bei der operativen Therapie von Hernien im Einsatz (Usher et al. 1959). Ein bekannter Vertreter ist das Optilene® Mesh Elastic des Pharma-Unternehmens B. Braun SE. Für die Untersuchung der Eigenschaften dieser Netzümplantate in einem in-vitro-Gewebe-Modell, wurde zunächst ihr Einfluss auf das

Wachstum der HGF-1- sowie der MCF-7-Zellen untersucht. Es wurden in 24-Wellplatten Monokulturen mit jeweils 3×10^4 Zellen pro Well ausgesät. Jedes Replikat bestand aus einer Gruppe ohne Netzimplantat (Abb. 11.1 A /11.2 A) und einer Gruppe mit einem integriertem Netzimplantat (Abb. 11.1 B und C/11.2 B und C). Das Wachstumsverhalten der Monokulturen wurde anhand mikroskopischer Aufnahmen in 4-facher sowie 10-facher Vergrößerung analysiert.

4.3.1 Einfluss von Netzimplantaten auf HGF-1-Zellen

Die mikroskopischen Aufnahmen in 4-facher Vergrößerung zeigten das eingelagerte Netzimplantat in der HGF-1-Monokultur und dienten lediglich als eine allgemeine Übersicht und erlaubten keine genauere Analyse (Abb. 11.1 B). Bei einem Vergleich des Zellwachstums zwischen der Kontrollgruppe (Abb. 11.1 A) und der Gruppe mit dem integrierten Netzimplantat (Abb. 11.1 C) in 10-facher Vergrößerung, waren keine eindeutigen Unterschiede zu beobachten. Rein mikroskopisch betrachtet hatte das Optilene Netzimplantat nach 120 h keinen Einfluss auf das Wachstum der HGF-1-Zellen. Des Weiteren ließen sich nach 120 h kaum bis gar keine Zellen auf den Fäden des Netzimplantates betrachten; sie schienen uneingeschränkt unter dem Netzimplantat zu wachsen.

4.3.2 Einfluss von Netzimplantaten auf MCF-7-Zellen

Auch hier wurde zur Übersicht die Integration des Netzimplantates in der Monokultur in 4-facher Vergrößerung dargestellt (Abb. 11.2 B). Beim Vergleich der Kontrollgruppe (Abb. 11.2 A) und der Gruppe mit dem integrierten Netzimplantat (Abb. 11.2 C) in 10-facher Vergrößerung, ließen sich ähnliche Resultate wie bei den HGF-1-Zellen (Abb. 11.1) beobachten. Bei der mikroskopischen Analyse zeigten die Netzimplantate nach 120 h keinen erkennbaren Einfluss auf das Wachstum der MCF-7-Zellen. Bei beiden Gruppen wuchsen die Zellen uneingeschränkt weiter. Nach 120 h ließen sich nur wenige einzelne MCF-7-Zellen auf den Netzfäden beobachten (Abb. 11.2 C).

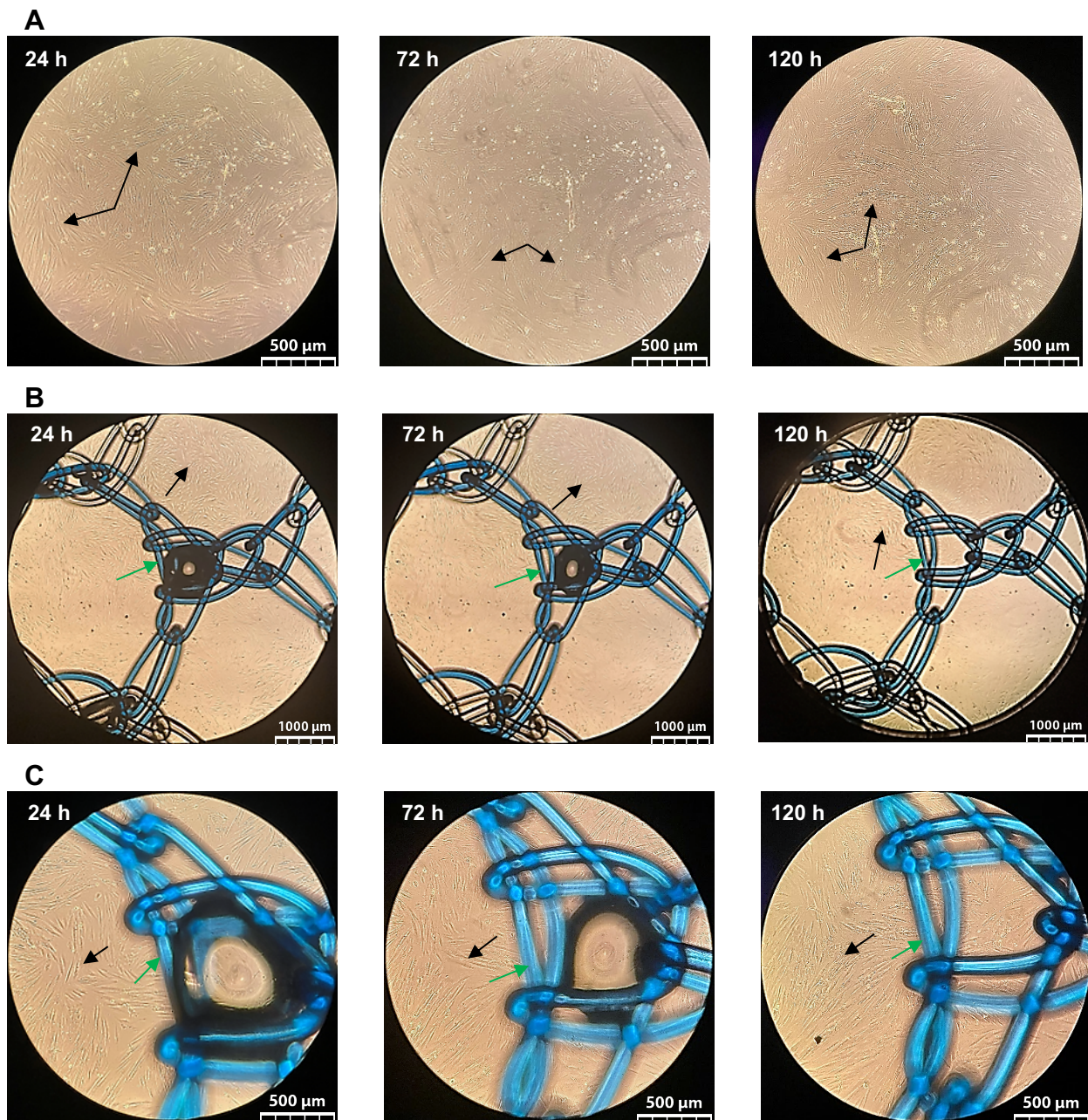


Abb. 11.1: Mikroskopische Analyse einer HGF-1-Monokultur mit integriertem Netzimplantat

Es ist repräsentativ 1 von 4 Replikaten mit HGF-1-Monokulturen dargestellt, welche in 24-Wellplatten für 120 h kultiviert wurden. Pro Well wurden 3×10^4 HGF-1-Zellen ausgesät und nach 24 h, 72 h und 120 h mikroskopische Aufnahmen durchgeführt. Jedes Replikat bestand aus 2 Wells. Ein Well enthielt nur die Monokultur, deren Wachstum in 10-facher Vergrößerung dargestellt ist (A). Im anderen Well wurde zusätzlich ein Optilene Netzimplantat integriert, und das Wachstumsverhalten in 4-facher (B) sowie 10-facher Vergrößerung (C) dargestellt. Die HGF-1-Zellen sind mit schwarzen und die Netzimplantate mit grünen Pfeilen dargestellt.

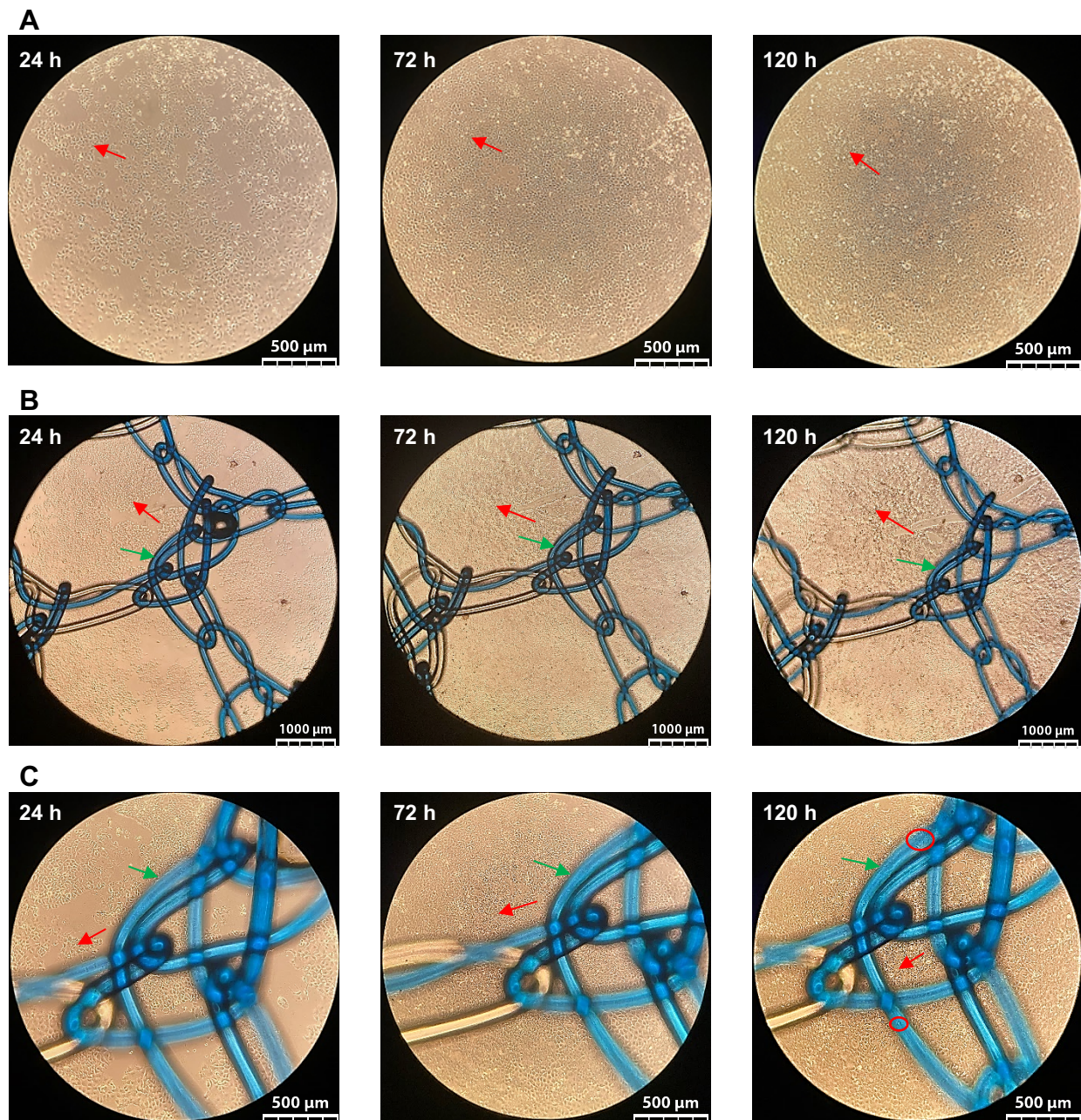


Abb. 11.2: Mikroskopische Analyse einer MCF-7-Monokultur mit integriertem Optilene Netzimplantat

Es ist repräsentativ 1 von 4 Replikaten mit MCF-7-Monokulturen dargestellt, welche in 24-Wellplatten für 120 h kultiviert wurden. Pro Well wurden 3×10^4 MCF-7-Zellen ausgesät und nach 24 h, 72 h und 120 h mikroskopische Aufnahmen durchgeführt. Jedes Replikat bestand aus 2 Wells. Ein Well enthielt nur die Monokultur, deren Wachstum in 10-facher Vergrößerung dargestellt ist (A). Im anderen Well wurde zusätzlich ein Optilene Netzimplantat integriert, und das Wachstumsverhalten in 4-facher (B) sowie 10-facher Vergrößerung (C) dargestellt. Die MCF-7-Zellen sind mit roten und die Netzimplantate mit grünen Pfeilen dargestellt. Einzelne MCF-7-Zellen auf den Netzimplantaten sind mit roten Kreisen markiert (C).

4.4. Einfluss von NIPP auf die 2-D-Kokultur mit Netziplantat

Nachdem beobachtet wurde, dass die Netziplantate keinen Einfluss auf das Wachstum der HGF-1- und MCF-7-Zellen haben (s. 4.3.), wurde nun auch der Einfluss der Netziplantate auf die 2-D-Kokultur aus beiden Zellen untersucht, diesmal jedoch mit zusätzlicher NIPP-Behandlung.

Es wurden in 24-Wellplatten 2-D-Kulturen mit jeweils 9000 HGF-1-Zellen und 1000 MCF-7-Zellen pro Well angelegt. Jedes Replikat bestand aus einer Gruppe mit integriertem Netziplantat ohne vorherige NIPP-Behandlung (Abb. 12 A und B) und einer Gruppe, bei der die 2-D-Kokultur vor der Integration des Netziplantats für 3 min mit Plasma Care® behandelt wurde (Abb. 12 C). Die Analyse erfolgte anhand mikroskopischer Aufnahmen in 4-facher sowie 10-facher Vergrößerung.

Die Aufnahmen in 4-facher Vergrößerung schafften einen groben Überblick aber erlauben keine genauere Auswertung. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden nur die Aufnahmen der unbehandelten Gruppe dargestellt sind (Abb. 12 A).

Eine genauere optische Analyse ließ sich jedoch bei den Aufnahmen in 10-facher Vergrößerung durchführen (Abb. 12 A und B). Bei beiden Gruppen war das aus den vorherigen Versuchsergebnissen hervorgegangene Wachstumsmuster der 2-D-Kokultur (s. 4.2) zu beobachten. Während nach 24 h noch eine unorganisierte Zellansammlung beider Zellen zu sehen war, zeigte sich bereits nach 72 h, wie sich die MCF-7-Zellen von den HGF-1-Zellen abgrenzten und typische MCF-7-Epithelinseln bildeten. Nach 120 h hatten sich die MCF-7-Epithelinseln vergrößert und waren deutlicher zu erkennen. Das Wachstumsverhalten der 2-D-Kokultur schien optisch betrachtet durch die NIPP-Behandlung nicht negativ beeinflusst zu sein (Abb. 12 C) und ähnelte sehr der unbehandelten Gruppe (Abb. 12 B). Des Weiteren waren bei beiden Gruppen nach 120 h kaum Zellen auf den Netziplantaten zu beobachten; die 2-D-Kokultur wuchs ungestört unter dem Netziplantat.

Zusammenfassend erwies sich aus den letzten Ergebnissen, dass die 2-D-Kokultur weder durch das Netziplantat noch durch die NIPP-Behandlung negativ beeinflusst wurde und das gleiche Wachstumsmuster unter der Bildung von MCF-7-Epithelinseln aufwies.

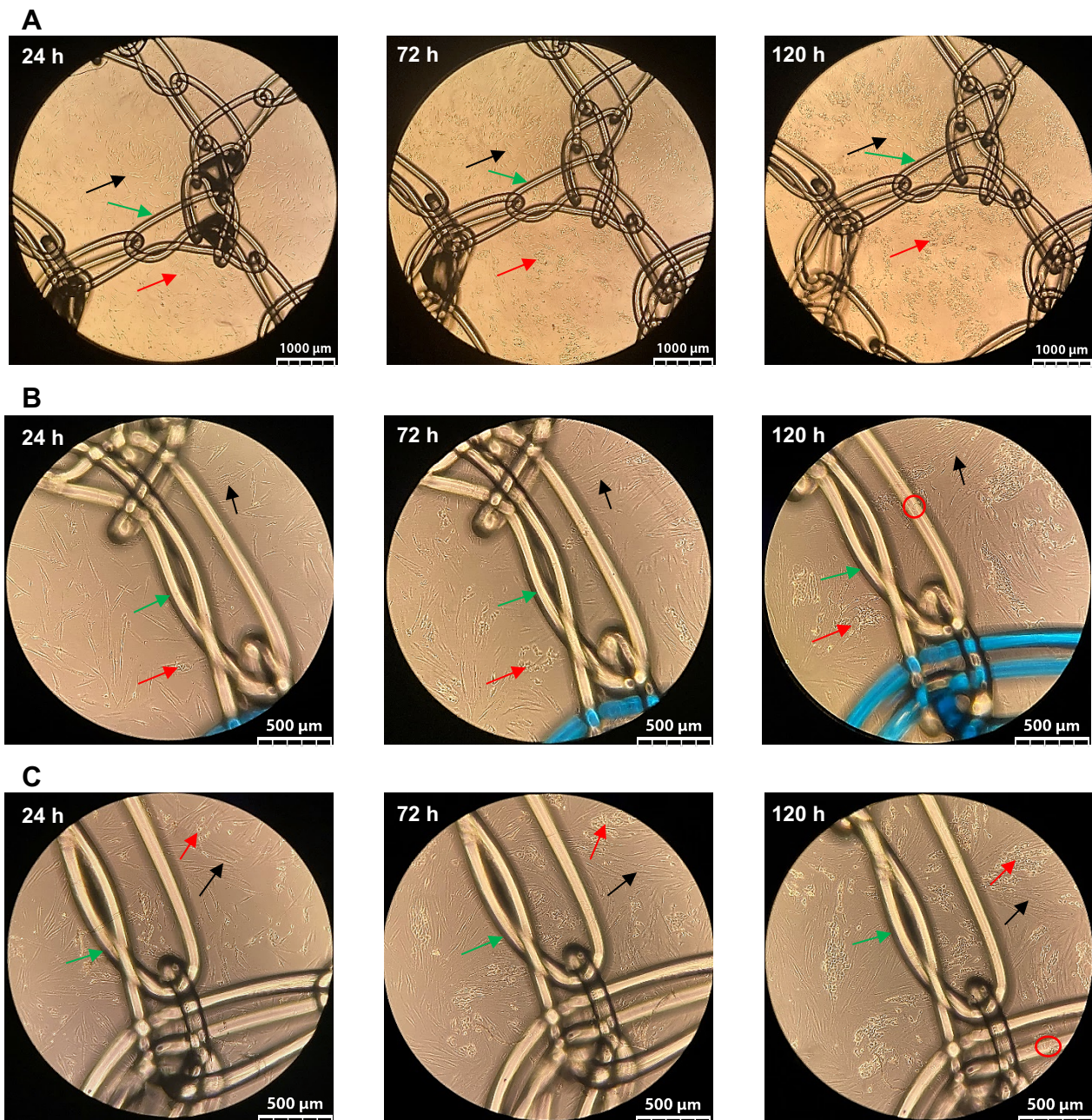


Abb. 12: Mikroskopische Analyse NIPP-Behandelter 2-D-Kokulturen mit integriertem Netzimplantat

Es ist repräsentativ 1 von insgesamt 4 Replikaten an 2-D-Kokulturen dargestellt. Jede 2-D-Kokultur bestand aus 9000 HGF-1- und 1000 MCF-7-Zellen, die in 24-Well-Platten ausgesät wurden. Netzimplantate wurden integriert und mikroskopische Aufnahmen nach 24 h, 72 h, 120 h angefertigt. Jedes Replikat umfasst eine unbehandelte 2-D-Kokultur, die hier in 4-facher (A) und 10-facher Vergrößerung (B) dargestellt ist, sowie eine 2-D-Kokultur, die vor der Integration des Netzimplantates 3 min mit Plasma Care® behandelt wurde und hier in 10-facher Vergrößerung dargestellt ist (C). Die HGF-1-Zellen sind mit schwarzen, die MCF-7-Zellen und -Epithelinseln mit roten und die Netzimplantate mit grünen Pfeilen dargestellt. Einzelne Zellen auf den Netzimplantaten sind mit roten Kreisen markiert.

4.5. Charakterisierung einer 3-D-Kokultur aus HGF-1- und MCF-7-Zellen

Um ein in-vitro-Gewebemodell zur Untersuchung regenerativer Effekte von NIPP zu etablieren, wurde als nächster Schritt die Bildung einer 3-D-Kokultur angestrebt. Hierfür wurden 3-D-Kokulturen in Sarstedt TC-Inserts ausgesät. Diese Inserts bestehen aus einer PET (Polyester)-Membran mit einer Porengröße von 0,4 μm . Die Transluzenz der Membran ermöglichte lichtmikroskopische Aufnahmen der 3-D-Kokulturen.

4.5.1 Mikroskopische Analyse der 3-D-Kokultur

Abbildung 13 zeigt exemplarisch die Entwicklung einer solchen 3-D-Kokultur in 20-facher Vergrößerung. Zunächst wurden pro Insert 5×10^4 HGF-1-Zellen ausgesät. Nach einem Tag war eine Monokultur an HGF-1-Zellen zu erkennen (Abb. 13, 1d). Am vierten Tag war bereits eine dichte Schicht an HGF-1-Zellen sichtbar (Abb. 13, 4d). Nach einer Woche wurden zusätzlich 1×10^4 MCF-7-Zellen pro Insert auf die vorhandenen HGF-1-Zellen ausgesät. Ein Tag später erkannte man auf der HGF-1-Zellschicht kleine Epithelinseln aus MCF-7-Zellen (Abb. 13, 8d). In den folgenden Tagen wurde das Insert immer mehr von MCF-7-Zellen bewachsen (Abb. 13, 10d) und es bildete sich 4 Tage nach dem Aussäen der MCF-7-Zellen eine zweite Zellschicht, die vollständig die HGF-1-Zellschicht bedeckte. Nach insgesamt 12 Tagen entstand eine 3-D-Kokultur aus zwei aufeinander liegenden Zellschichten, vergleichbar mit einem in-vitro-Gewebemodell (Abb. 13, 12d).

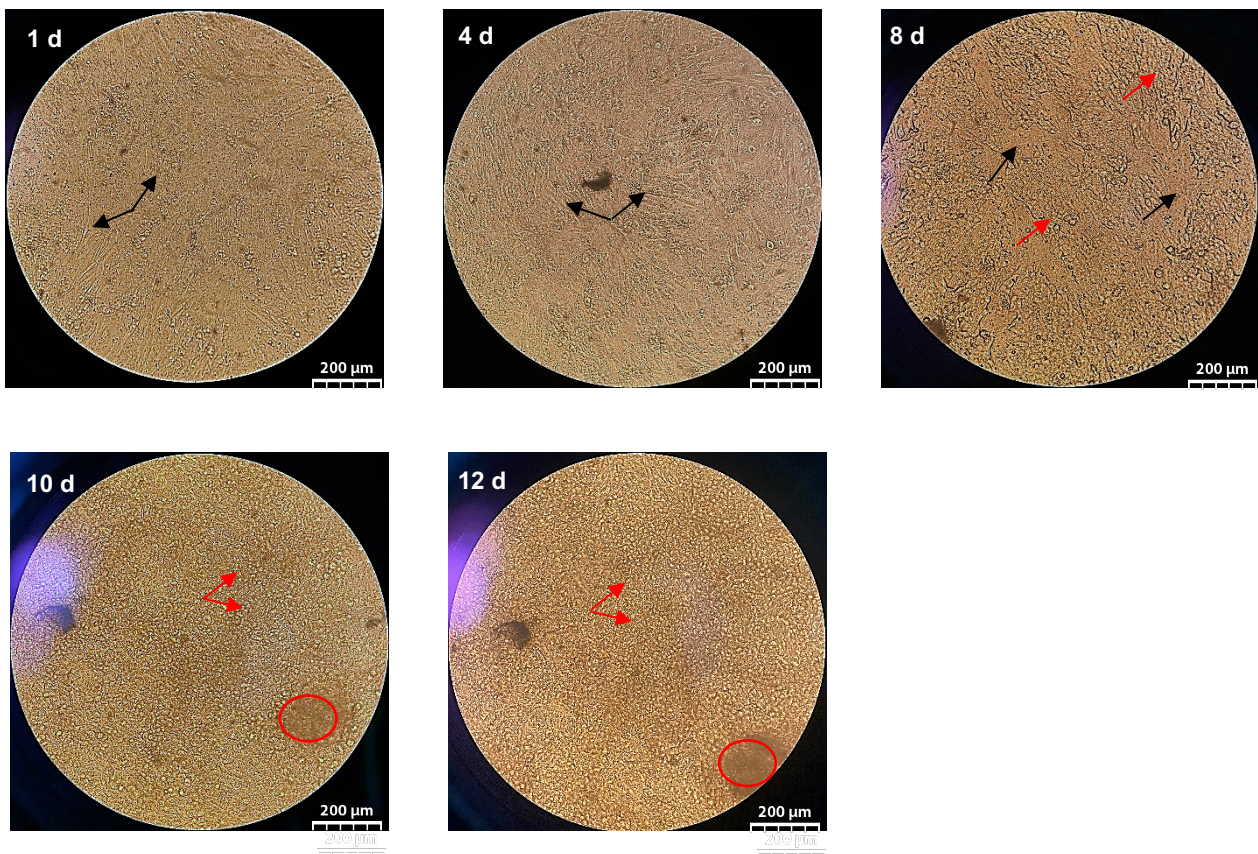


Abb. 13: Mikroskopische Analyse einer 3-D Kokultur aus HGF-1- und MCF-7-Zellen

Es ist repräsentativ 1 von 4 Replikaten an 3-D Kokulturen dargestellt, die in 24-Well-Inserts für 12 d kultiviert wurden. Am ersten Tag wurden 5×10^4 HGF-1-Zellen pro Insert ausgesät. Nach einer Woche wurden pro Insert zusätzlich 1×10^4 MCF-7-Zellen hinzugefügt. Das Wachstum wurde jeweils nach 1 d, 4 d, 8 d, 10 d und 12 d mittels mikroskopischer Aufnahmen in 20-facher Vergrößerung dokumentiert. Die HGF-1-Zellen sind mit schwarzen und die MCF-7-Zellen mit roten Pfeilen markiert. Dichte Ansammlungen an MCF-7-Zellen sind mit roten Kreisen markiert.

4.5.2 Stoffwechsellnachweis der 3-D-Kokultur

Glucose ist ein wichtiger Energielieferant für Zellen und spielt als primäre Energiequelle eine zentrale Rolle im Stoffwechsel. Der Glucosestoffwechsel ist daher ein wichtiger Indikator für die Funktionalität und Vitalität von Zellmodellen.

Für die Kultivierung der 3-D-Kokulturen wurde sowohl im Insert als auch im Well HGF-1-Medium verwendet. Die PET-Membran des Inserts mit einer Porengröße von $0,4 \mu\text{m}$ ermöglicht die basolaterale Diffusion kleiner Moleküle zwischen dem Medium im Insert und dem im Well, verhindert jedoch die Migration von Zellen.

Insgesamt wurden wie in Abschnitt 4.5.1 beschrieben 5 Replikate der 3-D-Kokulturen angelegt. Bei allen 5 Replikaten wurde innerhalb von 72 Stunden nach dem letzten

Kulturmediumwechsel ein Farbwechsel des Mediums sowohl im Insert als auch im Well festgestellt (Abb. 14 A). Die Farbe des frischen Mediums war anfangs hellrosa (0 h), wechselte dann von hellgelb (24 h) zu dunkelgelb (48 h) und war am dritten Tag gelbgrünlich (72 h). Der Farbwechsel im Medium deutet darauf hin, dass die Zellen Glucose verbrauchen. Dies geschieht durch den Abbau von Glucose im Rahmen der Glykolyse, bei der Glucose zu Pyruvat umgewandelt wird.

Zur Bestätigung des Glucoseverbrauchs wurden die Glucoskonzentrationen in den Medien aller 5 Replikate mittels Mikroplatten-Reader Infinite® 200 PRO (TECAN) kurz nach dem Mediumwechsel (0 h) und 3 Tage später (72 h) gemessen. Die Glucosekonzentration betrug nach 0 h durchschnittlich 3,37 g/l und nach 72 h durchschnittlich 1,95 g/l ($p=0,00000011$, $n=5$). Insgesamt nahm die Glucosekonzentration 72 h nach dem letzten Mediumwechsel um 42% ab (Abb. 14 B).

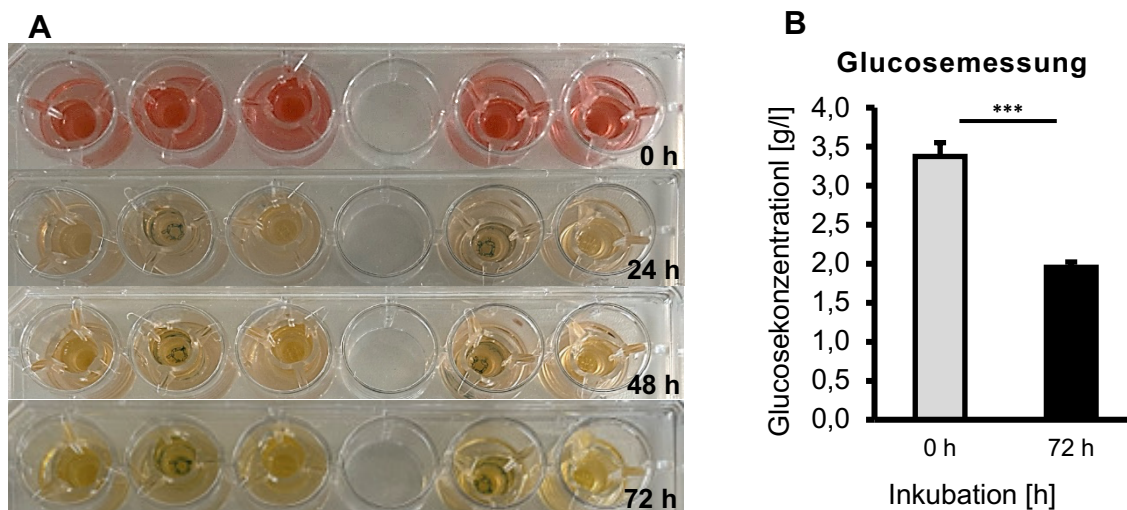


Abb. 14: Stoffwechselnachweis der 3-D Kokulturen in den Inserts

Der Glucosestoffwechsel wurde in Fünf 3-D-Kokulturen untersucht, wobei in vier davon Netzimplantate integriert wurden und eine ohne Netzimplantat belassen wurde (A, ganz links). Dargestellt ist zu einem der Farbwechsel des Mediums jeweils 0 h, 24h, 48 h und 72 h nach dem letzten Mediumwechsel (A). Zum anderen sind die mit dem Mikroplatten Reader Infinite® 200 PRO (TECAN) gemessenen Glucosekonzentrationen jeweils für 0 h und 72 h nach dem letzten Mediumwechsel abgebildet (B). Die Messwerte sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt. Der Unterschied der Glucosekonzentration bei 0 h und 72 h wurde mittels Student's T-test auf Signifikanz getestet (*= $p\leq 0,05$; **= $p\leq 0,01$; ***= $p\leq 0,001$).

4.6. Einfluss von NIPP auf die 3-D-Kokultur mit Netzipplantat

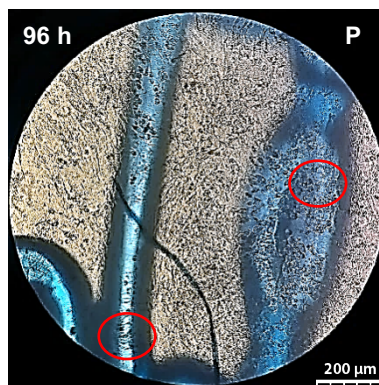
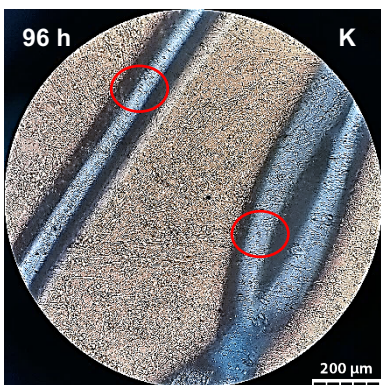
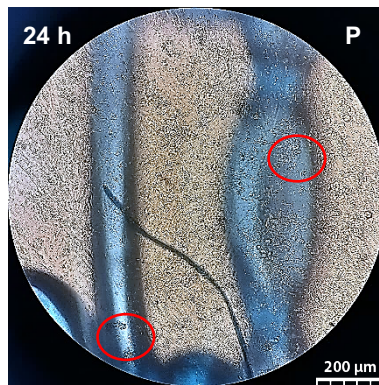
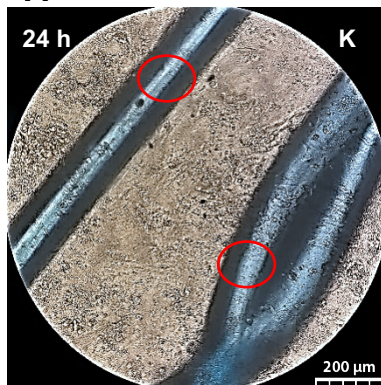
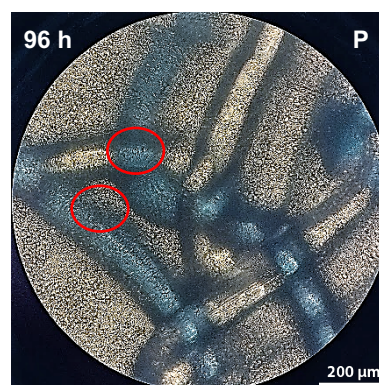
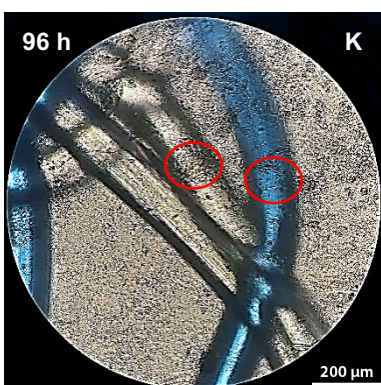
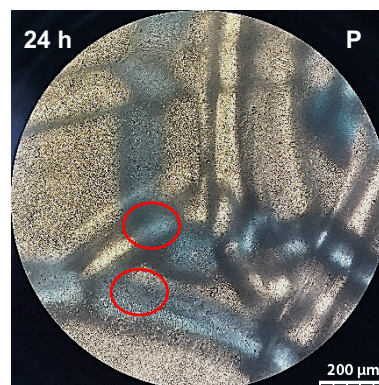
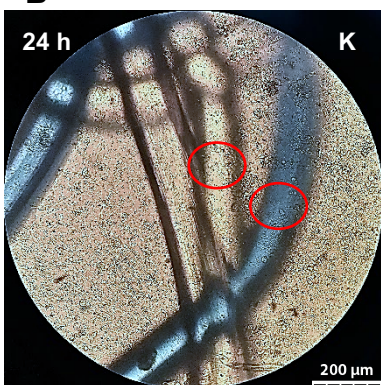
Das 3-D-Gewebemodell aus HGF-1- und MCF-7-Zellen wurde genutzt, um den Effekt von NIPP auf Zellen in Anwesenheit eines Netzipplantates zu untersuchen.

Die 3-D-Kokulturen wurden gemäß Abschnitt 3.5.1 hergestellt und die Netzipplantate aufgebracht. Jedes Replikat bestand aus zwei 3-D-Kokulturen, wobei eine nicht mit NIPP behandelt wurde und die andere vor der Netzintegration für 3 min mit NIPP behandelt wurde. Im Anschluss wurde das Wachstumsverhalten mikroskopisch in 20-facher Vergrößerung nach 24 h und 96 h dokumentiert.

Die unbehandelten (K) und behandelten (P) 3-D-Kokulturen wurden nach 24 h und 96 h verglichen (Abb. 15 A-C). Im Vergleich zur 2-D-Kokultur zeigte sich ein deutlicher Unterschied im Wachstumsverhalten. Während bei der 2-D-Kokultur kaum Zellen auf den Netzipplantaten zu sehen waren (Abb. 12), waren bei den 3-D-Kokulturen zahlreiche Zellen auf den Fäden der Netzipplantate zu erkennen, sowohl bei den unbehandelten als auch den behandelten Gruppen. Diese Zellen wurden morphologisch als MCF-7-Zellen identifiziert. Die Zunahme der Zellzahl von 24 h auf 96 h war bei allen Replikaten deutlich.

Nach 96 h waren tendenziell mehr Zellen auf den Netzipplantaten der NIPP-behandelten 3-D-Kokulturen zu beobachten (Abb. 15). Insbesondere bei Replikat 2 (Abb. 15 B) und Replikat 3 (Abb. 15 C) ließen sich die unbehandelte und behandelte Gruppe gut vergleichen, da die dokumentierten Stellen der Netzipplantate sehr ähnlich waren. Beim Vergleich einzelner Fäden des Netzipplantats zeigte sich bei der behandelten Gruppe eine größere Zunahme an Zellen von 24 h auf 96 h (Abb. 15).

Zusammenfassend wurde bei der 3-D-Kokultur ein Wachstum von MCF-7-Zellen auf den Netzipplantaten beobachtet. Die NIPP-Behandelten 3-D-Kokulturen wiesen tendenziell rein optisch mehr Zellen auf den Netzipplantaten auf (Abb. 15).

A**B**

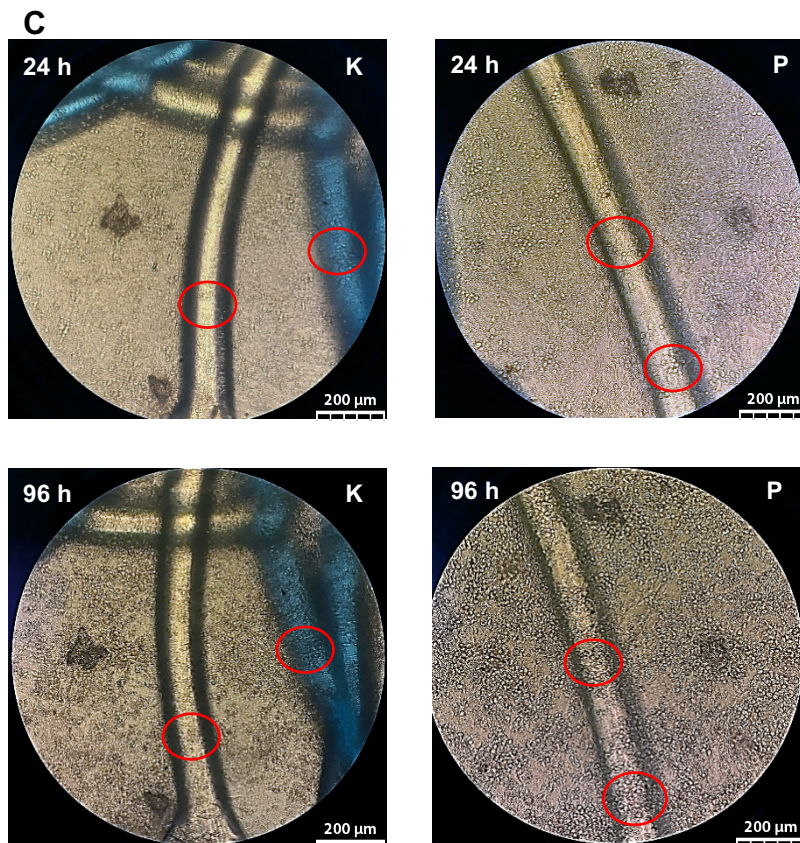


Abb. 15: Mikroskopische Analyse von NIPP-Behandelten 3-D-Kokulturen mit integrierten Netzimplantaten

Es sind exemplarisch 3 von insgesamt 12 Replikaten an 3-D-Kokulturen in 24-Well-Insert mit integrierten Netzimplantaten dargestellt (A-C). In jedem Replikat wurden zunächst 5×10^4 HGF-1-Zellen ausgesät und nach 7 d zusätzlich 1×10^4 MCF-7-Zellen hinzugefügt. Nach 12 Tagen wurden die fertigen 3-D-Kokulturen mit Netzimplantate bedeckt. Jedes Replikat bestand aus einer Gruppe, die nicht behandelt wurde (K) und einer Gruppe, die kurz vor der Integration des Netzimplantates für 3 min mit NIPP behandelt wurde (P). Es sind mikroskopische Aufnahmen 24 h und 96 h nach der Integration der Netzimplantate in 20-facher Vergrößerung gezeigt. Es sind Ansammlungen an MCF-7-Zellen auf den Netzimplantaten mit roten Kreisen markiert.

4.7. Fluoreszenzmikroskopische Analyse von Netziplantaten mittels DAPI

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine wichtige Methode in der Zellbiologie, um Zellen und ihre Bestandteile sichtbar zu machen. Eine häufig verwendete Methode ist die DAPI-Färbung, bei der die DNA der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI gefärbt wird. Durch die Anregung mit UV-Strahlen kann eine blaue Fluoreszenzemission mit einer maximalen Emission bei 433 nm (Tab. 7) nachgewiesen werden, wodurch Zellkerne deutlich als blau gefärbt sichtbar werden. Dies ermöglicht es, Zellen zu identifizieren, ihre Anzahl zu zählen und ihre Morphologie zu untersuchen.

4.7.1 Untersuchung der Netziplantate auf Autofluoreszenz im UV-Bereich

Für die Überprüfung der Netziplantate auf eine Autofluoreszenz, wurden diese einmal mit und einmal ohne DAPI-Färbung unter UV-Licht (355 nm Anregung, 433 nm Emission) mittels eines Fluoreszenzmikroskopes (ZOE Fluorescent Cell Imager) mikroskopiert (Abb. 16). Zum Vergleich wurden ebenfalls lichtmikroskopische Aufnahmen des Netziplantates gemacht (Abb. 16 A+D)

Das Netziplantat war ohne DAPI-Färbung unter UV-Licht bei niedriger Lichtintensität nicht sichtbar (Abb. 16 B). Bei hoher Lichtintensität war das Netziplantat allerdings deutlich zu erkennen (Abb. 16 C).

Nachdem das Netziplantat für 5 min mit DAPI gefärbt wurde, fluoreszierte dieses noch stärker unter UV-Licht. Das Netziplantat war bereits bei geringer Lichtintensität sichtbar (Abb. 16 E). Am stärksten fluoreszierte das Netziplantat nach DAPI-Färbung und hoher Lichtintensität des UV-Lichtes (Abb. 16 F).

Insgesamt lässt sich eine geringe Autofluoreszenz der Netziplantate unter dem UV-Licht feststellen, nach der DAPI-Färbung fluoreszierte das Netziplantat noch stärker.

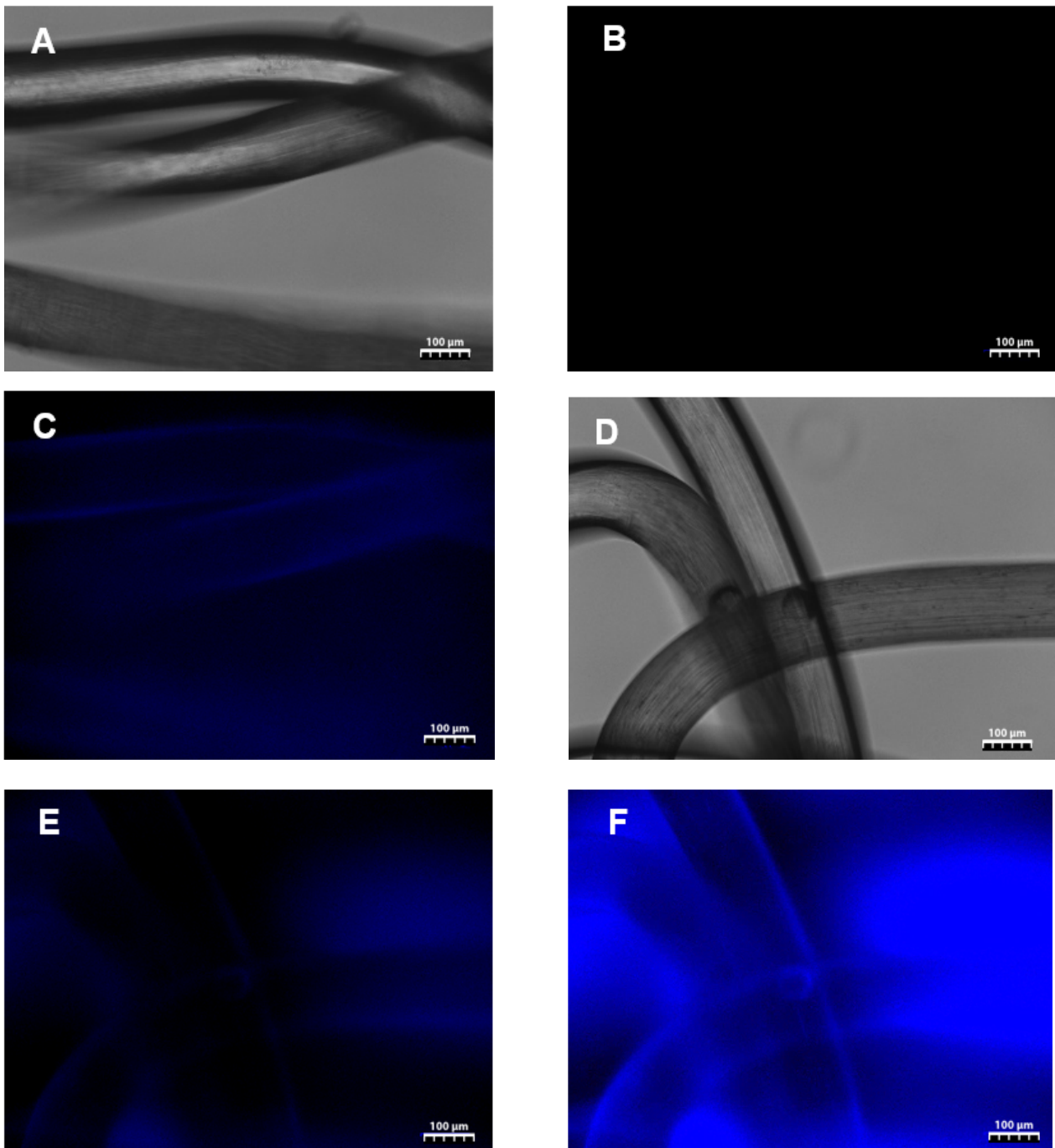


Abb. 16: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Netzimplantaten unter UV-Licht

Netzimplantate wurden sowohl mit als auch ohne DAPI-Färbung mittels ZOE Fluorescent Cell Imager (BIO-RAD) unter UV-Licht (Blue Channel) mikroskopiert. Es sind jeweils lichtmikroskopische Aufnahmen vom ungefärbten (A) und mit DAPI-gefärbte Netzimplantat (D) zu sehen. Darüber hinaus sind Aufnahmen des ungefärbten Netzimplantats unter UV-Licht mit niedriger (B) und hoher Lichtintensität (C) sowie Aufnahmen des DAPI-gefärbten Netzimplantats unter UV-Licht mit niedriger (E) und hoher Lichtintensität (F) dargestellt.

4.7.2. Darstellung von Zellen auf den Netziplantaten mittels DAPI

Nach der mikroskopischen Analyse der 3-D-Kokulturen mit integrierten Netziplantaten, bei denen Zellen auf den Netziplantaten beobachtet wurden (Abb. 15), wurden diese Zellen nun mittels DAPI gefärbt und detektiert. Dazu wurden die integrierten Netziplantate sowohl der unbehandelten als auch der mit 3 Minuten NIPP behandelten 3-D-Kokulturen nach 96 h aus den Inserts entfernt und mit DAPI gefärbt. Anschließend wurden die Netziplantate unter UV-Licht mit dem ZOE Fluorescent Cell Imager mikroskopiert. Die Lichtintensität des UV-Lichts wurde so eingestellt, dass die autofluoreszierenden Netziplantate (Abb. 16) möglichst ausgeblendet wurden und gleichzeitig möglichst viele gefärbte Zellkerne sichtbar dargestellt wurden (Abb. 17). Bei den Aufnahmen wurde auf die Ebene mit den meisten blau gefärbten Zellkernen fokussiert.

Sowohl bei der unbehandelten als auch bei der behandelten Gruppe waren einzelne blau gefärbte Zellkerne auf den Netziplantaten zu erkennen (Abb. 17). Durch die niedrig gewählte Lichtintensität war das autofluoreszierende Netziplantat kaum sichtbar, allerdings konnten so auch nicht alle gefärbten Zellkerne dargestellt werden. Bei einer hohen Lichtintensität waren die Aufnahmen wiederum nicht auswertbar.

Bei dem Netziplantat aus der behandelten 3-D-Kokultur (Abb. 17 A und C) waren tendenziell mehr gefärbte Zellkerne sichtbar als bei dem Netziplantat aus der unbehandelten 3-D-Kokultur (Abb. 17 B und D). Die NIPP-behandelten Netziplantate wiesen tendenziell mehr Zellen auf den Netziplantaten auf. Allerdings eignete sich die fluoreszenzmikroskopische Analyse mittels DAPI-Färbung nicht für eine signifikante Quantifizierung der Zellen auf den Netziplantaten.

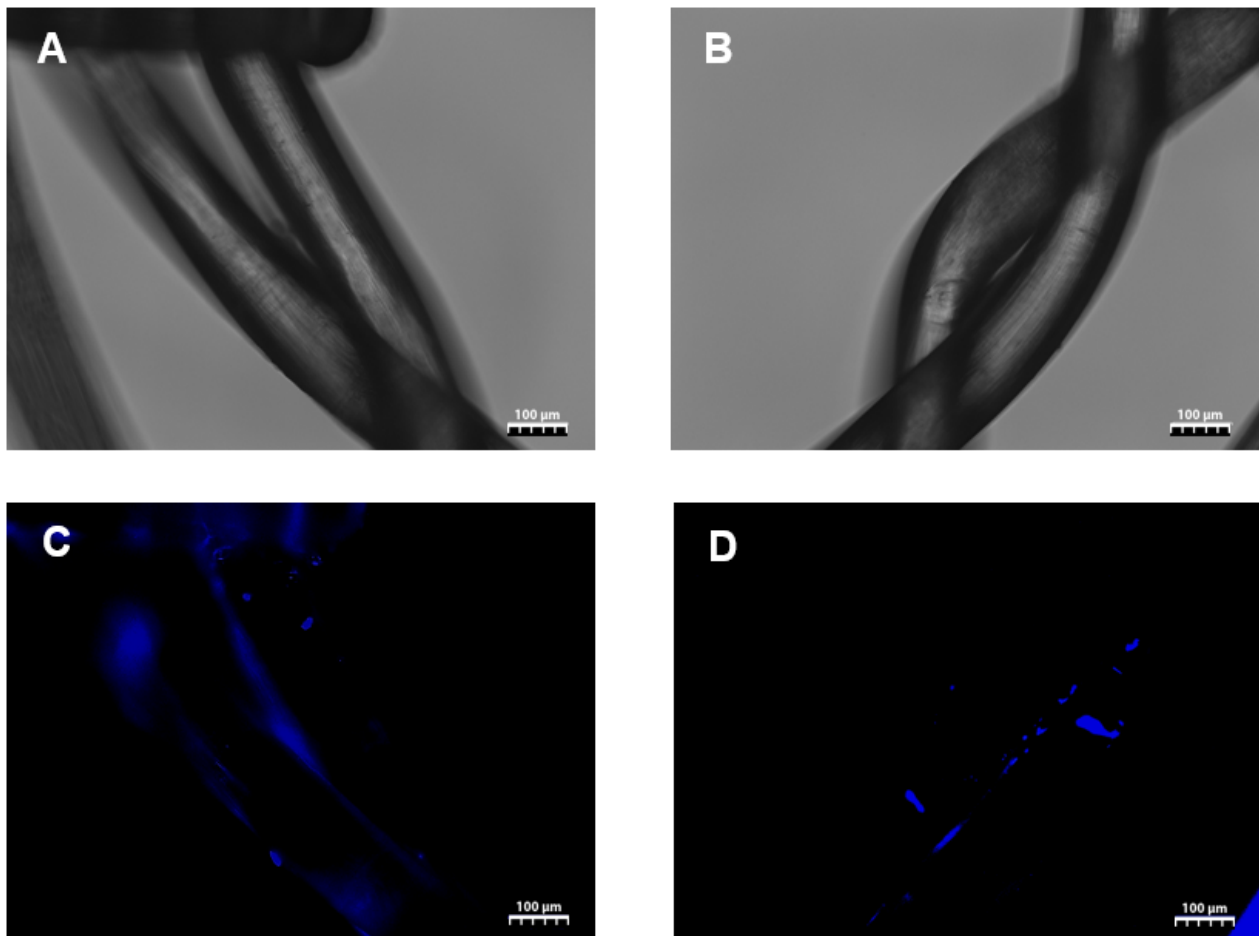


Abb. 17: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen DAPI-gefärbter Zellen auf Netzimplantaten

Die in den 3-D-Kokulturen integrierten Netzimplantate wurden nach 96 Stunden entfernt, und die darauf befindlichen Zellen wurden mit DAPI gefärbt. Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines exemplarischen Replikats wird dargestellt. Die Aufnahmen wurden mit dem ZOE Fluorescent Cell Imager (BIO-RAD) durchgeführt. Es sind sowohl eine lichtmikroskopische Aufnahme (A) als auch eine Aufnahme unter UV-Licht (C) von einem Netzimplantat einer unbehandelten 3-D-Kokultur dargestellt, sowie eine lichtmikroskopische Aufnahme (B) und eine Aufnahme unter UV-Licht (D) von einem Netzimplantat einer für 3 Minuten mit NIPP behandelten 3-D-Kokultur. Die Lichtintensität des UV-Lichts wurde passend gewählt, um die Autofluoreszenz des Netzimplantats auszublenden. Bei der Aufnahme wurde die Ebene mit den meisten sichtbar gefärbten Zellkernen fokussiert.

4.8. Fluoreszenzmikroskopische Analyse von Netziplantaten mittels Falloidin

Eine weitere fluoreszenzmikroskopische Methode zur Zellvisualisierung ist die Färbung des Zytoskeletts mit Falloidin-FITC. Falloidin ist ein natürlich vorkommendes Toxin, das spezifisch an F-Aktin bindet und so eine effektive Markierung dieser Zytoskelettkomponente ermöglicht. FITC, ein Fluoreszenzfarbstoff, fluoresziert grün, wenn es mit blauem Licht im Wellenlängenbereich von 495 nm bis 540 nm angeregt wird. Der "Green Channel" des ZOE Fluorescent Cell Imager nutzt blaues Licht (Anregung 480 nm, Emission 615 nm) zur Anregung von Falloidin-FITC.

4.8.1 Untersuchung der Netziplantate auf Autofluoreszenz im blauen Bereich

Die Netziplantate zeigten bei der Untersuchung unter UV-Licht eine Autofluoreszenz (s. 4.7.1). Nun wurden die Netziplantate auf Autofluoreszenz unter blaues Licht sowohl mit als auch ohne vorherige Falloidin-Färbung untersucht (Abb. 18). Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen des ZOE Cell Imagers (BIO-RAD) zeigten, dass das ungefärbte Netziplantat bei niedriger Lichtintensität (Abb. 18 B) keine Autofluoreszenz aufwies. Bei hoher Lichtintensität waren nur teilweise die Ränder des ungefärbten Netziplantats sichtbar (Abb. 18 C). Selbst nach Falloidin-Färbung fluoreszierte das Netziplantat bei niedriger Lichtintensität nicht (Abb. 18 E). Bei hoher Lichtintensität fluoreszierte das mit Falloidin gefärbte Netziplantat jedoch eindeutig (Abb. 18 F).

Insgesamt war die Autofluoreszenz des Netziplantats unter blaues Licht deutlich geringer (Abb. 18) als unter UV-Licht (Abb. 16).

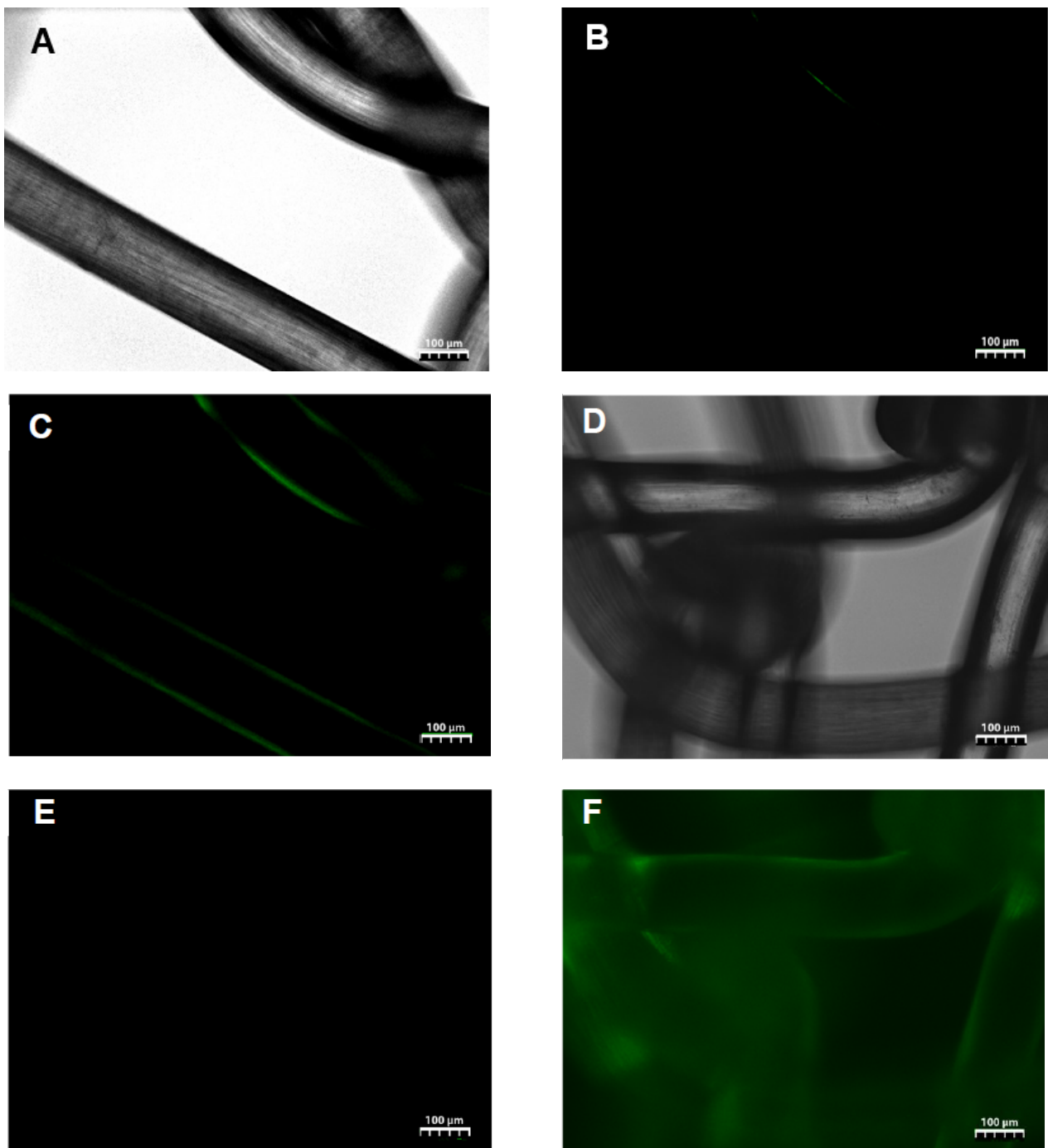


Abb. 18: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Netzimplantaten unter blaues Licht

Netzimplantate wurden sowohl mit als auch ohne Falloidin-Färbung mittels ZOE Fluorescent Cell Imager (BIO-RAD) unter blaues Licht (Green Channel) mikroskopiert. Es sind jeweils lichtmikroskopische Aufnahmen vom ungefärbten (A) und mit Falloidin-gefärbten Netzimplantat (D) zu sehen. Darüber hinaus sind Aufnahmen des ungefärbten Netzimplantats unter blaues Licht mit niedriger (B) und hoher Lichtintensität (C) sowie Aufnahmen des Falloidin-gefärbten Netzimplantats unter blaues Licht mit niedriger (E) und hoher Lichtintensität (F) dargestellt.

4.8.2 Darstellung von Zellen auf den Netzimplantaten mittels Falloidin

Es wurden 3-D-Kokulturen aus HGF-1- und MCF-7-Zellen angelegt und Netzimplantate integriert. Jedes Replikat bestand aus einer unbehandelten und einer kurz vor der Integration des Netzimplantates für 3 min mit NIPP-behandelten 3-D-Kokultur. Die Netzimplantate wurden nach 96 h aus den 3-D-Kokulturen entfernt, mit Falloidin gefärbt und mittel ZOE Cell Imager unter blaues Licht (Green Channel) mikroskopiert (Abb. 19). Die Lichtintensität wurde so eingestellt, dass die Netzimplantate kaum autofluoreszierten und nur die gefärbten Zellen dargestellt werden. Es wurde die Ebene mit den meisten sichtbar gefärbten Zellen fokussiert.

Bei beiden Gruppen konnten Grün gefärbte Zellen auf den Netzimplantaten beobachtet werden (Abb. 19). Dabei waren bei der behandelten Gruppe (Abb. 19 B) deutlich mehr Zellen als bei der unbehandelten Gruppe (Abb. 19 A) sichtbar. Die NIPP-Behandlung hatte zu mehr Wachstum von Zellen auf den Netzimplantaten geführt. Trotz der geringeren Autofluoreszenz der Netzimplantate unter blaues Licht erwies sich die Fluoreszenzmikroskopische Analyse mittels Falloidin ebenfalls als keine geeignete Methode zur signifikanten Quantifizierung von Zellen auf den Netzimplantaten.

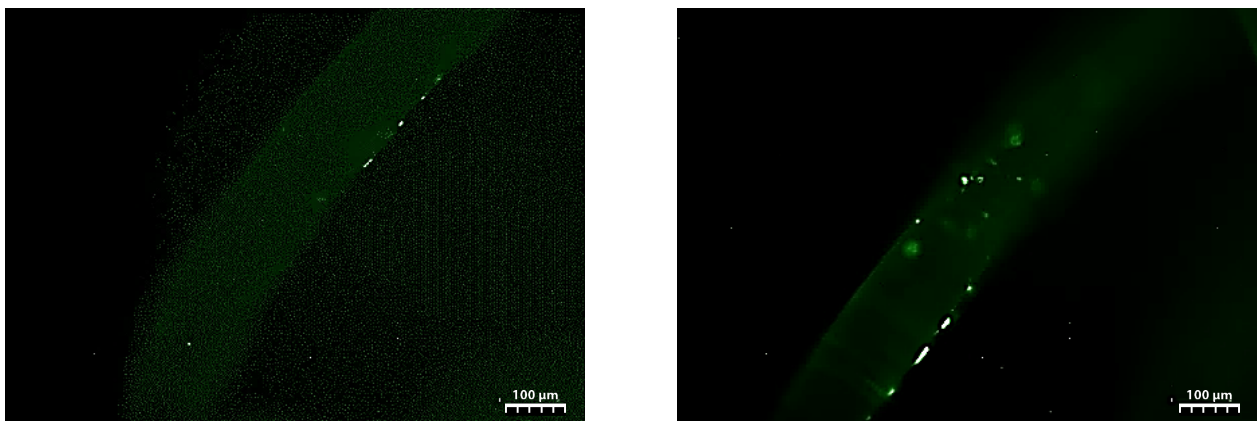


Abb. 19: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen Falloidin-gefärbter Zellen auf Netzimplantaten

Die in den 3-D-Kokulturen integrierten Netzimplantate wurden nach 96h entfernt und die darauf befindenden Zellen mittels Falloidin gefärbt. Es ist exemplarisch die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Replikates dargestellt. Die Aufnahmen wurden mittels ZOE Fluorescent Cell Imager (BIO-RAD) unter blauem Licht (Green Channel) durchgeführt, wobei das Netzimplantat einer unbehandelten 3-D-Kokultur (A) dem Netzimplantat einer für 3 min mit NIPP behandelten 3-D-Kokultur (B) gegenübersteht. Die Lichtintensität des UV-Lichtes ist passend gewählt, um die Autofluoreszenz des Netzimplantat auszublenden. Bei der Aufnahme wurde die Ebene mit den meisten sichtbar gefärbten Zellen fokussiert.

4.9. Quantifizierung der Zellen auf den Netzümplantaten

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde genutzt, um in 3-D-Kokulturen die Präsenz einzelner Zellen auf den Netzümplantaten nachzuweisen (Abb. 17+19). Anschließend erfolgte die Quantifizierung der Zellzahl, um signifikante Unterschiede zwischen unbehandelten und mit NIPP behandelten 3-D-Kokulturen aufzuzeigen. Dabei konzentrierte sich die Zellzählung auf die MCF-7-Zellen, welche die obere Schicht der 3-D-Kokultur bildeten und somit auf den Netzümplantaten beobachtet werden konnten. Zur Quantifizierung der Zellzahl auf den Netzümplantaten wurden drei verschiedene Messmethoden angewandt: eine manuelle Zählung mit einer Neubauer-Zählkammer sowie automatische Zellzählungsmethoden mittels des EVE™ Cell Counters und des CASY Cell Counter & Analysers. Die ausgewerteten Messdaten sind in Abbildung 12 dargestellt. Die vollständigen Messdaten finden sich im Anhang.

4.9.1 Quantifizierung der Zellen mittel Neubauer-Zählkammer

Die Neubauer-Zählkammer ist eine einfache mikroskopische Methode zur Bestimmung der Zellzahl in einer Zellsuspension. Diese Kammer besteht aus einer speziell entwickelten Glasträgerplatte mit einer exakt kalibrierten Gitterstruktur aus Quadraten. Durch das Einbringen einer verdünnten Zellsuspension in die Kammer und die anschließende mikroskopische Auszählung kann die Anzahl der Zellen auf einem definierten Areal genau ermittelt werden.

Bereits rein mikroskopisch war bei der Zellsuspension der unbehandelten Gruppe (Abb. 21 A) eine deutlich geringere Zellzahl im Vergleich zur behandelten Gruppe (Abb. 21 B) erkennbar. Die mikroskopische Analyse zeigte, dass es sich ausschließlich um MCF-7-Zellen handelte.

Nach der Quantifizierung ergab sich in der unbehandelten Gruppe eine durchschnittliche Zellzahl von $3,0 \times 10^5$ Zellen/ml (SD= +/- 0,6), während in der behandelten Gruppe die durchschnittliche Zellzahl bei $10,1 \times 10^5$ Zellen/ml (SD= +/- 1,1) lag (Abb. 22 B). Somit führte die NIPP-Behandlung zu einer mehr als dreifach höheren Anzahl von MCF-7-Zellen auf den Netzümplantaten ($p=0,00014$, $n=6$).

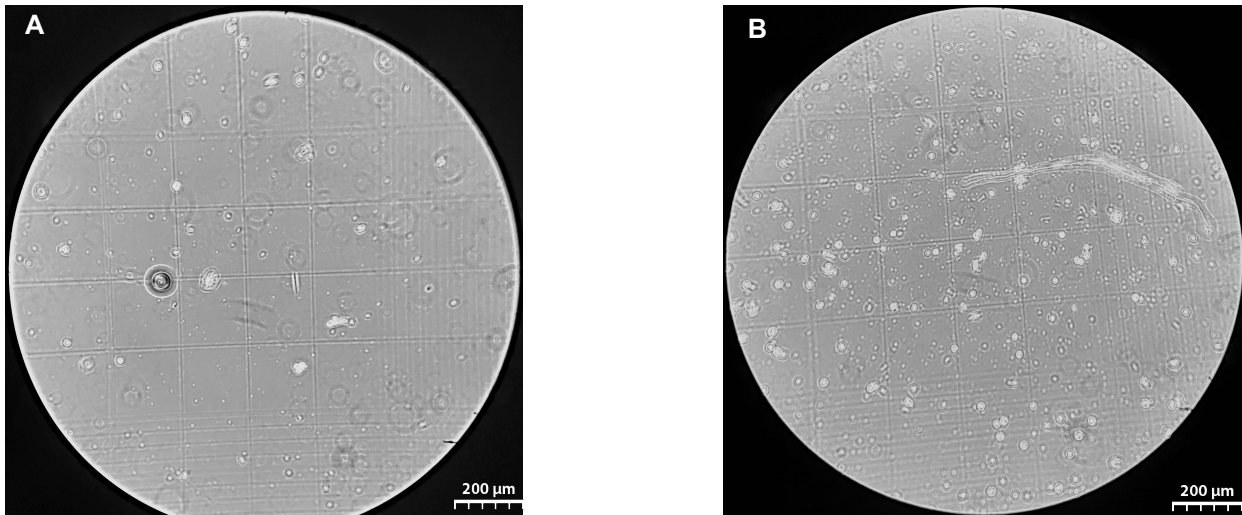


Abb. 20: Mikroskopische Aufnahme der Zellsuspension auf der Neubauer-Zählkammer

Die Zellzahl der auf den Netzimplantaten befindlichen MCF-7-Zellen wurde manuell mittels Neubauer-Zählkammer gemessen. Dabei wurden jeweils 10 µl Zellsuspension pro Replikant in die Kammer pipettiert und die Zellen unter dem Mikroskop gezählt. Die mikroskopischen Aufnahmen der Neubauer-Zählkammer eines Replikats in 10-facher Vergrößerung sind auf der Abbildung zu sehen. Zum Vergleich sind jeweils die Zellsuspension eines Netzimplantats aus einer unbehandelten 3-D-Kokultur (A) und die Zellsuspension eines Netzimplantats aus einer für 3 Minuten mit NIPP behandelten 3-D-Kokultur (B) dargestellt.

4.9.2 Quantifizierung der Zellen mittels EVE™

Der EVE™ Cell Counter ist ein innovatives Instrument, das für die schnelle und präzise Messung von Zellzahlen entwickelt wurde. Durch die Nutzung modernster Bild-Verarbeitungstechnologie ermöglicht der EVE™ Cell Counter eine automatisierte Erfassung und Analyse von Zellkulturen.

Für die Zellzählung wurden, die in 3-D-Kokulturen integrierten Netzimplantate nach 96 h entfernt und die darauf befindlichen Zellen in mehreren Schritten abgetrennt. Dafür wurden die Netzimplantate aus den Inserts entnommen, mit PBS gespült und durch eine Trypsin/EDTA-Lösung gelöst und anschließend die Reaktion mit PBS gestoppt. Die daraus gewonnene Zellsuspension wurde anschließend zur Zellzählung verwendet. Zusätzlich zu den vom EVE™ ermittelten MCF-7-Zellzahlen wurden mikroskopische Aufnahmen auf dem Display des Gerätes angezeigt (Abb. 21).

Die mikroskopische Aufnahme des Netzimplantates aus unbehandelten 3-D-Kokulturen (Abb. 21 A) zeigte deutlich weniger Zellen im Vergleich zu dem Netzimplantat aus der 3 min mit NIPP behandelten 3-D-Kokulturen (Abb. 21 B). Weiterhin war anhand der

Zellform zu erkennen, dass es sich ausschließlich um MCF-7-Zellen handelte, wie bereits bei 4.6. beobachtet.

Die durchschnittlich ermittelte Zellzahl in der unbehandelten Gruppe betrug $2,2 \times 10^5$ Zellen/ml (SD= $\pm 0,9$), wodurch sie deutlich niedriger als bei der NIPP-behandelten Gruppe mit $11,1 \times 10^5$ Zellen/ml (SD= $\pm 3,4$) lag (Abb. 22 A). Die NIPP-Behandlung führte somit zu einer fünffachen Vermehrung der MCF-7-Zellen auf den Netzümplantaten ($p=0,00093$, $n=6$).

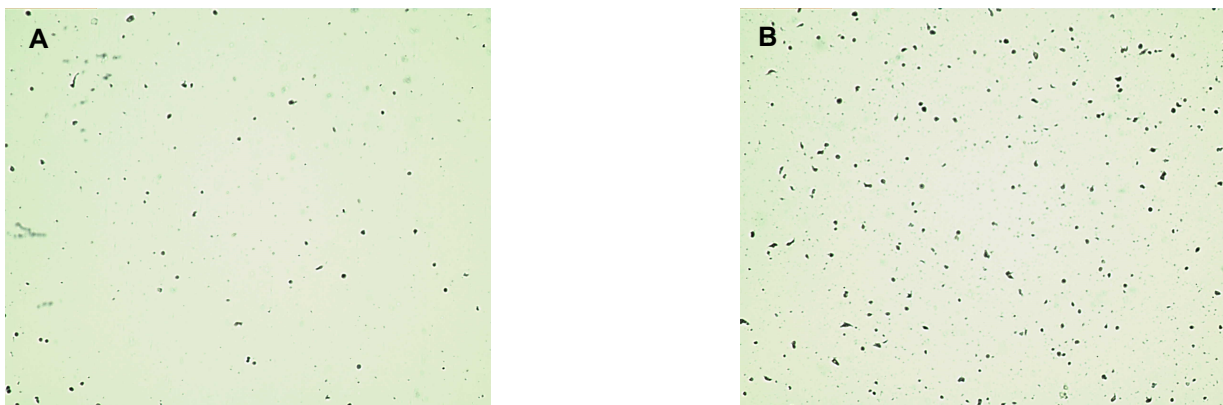


Abb. 21: Mikroskopische Aufnahme der Zellsuspension der Netzümplantate mittels EVE™

Die in 3-D-Kokulturen für 96 h integrierten Netzümplantate wurden aus den Inserts entnommen. Die darauf befindlichen Zellen wurden abgetrennt und die Zellzahl wurde unter anderem mittels des EVE™ automated Cell Counter (NanoEntek) gezählt. Die mikroskopischen Aufnahmen der Zellsuspension eines exemplarischen Replikats von jeweils einem Netzümplantat aus einer unbehandelten 3-D-Kokultur (A) und aus einer für 3 min mit NIPP behandelten 3-D-Kokultur (B) sind in der Abbildung dargestellt, wie sie auf dem Display des Zählgerätes angezeigt wurden.

4.9.3 Quantifizierung der Zellen mittels CASY

Der CASY Cell Counter & Analyzer ist ein speziell entwickeltes Gerät für präzise und schnelle Zellzählung sowie Analyse. Durch Messung der elektrischen Leitfähigkeit einer Zellsuspension ermöglicht das Gerät die genaue Bestimmung von Zellgröße und -anzahl und hat daher bereits in zahlreichen Forschungsarbeiten Anwendung gefunden. Das Zählgerät kann zwischen tote und lebende Zellen unterscheiden und ermöglicht so eine Lebendzellzahlbestimmung.

Zur Zellzählung wurden die Zellen auf den Netzümplantaten der 3-D-Kokulturen abgetrennt, und die erhaltene Zellsuspension mittels CASY Cell Analyzer & Counter gemessen.

Die durchschnittlich gemessene Zellzahl bei den Netzümplantaten der unbehandelten 3-D-Kokulturen lag bei $3,8 \times 10^5$ Zellen/ml (SD= $\pm 0,7$), während sie bei den Netzümplantaten der für 3 min mit NIPP behandelten 3-D-Kokulturen durchschnittlich $12,9 \times 10^5$ Zellen/ml (SD= $\pm 9,7$) betrug (Abb. 22 C). Somit führte die NIPP-Behandlung auch hier zu einer mehr als dreifach höheren Anzahl von MCF-7-Zellen auf den Netzümplantaten. Diese Methode konnte die vorherigen Ergebnisse (4.9.1 und 4.9.2) zwar bestätigen, jedoch war der Unterschied der unbehandelten zu der behandelten Gruppe aufgrund der geringen Anzahl an Replikaten und der hohen Standardabweichung gemäß dem Student's T-test statistisch nicht signifikant ($p=0,11$, $n=4$).

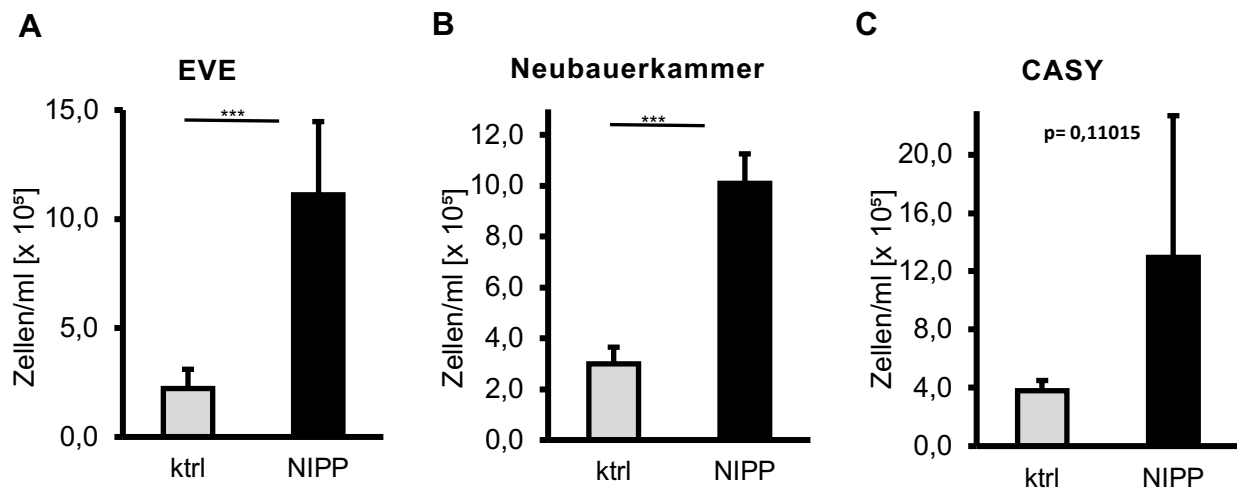


Abb. 22: Quantifizierung der Zellzahl auf den Netzümplantaten

Um die genaue Zellzahl der auf den Netzümplantaten bewachsenen Zellen zu bestimmen, wurden 3 verschiedene Methoden zur Quantifizierung angewendet. Bei allen Messmethoden wurden die Netzümplantate nach 96 h aus den Inserts entfernt, die Zellen von den Netzümplantaten abgetrennt und die gewonnene Zellsuspension einmal mittels EVE™ automated Cell Counter NanoEntek (A), einmal mittels Neubauer-Zählkammer (B) und einmal mittels CASY Cell Counter and Analyzer (C) gemessen. Die Messwerte sind jeweils als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt. Die Messwerte der Netzümplantate aus den unbehandelten 3-D-Kokulturen (Kontrolle) wurden den Messwerten der Netzümplantate aus den für 3 min mit NIPP behandelten 3-D-Kokulturen (Behandelt) gegenübergestellt. Der Unterschied zwischen der unbehandelten Gruppe (Kontrolle) und der behandelten Gruppe (Behandelt) wurde mittels Student's t-Tests auf statistische Signifikanz geprüft (*= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$; ***= $p \leq 0,001$). Die vollständigen Messdaten finden sich im Anhang.

5. Diskussion

Kaltplasma (Eng.: Cold-Athmospheric-Plasma/CAP) stellt eine neue nicht-invasive Therapiemöglichkeit dar und findet bereits in verschiedenen Bereichen der Medizin Anwendung (Arndt et al. 2013, Djonckheere et al. 2023, Eggers et al. 2020, Hämmerle et al. 2023, Kleineidam et al. 2021, Scheper et al. 2021, Theinkom et al. 2021 van Welzen et al. 2021, Weltmann et al. 2010, 2012a und 2012b). Zur klaren Abgrenzung vom Blutplasma wurde in dieser Arbeit die Bezeichnung NIPP („nicht-invasives physikalisches Plasma“) verwendet. Sowohl die antibakterielle Effektivität als auch die antiproliferative Wirkung von NIPP auf diverse Tumorzellen wurde in zahlreichen Studien bestätigt (Badr et al. 2023, Gay-Mimbrera et al. 2016, Nietsch 2020, Sope et al. 2020, von Woedtke et al. 2008, Yan et al. 2017, Ziuzina et al. 2014).

5.1. NIPP inhibiert das Wachstum der MCF-7-Zellen

Nicht nur in Tierstudien konnte die Antikrebstwirkung von NIPP an verschiedenen Krebszelllinie gezeigt werden (Dubuc et al. 2018). Eine klinische Studie konnte sogar die effektive Verkleinerung der Tumormasse oberflächlicher Kopfhals Tumore nachweisen (Schuster et al. 2016). Die apoptotische und oxidative Wirkung von NIPP auf die MCF-7-Zellen wurde bereits nachgewiesen und die adjuvante Anwendung bei Brustkrebspatienten diskutiert (Kadhem et al. 2019, Laka et al. 2019, Stope et al. 2020). In dieser Arbeit konnte ebenfalls eine Behandlungszeitabhängige antiproliferative Wirkung von NIPP auf die Brustkrebszellen mittels Plasma Care nachgewiesen werden. Sowohl nach 1 min als auch nach 3 min NIPP-Behandlung konnte eine signifikante Wachstumshemmung der MCF-7-Zellen beobachtet werden (Abb.9 B). Die wachstumshemmende Wirkung ist bei der Tumorthherapie erwünscht und ermöglicht somit eine neue nicht-invasive Therapieoption in der Onkologie.

5.2 NIPP führt zur leichten Wachstumsstimulation der HGF-1-Zellen

Ein weiterer Vorteil der NIPP-Behandlung ist, dass Krebszellen auf die NIPP-Behandlung sensibler reagieren und die Zellphysiologie, Zytologie sowie DNA-Integrität von gesunden humanen Zellen nicht beeinträchtigt wird (Arndt et al. 2015, Bekeschuss et al. 2018, Isbary et al. 2010 und 2012, Kluge et al. 2016, Schmidt et al. 2017, Stope 2020). Es wird sogar teilweise eine Zelltyp-abhängige Aktivierung der Zellproliferation von gesunden humanen

Zellen bei kurzen Behandlungszeiten beschrieben (Arndt et al. 2013, Evert et al. 2021, Yan et al. 2018). Wir konnten eine antiproliferative Wirkung von NIPP auf den humanen HGF-1-Zellen ausschließen. Bei einer NIPP-Behandlung von 3 min konnte sogar eine zwar leichte, aber signifikante positive Beeinflussung des Zellwachstums nachgewiesen werden (Abb. 9 A). Das Ergebnis spricht für eine potenziell regenerative Wirkung von NIPP auf gesunde menschliche Zellen.

5.3 Regenerative Effekte von NIPP wurden bereits erfolgreich angewendet

Es wurde bereits in zahlreichen In-vivo-Studien die Anwendung von NIPP zur Förderung der Heilung von akuten und chronischen Wunden untersucht. NIPP konnte durch seine antibakterielle und wundheilungsanregende Wirkung erfolgreich zur Prophylaxe von Erkrankungen wie beispielsweise der Strahlendermatitis aber auch zur Behandlung von Extraoralen und intraoralen Wunden angewendet werden (Arndt et al. 2013, Djonckheere et al. 2023, Eggers et al. 2020, Hämmerle et al. 2023, Heinlein et al. 2013, Scheper et al. 2021). Die effektive Verkleinerung der Wundflächen durch NIPP wurde unter anderem durch eine Senkung des pH-Wertes des Wundbereiches, Senkung des Risikos von Wundinfektionen, Förderung der Reepithelialisierung und Senkung von Blutkrusten und Fibrinschichten sowie die Freisetzung von Zytokinen und Stimulation der Angiogenese erklärt (Hämmerle et al. 2023, Heinlein et al. 2011 und 2013 van Welzen et al. 2021).

Die regenerativen Effekte von NIPP auf die Wundheilung machen deren Anwendung zur besseren Einheilung von Implantatmaterialien interessant. Die weltweit am meisten durchgeführte Implantatoperation ist die Implantationen von künstlichen Zahnwurzeln aus Titan. Es werden allein jährlich ca. 1,3 Millionen Zahnimplantate in Deutschland gesetzt (Ritzert 2018). Es wurde bereits der Einfluss von NIPP auf die Zahnimplantate aus Titan und Zirkon untersucht und eine Steigerung der Oberflächenhydrophilie festgestellt, welche einen positiven Einfluss auf die Integration in den Kieferknochen haben kann (Guo et al. 2022, Zheng et al. 2020). NIPP kann durch die Verminderung der bakteriellen Anhaftung am Implantat und Verbesserung der Zelladhäsion zu einer besseren Osseointegration von Zahnimplantaten führen (Canullo et al. 2017, Hennigsen et al. 2018, Lee et al. 2017, Modic et al. 2019, Park et al. 2011). Ähnliche Effekte von NIPP auf die

Förderung der Zelladhäsion und Zellproliferation konnten in dieser Arbeit bestätigt werden, welche weiter unten erläutert werden.

5.4 Relevanz regenerativer Effekte von NIPP an Netziplantaten

Die Untersuchung regenerativer Effekte von NIPP wurde anhand von In-vitro-Gewebemodellen mit Netziplantaten untersucht. Bei dem verwendeten Netziplantat handelte es sich um ein monofiles elastisches Netziplantat aus Polypropylen, welches in der Hernienchirurgie zur Anwendung kommt.

Nach dem zweiten Weltkrieg kamen in der operativen Therapie von Hernien Netziplantate aus polymeren Kunststoffen immer mehr zum Einsatz (Köckerling et al. 2012, von Soleimanian 2008). Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse hinsichtlich der Rezidivraten und postoperativen Komplikationen wurden Sie immer populärer und sind heute nicht mehr aus der Hernienchirurgie wegzudenken (Muysoms et al. 2012, von Lenzen-Schulten 2016). Durch den Einsatz von Netziplantaten konnten sowohl das Rezidivrisiko als auch die postoperativen Komplikationsraten deutlich gesenkt werden (Amid et al. 1994, Conze et al. 2005, Dietz et al. 2007, Horesysek 1997, Langer et al. 2005, Lawson et al. 2015, Paul et al. 1997, Schumpelick et al. 1996, von Lenzen-Schulten 2016). Heute gibt es über 150 verschiedene Netziplantate aus unterschiedlichen Materialien auf dem Markt, wobei sich neben den Polyester-Netziplantaten hauptsächlich die großporige Netziplantate aus Polypropylen durchgesetzt haben (Bittner et al. 2012, von Soleimanian 2008, Klosterhalfen et al. 2000).

Trotz Anwendung von Netziplantaten und verbesserte Operationstechniken werden in aktueller Literatur Rezidivraten zwischen 0-32% beschrieben (Burger et al. 2004, Debodinance et al. 2002 und 2006, Kayaoglu et al. 2005, Rockenstiehl 2010, van Veen et al. 2007). Zudem kommen spezifische Komplikationen aufgrund der Implantation von Kunststoffnetzen vor, wie etwa Serome, Schmerzen, Infektionen, Adhäsionen, Fisteln, Nervirritationen und Bewegungseinschränkungen (Klosterhalfen et al. 1997 und 1998, Klosterhalfen 2000). Auch eine mögliche Kanzerogenität der Netziplantate wird diskutiert (Ott et al. 1963, Schumpelick und Klinge 2002). Zwar konnte Turner in einer Tierstudie an Ratten die Ausbildung von Sarkomen nachweisen (Oppenheimer et al.

1958), aber bis heute wurden trotz über 1.000.000 weltweit implantierten Kunststoff-Netzen pro Jahr keine Weichgewebstumore oder Karzinome an Netzen dokumentiert.

All diese noch bestehenden Sorgen und Problematiken erfordern die Forschung weitere Therapiemöglichkeiten zur Verbesserung der Behandlungsergebnisse. Da die Anwendung von NIPP bereits wie oben beschrieben in verschiedenen Bereichen der Medizin erfolgreich einen Mehrwert zeigen konnte, war Ziel dieser Arbeit regenerative Effekte von NIPP bezüglich der Einheilung von Netzimplantaten im Gewebe zu untersuchen.

5.5 Charakterisierung eines Gewebemodells mittels direktem 3-D-Kokultur-Modell

Zur Untersuchung solcher regenerativen Effekte von NIPP sollte zunächst ein in-vitro-Organmodell charakterisiert werden. Für die Herstellung eines solchen Modells wurden fibroblastäre humane HGF-1-Zellen und epitheliale Brustkrebszellen MCF-7 verwendet. Beide Zellen wurden bezüglich ihrer Zellproliferation nicht negativ durch das verwendete Netzimplantat beeinflusst. Angelegte Monokulturen beider Zellen mit integrierten Netzimplantaten zeigten keinen Unterschied zur Kontrollgruppe (Abb. 11). Die gleichen Resultate konnten ebenfalls bei der 2-D-Kokultur aus beiden Zellen beobachtet werden, die trotz integrierter Netzimplantate uneingeschränkt gewachsen sind (Abb. 12).

Die 2-D-Kokultur aus HGF-1- und MCF-7-Zellen zeigte, dass beide Zellen separat voneinander wuchsen, wodurch typische Epithelinseln aus MCF-7-Zellen entstanden und sich eine Gewebeähnliche Struktur bildete. Dabei hatte NIPP keine Auswirkung auf das Wachstumsmuster dieser 2-D-Kokultur (Abb. 10). Das 2-D-Kokultur-Modell eignete sich nicht zur Untersuchung regenerativer Effekte von NIPP, da keine Zelladhäsion auf den Netzimplantaten beobachtet werden konnte (Abb. 12).

Um ein Gewebemodell herzustellen, welches der in-vivo Situation näherkommt und die Untersuchung regenerativer Effekte von NIPP erlaubt, wurde ein direktes 3-D-Kokultur-Modell in einsetzbaren porenhaltigen Einsätzen (Inserts) etabliert (Abb. 4). Die 0,4 µm großen Poren des Inserts ermöglichten die Stoffwechsel Fähigkeit des dreidimensionalen in-vitro-Gewebemodell, gleichzeitig konnte durch die kleine Porengröße die Zellwanderung verhindert werden. Das etablierte Gewebemodell bestand aus zwei

Gewebeschichten mit jeweils unterschiedlichen Zelltypen. Da die MCF-7-Zellen unabhängig von ihrer Umgebung in Inselartige Strukturen wachsen (Abb. 10 und 12), konnte so auf eine gewachsene HGF-1-Zellschicht durch aussäen von MCF-7-Zellen eine zweite Gewebeschicht aus MCF-7-Zellen gebildet werden, welche die erste Gewebeschicht (HGF-1-Zellschicht) vollständig bedeckte (Abb. 13). Die Vitalität und Aktivität des Gewebemodells konnte anhand des Glucosestoffwechsels nachgewiesen werden (Abb. 14). Glucose ist nicht nur der wichtigste Energieträger für menschliche Zellen wie etwa der im Gewebemodell befindlichen HGF-1-Zellen, sondern auch essenziell für die Brustkrebszellen MCF-7. In Studien konnte nachgewiesen werden, dass der Glucoseentzug zur Apoptose der Karzinomzellen führt und daher der Eingriff in den Glucosestoffwechsel ein möglicher Ansatzpunkt für die Tumorthherapie sein kann (Bensch 2011, Hou et al. 2017). Daher bestätigen sowohl die Abnahme der Glucosekonzentration im Medium um durchschnittlich 42% nach 72 h als auch der Farbwechsel des Mediums von Rot auf Gelb aufgrund der pH-Wert Änderung des Mediums, den Glucoseverbrauch der Gewebemodelle und somit Ihre Vitalität.

5.6 Zellbesiedlung der Netziplantate

Die dreidimensionale Struktur des Gewebemodells ermöglichte ebenfalls die Adhäsion von MCF-7-Zellen der obersten Zellschicht auf den Netziplantaten (Abb. 15). Dass sich tatsächlich Zellen auf den Netziplantaten etablierten, konnte sowohl durch die fluoreszenzmikroskopische Färbung mit DAPI (Abb. 17) als auch mit Falloidin (Abb. 19) nachgewiesen werden. Bereits bei der mikroskopischen Beobachtung der Gewebemodelle mit integrierten Netziplantaten konnten sowohl bei den lichtmikroskopischen Aufnahmen in 20-facher Vergrößerung (Abb. 15) als auch bei den Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen nach Färbung der Zellen (Abb. 17 und 19) tendenziell mehr Zellen auf den Netziplantaten NIPP-behandelter Gewebemodelle beobachtet werden. Eine Quantifizierung war mikroskopisch allerdings nicht möglich.

5.7 Fluoreszenzmikroskopische Analyse ermöglicht keine Quantifizierung

Der erste Ansatz zur Quantifizierung war die fluoreszenzmikroskopische Analyse der Zellen. Bereits bei der lichtmikroskopischen Analyse konnte festgestellt werden, dass es sich bei den Zellen auf den Netziplantaten ausschließlich um MCF-7-Zellen handelte

(Abb. 15). MCF-7-Zellen konnten bereits in anderen Studien erfolgreich fluoreszenzmikroskopisch mittels DAPI sowie Falloidin dargestellt und untersucht werden. Mittels DAPI lassen sich die Zellkerne als runde bis ovale bläuliche Strukturen darstellen, wobei anhand der Morphologie zwischen normalen, mitotischen und apoptotischen Zellen unterschieden werden kann (Kadhem et al. 2019, Laka et al. 2019). Mittels Falloidin lässt sich das Zytoplasma der MCF-7-Zellen unter entsprechendem Fluoreszenzlicht sichtbar untersuchen und zytoplasmatische Vorsprünge darzustellen (Akhavantabasi et al. 2012). Es können auch beide Fluoreszenzfarbstoffe zur vollständigen Darstellung der MCF-7-Zellen kombiniert werden (Kopp et al. 2016, Vantangoli et al. 2015).

Allerdings tauchten bereits die ersten Schwierigkeiten aufgrund der festgestellten Autofluoreszenz der Netzümplantate sowohl unter UV-Licht (Blue Channel) als auch unter blauem Licht (Green Channel) des ZOE Cell Imager auf. Die Autofluoreszenz verstärkte sich nach der Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen (Abb. 8 und 10). Daher musste die Intensität des Lichtes bei den mikroskopischen Aufnahmen niedrig gewählt werden, um die Netzümplantate zur klaren Darstellung der Zellen möglichst ausblenden zu können. Die niedrige Intensität des Lichtes hatte allerdings zur Folge, dass nicht alle Zellen dargestellt werden konnten. Des Weiteren handelt es sich bei den Netzümplantaten um eine dreidimensionale in sich gewebte bzw. gestrickte Struktur, bei der sich die Zellen auf verschiedene Ebenen anlagern können (Abb. 2.2). Daher war durch die komplexe Struktur der Netzümplantate eine optische Darstellung aller angelagerter Zellen mittels zweidimensionaler mikroskopischer Aufnahmen unmöglich. Es wurde stets auf die Ebene mit den meisten sichtbaren Zellen fokussiert. Ein weiterer Grund, wieso eine effiziente Quantifizierung mittels Fluoreszenz-mikroskopischer Färbung nicht möglich war, ist dass sich viele Zellen bereits bei den Spülvorgängen während des Färbungsprozesses von den Netzümplantaten lösten.

5.8 NIPP fördert das Zellwachstum auf Netzümplantaten

Neben der bekannten antiproliferativen Wirkung von NIPP auf diverse Tumorzellen (Koensgen et al. 2017, Nietsch 2020, Stope et al. 2020, Xia et al. 2019, Yan et al. 2017), konnte bei kurzen Behandlungszeiten eine Aktivierung der Zellproliferation in gesunden humanen Zellen nachgewiesen werden (Arndt et al. 2013, Eggers et al. 2016, Evert et al.

2021). Wachstumsfördernde Effekte wurden unter anderem auf Gingivazellen, Zementoblasten und Knochenzellen beobachtet (Eggers et al. 2020 und 2022, Evert et al. 2021, von Woedtke et al. 2016). Sowohl intraoral als auch extraoral wurden regenerative Effekte von NIPP auf die Schleimhaut bzw. Haut in verschiedenen klinischen Studien nachgewiesen (Arndt et al. 2013, Djonckheere et al. 2023, Eggers et al. 2022, Hämmerle et al. 2023, Kleineidam et al. 2019, Scheper et al. 2021, van Welzen et al. 2021).

Aufgrund der Schwierigkeiten einer Quantifizierung durch die licht- und fluoreszenzmikroskopischen Analysen, wurde eine andere Vorgehensweise für einen statistischen Nachweis regenerativer Effekte von NIPP gewählt. Die Zellen wurden über mehrere Schritte von den Netzimplantaten abgelöst und die Zellkonzentration der gewonnen Zellsuspensionen mittels drei unterschiedlicher Messmethoden bestimmt.

Alle drei Messmethoden zeigten eine deutlich höhere Anzahl an Zellen auf den Netzimplantaten der 3-minütig mit NIPP behandelten Gewebemodelle (Abb. 22). Die ermittelten Messwerte mittels EVE™ Cell Counter und der Neubauer-Zählkammer zeigten sich über den Student's als statistisch signifikant. Jedoch waren aufgrund der geringen Anzahl an Replikaten und der hohen Standardabweichung die Ergebnisse des CASY Cell Counter & Analyzer laut dem Student's T-Test nicht statistisch signifikant. Nichtsdestotrotz konnte der Effekt von NIPP durch eine dritte Messmethode bestätigt werden. Insgesamt konnte eine Zellproliferation von etwa 300 bis 500 Prozent auf das Wachstum von Zellen auf synthetischen Netzimplantaten nach einer 3-minütigen NIPP-Behandlung mittels Plasma Care festgestellt werden.

Vergleichbare Studien zum Effekt von NIPP auf synthetische Netzimplantate sind bislang nicht bekannt. Allerdings zeigten Tierstudien an Ratten regenerative Effekte von NIPP auf das Einheilen von Zahnimplantaten (Zheng et al. 2020). Durch die Verbesserung der Oberflächenhydrophilie der Implantatoberfläche kam es zu einer verbesserten Adhäsion von Osteoblasten auf den Implantaten (Canullo et al. 2016, Lee et al. 2017, Modic et al. 2019) und somit zu einer besseren Osseointegration (Henningsen et al. 2018).

5.9 Methodenkritik, Klinische Bedeutung und Ausblick

Trotz der nachgewiesenen antiproliferativen Wirkung von NIPP auf MCF-7-Zellen (Abb.1B), welche bereits in anderen Studien aufgezeigt wurde (Almeida-Ferreira 2022, Stope et al. 2020), führte die NIPP-Behandlung im charakterisierten Gewebemodell aus HGF-1- und MCF-7-Zellen mit integrierten Netziplantaten zu einer signifikant vermehrten Zellzahl auf den Netziplantaten und zeigte somit regenerative Effekte.

Dass NIPP regenerative Effekte aufweisen kann, wurde bereits anhand der fördernden Einheilung von Zahnimplantaten im Kieferknochen aufgezeigt (Canullo et al. 2016, Lee et al. 2017, Modic et al. 2019, Park et al. 2012). Auch in der Dermatologie wurde NIPP bereits zur regenerativen Therapie von akuten sowie chronischen Wunden erfolgreich eingesetzt (Arndt et al. 2013, Djonckheere et al. 2023, Hämmerle et al. 2023, Heinlein et al. 2011 und 2013, Isbary et al. 2010 und 2012, Scheper et al. 2021). Die aus dieser Studie gewonnen Erkenntnisse können nun die Diskussion über die Anwendung von NIPP zur besseren Einheilung von Netziplantaten in der Hernienchirurgie erlauben. Die regenerativen Effekte zusammen mit der bereits bekannten antibakteriellen Effektivität von NIPP könnten zur besseren Wundheilung und geringeren postoperativen Komplikationen wie etwa Infektionen und Rezidive beitragen.

Es werden allein in Deutschland jährlich über 350.000 Hernienoperationen durchgeführt, wodurch Hernien rein quantitativ zu den wichtigsten chirurgischen Indikationen zählen. Dadurch hat die Verbesserung und Erweiterung der Therapieoptionen einen wichtigen Stellenwert in der Medizin, insbesondere angesichts der noch existierenden postoperativen Komplikationen und dem Rezidivrisiko. Die Verwendung von alloplastischen Netziplantaten war dabei einer der wichtigsten Faktoren, die zur Besserung der Behandlungsergebnisse führen konnte (Burger et al. 2004, Debodinance et al. 2002 und 2006, Kayaoglu et al. 2005, Köckerling et al. 2012, Lawson et al. 2015, van Veen et al. 2007, von Lenzen-Schulte 2016, von Soleimanian 2008). Insbesondere im europäischen Raum herrscht eine große Einigkeit bezüglich des Einsatzes von Netziplantaten in der Hernienchirurgie (Muysoms et al. 2012). Daher besteht das Interesse die Einheilung solcher Netziplantate zu optimieren. Ein bekannter Ansatzpunkt aus der Literatur ist die Oberflächenbeschichtung der Netziplantate mit Titandioxid zur Verbesserung der Biokompatibilität (Deder 2015, Köckerling et al. 2012).

Die Ergebnisse dieser Arbeit sowie zahlreicher anderer Studien in verschiedenen Bereichen der Medizin (Arndt et al. 2013, Canullo et al. 2016, Evert et al. 2021, Guo et al. 2022, Hämmerle et al. 2023, Heinlein et al. 2013, Henningsen et al. 2018, Isbary et al. 2010 und 2012, Lee et al. 2017, Modic et al. 2019, Park et al. 2012, Scheper et al. 2021 Yan et al. 2018) zeigen regenerative Effekte von NIPP und machen die Anwendung von NIPP zur Optimierung der Einheilung von Netzimplantaten interessant.

Durch diese in-vitro gewonnen Resultate konnte zwar eine tendenzielle regenerative Wirkung von NIPP auf die Proliferation Zellen auf Netzimplantaten aufgezeigt werden, allerdings sind die in-vitro gewonnen Resultate nur bedingt auf die in-vivo Situation übertragbar. Das etablierten Gewebemodell besteht aus zwei Gewebeschichten mit Zellen unterschiedlicher Eigenschaften, welches definitionsgemäß eher einem Organmodell entsprechen würde. Zudem konnte die Struktur des gebildeten Gewebemodells nur mikroskopisch beschrieben werden, für eine Bestätigung der Zweischichtigkeit und der dreidimensionalen Struktur, sind histologische Untersuchung notwendig.

Aufgrund des hohen zeitlichen und labortechnischen Aufwands bei der Herstellung und Behandlung der Gewebemodelle sowie der anschließenden Quantifizierung der Zellen auf den integrierten Netzimplantaten, liegen nur wenige Versuchsdurchgänge vor (n= 4 bzw. n=6). Eine statistische Auswertung der Messdaten ist daher nicht möglich. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern zwar erste Hinweise auf potenziell regenerative Effekte von NIPP, jedoch sind weiterführende Studien zwingend erforderlich, um diese Beobachtungen zu validieren. Zukünftige Untersuchungen könnten zusätzliche molekulare Parameter einbeziehen, wie etwa die Zellmigration (Fähigkeit der Zellen, sich in den verletzten Bereich zu bewegen und zur Wundheilung beizutragen), die Reduktion der Mikroorganismenzahl (zur Senkung des postoperativen Infektionsrisikos) oder die Messung von Entzündungsmarkern (z. B. IL-6, TNF- α).

In der vorliegenden Arbeit wurden sämtliche Untersuchungen an einem großporigen Netzimplantat aus Polypropylen durchgeführt. Da derzeit über 150 unterschiedliche Netzimplantate aus verschiedensten Materialien verfügbar sind, wäre die Erweiterung der Untersuchungen auf weitere Netztypen und Materialien von großem wissenschaftlichem Interesse.

Des Weiteren wurde in dieser Studie das handmobile Plasmagerät Plasma Care® des Herstellers Terraplasma eingesetzt, das aktuell ausschließlich für die Anwendung in der Dermatologie zugelassen ist. Die Anwendung weiterer Plasmageräte könnte zusätzliche Erkenntnisse liefern, insbesondere im Hinblick auf verschiedene physikalische Parameter. Die regenerativen Effekte von NIPP wurden zudem nur bei einer Behandlungszeit von 3 min untersucht, da kürzere Expositionszeiten in 24-Well-Platten nur geringe Effekte zeigten (Abb. 9). Eine Untersuchung der Effektivität weiterer Behandlungszeiten, idealerweise in alternativen Gewebemodellen oder an ex-vivo Gewebeproben, erscheint daher sinnvoll.

Ein weiterer möglicher Forschungsansatz wäre, das Netziimplantat vor der Implantation mit NIPP zu behandeln, um zu prüfen, ob dadurch gleiche oder vergleichbare Effekte erzielt werden können. Eine Vorbehandlung des Netziimplantats mit NIPP könnte in der klinischen Anwendung deutlich praktikabler sein als die direkte Behandlung des Operationsbereichs.

Des Weiteren können keine Aussagen zu der Langzeitwirkung einer NIPP-Behandlung getroffen werden. Deshalb sind präklinische Studien in Tiermodellen sowie anschließend eine retrospektive klinische Analyse behandelter Patienten unerlässlich. Erste Erfolge konnten bereits bei einer Tierstudie an europäischen Wildgeln erzielt werden, bei der Schnitt- und Bisswunden mithilfe von Plasma Care® behandelt wurden (Eichler et al. 2025). Auch die erfolgreiche Verwendung von Polypropylen-Netze zur Reparatur von Bauchwandhernien bei Ratten ist in der Literatur dokumentiert (Vaz et al. 2009). Durch die Kombination einer NIPP-Behandlung mit der Implantation von Netzmaterialien in Tiermodellen können wichtige Parameter wie Wundheilungsgeschwindigkeit oder postoperative Komplikationsraten systematisch untersucht werden. Der nächste entscheidende Schritt zur Validierung dieser Therapieform wäre die Durchführung kontrollierter klinischer Studien. Diese Arbeit ist Teil eines durch das Bundeswehrkrankenhaus Berlin (Klinik für Allgemein-, viszeral- und Thoraxchirurgie) geförderten Forschungsprojekts (Abazid et al. 2025). Der Start einer klinischen Studie zur Anwendung von NIPP bei der Netziimplantation ist für das dritte bis vierte Quartal 2025 geplant.

6. Anhang

Zur Quantifizierung der Zellzahl auf den Netzimplantaten wurden verschiedene Messgeräte verwendet (siehe Kapitel 4.9). Die gemessenen Werte aller Replikate sind jeweils für die Kontrollgruppe und die behandelte Gruppe im folgenden Anhang als Zellzahl/ml [$\times 10^5$] dargestellt. Die Auswertung ist in Abbildung 22 ersichtlich.

Auswertungsdaten der Quantifizierung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer

Messgruppe	N 1	N 2	N 3	N 4	N 5	N 6	M	SD
Zellzahl/ml [$\times 10^5$] Kontrolle	3,43	2,65	3,38	3,18	2,33	3,83	2,99	0,66
Zellzahl/ml [$\times 10^5$] behandelt	9,70	9,03	10,85	9,28	9,93	11,33	10,09	1,16

Auswertungsdaten der Quantifizierung der Zellzahl mittels EVE™

Messgruppe	N1	N 2	N 3	N 4	N 5	N 6	M	SD
Zellzahl/ml [$\times 10^5$] Kontrolle	3,96	2,11	1,89	2,00	1,43	1,94	2,22	0,88
Zellzahl/ml [$\times 10^5$] behandelt	14,96	12,76	12,10	10,12	11,66	5,06	11,11	3,36

Auswertungsdaten der Quantifizierung der Zellzahl mittels CASY

Messgruppe	N 1	N 2	N 3	N 4	M	SD
Zellzahl [$\times 10^5$] Kontrolle	3,62	3,69	3,17	4,79	3,82	0,69
Zellzahl [$\times 10^5$] behandelt	3,98	17,50	24,46	5,87	12,96	9,73

Legende

N = Replikat; M = Mittelwert; SD = Standardabweichung

7. Zusammenfassung

Synthetische Netzümplantate sind in der Hernienchirurgie von entscheidender Bedeutung, da sie die Stabilität und Festigkeit der Bauchwand verbessern und das Risiko eines Rezidivs erheblich verringern. Diese Implantate unterstützen die körpereigene Geweberegeneration und bieten eine dauerhafte Lösung zur Reparatur von Hernien.

Die regenerativen Effekte von Nicht-invasivem physikalisches Plasma (NIPP) sind Gegenstand aktueller Studien und konnten bereits in verschiedenen Bereichen der Medizin, wie etwa der Zahnmedizin und Dermatologie, nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurden regenerative Effekte bezüglich der Proliferation von Zellen auf synthetischen Netzümplantaten festgestellt.

Es wurde ein in-vitro 3D-Gewebemodell aus zwei Zellarten erstellt, aus den epithelialen Brustkrebszellen der Zelllinie MCF-7 und Gingivafibroblasten der Zelllinie HGF-1. Der Aufbau des Modells wurde mikroskopisch untersucht und der Stoffwechsel anhand des Glukoseverbrauchs nachgewiesen. In das Gewebemodell wurde ein synthetisches Netzümplantat aus Polypropylen integriert und das Zellwachstum sowohl ohne als auch mit NIPP-Behandlung analysiert. Lichtmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen unter Verwendung der Farbstoffe DAPI und Falloidin-FITC ließen eine tendenziell höhere Zellbesiedlung der Netzümplantate vermuten. Ein entwickeltes Ablöseverfahren ermöglichte jedoch eine präzise Quantifizierung der Zellzahl mittels drei verschiedenen Zellzählgeräten: Neubauer-Zählkammer, EVE™ Cell Counter und CASY Cell Counter & Analyzer.

Durch eine dreiminütige NIPP-Behandlung des in-vitro-Gewebemodells mit Plasma Care konnte eine 300-500% höhere Besiedlung der Netzümplantate im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe festgestellt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern Hinweise auf potenziell regenerative Effekte von NIPP beim Einheilen von Netzümplantaten und ermöglichen die Diskussion zur adjuvanten Anwendung von NIPP zur Verbesserung der Operationsergebnisse bezüglich postoperativer Komplikationen wie etwa Rezidive und Infektionen. Zur weiteren Abklärung sind jedoch zusätzliche in-vitro sowie in-vivo Studien und anschließende klinische retrospektive Studien unerlässlich.

8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Das Plasma Care® (terraplasma Medical2024)	11
Abb. 2.1: Optilene® Mesh Elastic Blue Striped (Braun 2024a)	16
Abb. 2.2: Darstellung des Optilene Netziimplantats in verschiedenen Ebenen	16
Abb. 3: Zweidimensionale Darstellung eines Inserts in einer 24-Well-Platte	27
Abb. 4: Schematische Darstellung der Bildung einer 3-D-Kokultur im Insert	28
Abb. 5: Enzymatische Reaktion der Reagenzien des Glucose Assay Kits (r-biopharm® 2023)	29
Abb. 6: Ausschnitte vom Netziimplantat Optilene Mesh Elastic BLUE STRIPED	31
Abb. 7: Automatisches EVE™ Zellzählsystem (modifiziert nach NanoEntek 2024)	35
Abb. 8: Neubauer improved hell-lining Zählkammer (Brand® 2024)	36
Abb. 9: NIPP-Behandlungskinetik von HGF-1- und MCF-7-Zellen	38
Abb. 10: Mikroskopische Analyse NIPP-Behandelter 2-D Kokultur aus HGF-1- und MCF-7-Zellen	40
Abb. 11.1: Mikroskopische Analyse einer HGF-1-Monokultur mit integriertem Netziimplantat	42
Abb. 11.2: Mikroskopische Analyse einer MCF-7-Monokultur mit integriertem Optilene Netziimplantat	43
Abb. 12: Mikroskopische Analyse NIPP-Behandelter 2-D-Kokulturen mit integriertem Netziimplantat	45
Abb. 13: Mikroskopische Analyse einer 3-D Kokultur aus HGF-1- und MCF-7-Zellen....	47
Abb. 14: Stoffwechsellnachweis der 3-D Kokulturen in den Inserts	48

Abb. 15: Mikroskopische Analyse von NIPP-Behandelten 3-D-Kokulturen mit integrierten Netzimplantaten	51
Abb. 16: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Netzimplantaten unter UV-Licht	53
Abb. 17: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen DAPI-gefärbter Zellen auf Netzimplantaten	55
Abb. 18: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Netzimplantaten unter blaues Licht.....	57
Abb. 19: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen Falloidin-gefärbter Zellen auf Netzimplantaten	58
Abb. 20: Mikroskopische Aufnahme der Zellsuspension auf der Neubauer-Zählkammer	60
Abb. 21: Mikroskopische Aufnahme der Zellsuspension der Netzimplantate mittels EVE™	61
Abb. 22: Quantifizierung der Zellzahl auf den Netzimplantaten	62

9. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Bezugsquellen der Zelllinien	19
Tab. 2: Geräte	19
Tab. 3: Verbrauchsmaterialien	20
Tab. 4: Lösungen und Chemikalien.....	22
Tab. 5: Zellkulturmedien- und Zusätze.....	22
Tab. 6: Messparameter CASY TT	25
Tab. 7: Verwendete Fluoreszenzkanäle des ZOE-Fluoreszenz Cell Imager	32

10. Literaturverzeichnis

- Abazid A, Babak A, Huschitt N, Badendieck S. Anwendung von nicht-invasivem physikalischem Plasma in einem in vitro Gewebemodell aus Fibroblasten und Epithelzellen: Gesteigerte Besiedlung von Netzimplantaten. *Wehrmedizinische Monatsschrift*. 2025; 69:6-12
- Almeida-Ferreira C, Silva-Teixeira R, Gonçalves AC, Marto CM, Sarmiento Ribeiro AB. Cold Atmospheric Plasma Apoptotic and Oxidative Effects on MCF7 and HCC1806 Human Breast Cancer Cells. *Int J Mol Sci*. 2022;23(3):1698
- Akhavantabasi H, Sapmaz A, Tuna S, Erson-Bensan AE. miR-125b Targets ARID3B in Breast Cancer Cells. *Cell Structure and Function* 2012; 37: 27–38
- Amid PK, Shulman AG, Lichtenstein IL, Hakakha M. Biomaterials for abdominal wall hernia surgery and principles of their applications. *Langenbecks Arch Chir* 1994; 379: 168-171
- Arndt S, Unger P, Wacker E, Shimizu T, Heinlin J, Li Y-F, Thomas HM, Morfill GE, Zimmermann JL, Bosserhoff A-K, Karrer S. 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): e79325
- Arndt S, Landthaler M, Zimmermann JL, Unger P, Wacker E, Shimizu T, Li Y-F, Morfill GE, Bosserhoff A-K, Karrer S. Effects of Cold Atmospheric Plasma (CAP) on β -Defensins, Inflammatory Cytokines, and Apoptosis-Related Molecules in Keratinocytes in Vitro and in Vivo. *PloS One* 2015; 10 (3): e0120041
- Badr G, El-Hossary FM, Salah M, Khalaf M, Sayed EA, Elminshawy A. THE THERAPEUTIC POTENTIAL OF COLD ATMOSPHERIC PLASMA AGAINST PATHOGENIC BACTERIA INHABITING DIABETIC WOUNDS. *Bulletin of Pharmaceutical Sciences Assiut University* 2023;46(2):1285-1300.
- Braun B. HERNIENCHIRURGIE MIT SYSTEM.2024a. [Zugriffsdatum: 30.06.2024]. Pdf Download verfügbar unter: URL: <https://www.bbraun.de/de/products/b/optilene-mesh.html>.
- Braun B. Prospekt Hernienchirurgie gesamt.2024b. [Zugriffsdatum: 30.06.2024]. Pdf Download verfügbar unter: URL: <https://www.bbraun.de/de/products/b/optilene-mesh.html>
- Bekeschus S, Schmidt A, Kramer A, Metelmann H-R, Adler F, et. al. High throughput image cytometry micronucleus assay to investigate the presence or absence of mutagenic effects of cold physical plasma. *Environ Mol Mutagen* 2018 ;59(4):268-277
- Bensch C. Untersuchung des Glukosestoffwechsels beim Mammakarzinom anhand der Glykolysemarker Tumor-M2-Pyruvatkinase und phosphoryliertes Akt. Aus der medizinischen Fakultät der Universität Würzburg (2011)

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

BIO-RAD. Fluorophores Compatible with the ZOE Fluorescent Cell Imaging System. 2024. [Zugriffsdatum: 14.07.2024]. Online verfügbar über: URL: <https://www.biorad.com/de-de/product/zoe-fluorescent-cell-imager?ID=N74CIZE8Z>.

Bittner R, Schwarz J. Inguinal hernia repair: current surgical techniques. *Langenbecks Arch Surg* 2012;397(2): 271-282

Bourke P, Ziuzina D, Han L, Cullen PJ, Gilmore BF. Microbiological interactions with cold plasma. *J Appl Microbiol*. 2017;123(2):308-324

Bozkurt S.B, Hakki SS, Hakki EE, Durak Y, Kantarci A. Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharide Induces a Pro-inflammatory Human Gingival Fibroblast Phenotype. *Inflammation* 2017; 40: 144–153

Brand®. Life Science Katalog Produkte, Anwendungstipps und Praxiswissen für Life Science Anwendungen. Abschnitt 1.1 Zählkammern. 2024:10-16. [Zugriffsdatum: 14.07.2024]. Online verfügbar über: URL: https://shop.brand.de/media/import/1/27/32406/42485/45431/53027/Life_Science_Katalog_DE.pdf

Brewer DB. The fibroblast. *Proc. R. Soc. Med* 1967; 60:778–782.

Burger JWA, Luijendijk RW, Hop WCJ, Halm JA, Verdaasdonk EGG, Jeekel J. Long-term follow-up of a randomized controlled trial of suture versus mesh repair of incisional hernia. *Ann Surg* 2004; 240: 578-585

Campanelli G, Nicolosi FM, Pettinari D, Avesani EC. Intestinal resection and multiple abdominal hernia mesh repair: is the combination safe and feasible? *Chir Ital*. 2004;56(6):839-842

Canullo L, Genova T, Tallarico M, Gautier G, Mussano F, Botticelli D. Plasma of argon affects the earliest biological response of different implant surfaces: An in vitro comparative study. *J. Dent. Res*. 2016;95:566–573

Conrads H, Schmidt M. Plasma generation and plasma sources. *Plasma Sources Science and Technology* 2000;9(4):441

Conze J, Klinge U, Schumpelick V. [Incisional hernia]. *Chirurg* 2005;76(9): p. 897-909; quiz 910

Debodinance, P., Delporte, P., Engrand, J.-B., Boulogne, M.: Évolution des matériaux prothétiques vers une meilleure tolérance : application en chirurgie gynécologique. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2002; 31: 527-540

Debodinance P, Cosson M, Collinet P, Boukerrou M, Lucot J-P, Madi N.: Les prothèses synthétiques dans la cure de prolapsus génitaux par la voie vaginale : bilan en 2005. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2006; 35: 429-454

Deder W. Vergleich der Ergebnisse total extraperitonealer endoskopischer RepARATION (TEP) der Leistenhernie bei Verwendung verschiedener titanbeschichteter Netze. Aus der Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität zu Tübingen (2015)

Dejonckheere CS, Layer JP, Nour Y, Giordano FA, Stope MB, Schmeel LC, et al. Non-invasive physical plasma for preventing radiation dermatitis in breast cancer: Results from an inpatient-randomised double-blind placebo-controlled trial. *Clin Transl Radiat Oncol* 2023; 4(44):100699

Deysine M. Pathophysiology, prevention and management of prosthesis infections in hernia surgery. *Surg Clin N Am* 1998;78(6): 1105-1115

Dietz UA, Hamelmann W, Winkler MS, Debus ES, Malafaia O, Czecko NG, Thiede A, Kuhfuss I. An alternative classification of incisional hernias enlisting morphology, body type and risk factors in the assessment of prognosis and tailoring of surgical technique. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2007; 60(4): p. 383-388

Dubuc A, Monsarrat P, Virard F, Merbahi N, Sarrette JP, Laurencin-Dalieux S, et al. Use of cold-atmospheric plasma in oncology: a concise systematic review. *Ther Adv Med Oncol* 2018; 10:1758835918786475

Eggers B, Marciniak J, Memmert S, et al. The beneficial effect of cold atmospheric plasma on parameters of molecules and cell function involved in wound healing in human osteoblast-like cells in vitro. *Odontology* 2020;108(4): 607-616

Eggers B, Stope MB, Marciniak J, et al. Non-Invasive Physical Plasma Generated by a Medical Argon Plasma Device Induces the Expression of Regenerative Factors in Human Gingival Keratinocytes, Fibroblasts, and Tissue Biopsies. *Biomedicines* 2022;10: 889

Eichler J, Rulik B, Abazid A, Stope MB. Nicht-invasives physikalisches Plasma verbessert die konventionelle Wundversorgung von Schnitt- und Bisswunden bei wildlebenden europäischen Igel. *Sci Rep*. 2025;22;15:2744

Engelsman AF, van der Mei HC, Busscher HJ, Ploeg RJ. Morphological aspects of surgical meshes as a risk factor for bacterial colonization. *Br J Surg*. 2008;95(8):1051-1059

EU Hernia Trialists Collaboration. Overview of randomized trials of inguinal hernia repair—a European Union Concerted Action. *Surg Endosc* 13 1999; 1030–1031

Evert K, Kocher T, Schindler A, et al. Repeated exposure of the oral mucosa over 12 months with cold plasma is not carcinogenic in mice. *Sci Rep* 2021; 11: 20672

Fleischhacker AP. Der Einfluss von Wertigkeit, Morphologie, Größe, Risikofaktoren und Operationstechnik auf das Ergebnis der operativen Versorgung von Ventral- und Inzisionalhernien: Prospektive Validierung der Würzburger Narbenhernien-Klassifikation an 324 Patienten. Aus der medizinischen Fakultät der Universität Würzburg (2012)

Foschi D, Corsi F, Cellerino P, Trabucchi A, Trabucchi E. Late mesh rejection after laparoscopic hernia repair. *Surg Endosc* 1998; 12: 455-457

Friedrich M, Müller-Riemenschneider F, Roll S, Kulp W, Vauth C, Greiner W, Willich S, von der Schulenburg J-M. Health Technology Assessment of laparoscopic compared to conventional surgery with and without mesh for incisional hernia repair regarding safety, efficacy and cost-effectiveness. *GMS Health Technol Assess* 2008; 4: Doc01

García-Ureña MÁ, López-Monclús J, Hernando LA, Montes DM, Valle de Lersundi AR, Pavón CC, Ceinos CJ, Quindós PL. Randomized controlled trial of the use of a large-pore polypropylene mesh to prevent incisional hernia in colorectal surgery. *Ann Surg* 2015;261(5):876-881

Gay-Mimbrera J, Garcia MC, Isla-Tejera B, Rodero-Serrano A, Garcia-Nieto AV, Ruano J. Clinical and Biological Principles of Cold Atmospheric Plasma Application in Skin Cancer. *Adv Ther* 2016; 33(6):893–908

Gerling T, Weltmann K-D. Einführung in Atmosphärendruck-Plasmaquellen für Plasmamedizinische Anwendungen. In: Metelmann H-R, Weltmann K-D, Von Woedtke T, editors. *Plasmamedizin*. Heidelberg: Springer 2016:3-14

Gray MR, Curtis JM, Elkington JS. Colovesical fistula after laparoscopic inguinal hernia repair. *Br J Surg* 1994; 81(8):1213-1214

Guo L, Zou Z, Smeets R, Kluwe L, Hartjen P, Gosau M, Henningsen A. Attachment and Osteogenic Potential of Dental Pulp Stem Cells on Non-Thermal Plasma and UV Light Treated Titanium, Zirconia and Modified PEEK Surfaces. *Materials* (Basel). 2022;15(6):2225

Hämmerle G, Stefanie Ascher S, Lisa Gebhardt L. Positive effects of cold atmospheric plasma on pH in wounds: a pilot study. *J Wound Care* 2023;32(9):530536

Heinlin J, Isbary G, Stolz W et al. Plasma applications in medicine with a special focus on dermatology. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2011;25(1):1–11

Heinlin J, Zimmermann JL, Zeman F, Bunk W, Isbary G, Landthaler M, et al. Randomized placebo-controlled human pilot study of cold atmospheric argon plasma on skin graft donor sites. *Wound Repair Regen* 2013;1(6):800–807

Helmke A. Niedertemperaturplasma: Eigenschaften, Wirkungen und Gerätetechnik. In *Plasmamedizin*. Springer Berlin Heidelberg 2016: 33–45

Henningsen A, Smeets R, Heuberger R, Jung OT, Hanken H, et al. Veränderungen der Oberflächeneigenschaften von Titan und Zirkonia nach Oberflächenbehandlung mit ultraviolettem Licht oder nicht-thermale Plasma. *Eur. J. Oral Sci.* 2018; 126 :126–134

Hofbauer C, Anderson PV, Juul P, Quist N. Late mesh rejection as a complication to transabdominal preperitoneal laparoscopic hernia repair. *Surg Endosc* 1998; 12: 1164-1165

Horeysek G. [Abdominal wall hernias (inguinal hernia, incisional hernia)]. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd* 1997; 114: p. 86-90

Horeyseck G. [Abdominal wall hernias (inguinal hernia, incisional hernia)]. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd* 1997; 114: p. 86-90

Hou Y, Zhou M, Xie J, Chao P, Feng Q, Wu J. High glucose levels promote the proliferation of breast cancer cells through GTPases. *reast Cancer (Dove Med Press)* 2017; 9:429-436

Isbary G, Morfill G, Schmidt HU, Georgi M., Ramrath K, Heinlin J, Karrer S, Landthaler M, Shimizu T, Steffes B, et al. A First Prospective Randomized Controlled Trial to Decrease Bacterial Load Using Cold Atmospheric Argon Plasma on Chronic Wounds in Patients. *Br. J. Dermatol* 2010; 163 (1): 78–82

Isbary G, Stolz W. Low-temperature argon plasma to decrease bacterial load on chronic wound: Department of Dermatology, Allergology and Environmental Medicine. *NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology* 2012; 13:163-178

Isbary G, Köritzer J, Mitra A, Li Y-F, Shimizu T, Schroeder J, Schlegel J, Morfill, GE, Stolz W, Zimmermann JL. Ex Vivo Human Skin Experiments for the Evaluation of Safety of New Cold Atmospheric Plasma Devices. *Clin. Plasma Med* 2013;1 (1):36–44

Kadhem HA, Ibraheem SA, Jabir MS, Kadhim AA, Taqi ZJ, Florin MD. Zinc Oxide Nanoparticles Induces Apoptosis in Human Breast Cancer Cells via Caspase-8 and P53 Pathway. *Nano Biomedicine and Engineering* 2019;11(1):35-43

Kayaoglu, HA, Ozkan N, Hazinedaroglu SM, Ersoy OF, Erkek AB, Koseoglu RD. Comparsion of adhesive properties of five different prosthetic materials used in hernioplasty. *J Invest Surg* 2005; 18: 89-95

Klämpfl TG, Isbary G, Shimizu T, Li, Y-F, Zimmermann JL, Stolz W, Schlegel J, Morfill GE, Schmidt H-U. Cold Atmospheric Air Plasma Sterilization against Spores and Other Microorganisms of Clinical Interest. *Appl Environ Microbiol* 2012; 78(15): 5077–5082

Kleineidam B, Nokhbehsaim M, Deschner J, et al. Effect of cold plasma on periodontal wound healing-an in vitro study. *Clin Oral Investig* 2019; 23: 1941–1950

Klosterhalfen B, Klinge U, Henze U, Phardwaj R, Conze J, Schumpelick V. Morphologische Korrelation der funktionellen Bauchwandmechanik nach Mesh-Implantation. *Langenbecks Arch Chir* 1997; 382: 87-94

Klosterhalfen B, Klinge U, Schumpelick V. Functional and morphological evaluation of different polypropylene-mesh modifications for abdominal wall repair. *Biomaterials* 1998; 19: 2235-2246

Klosterhalfen B, Klinge U, Hermanns B, Schumpelick V. Pathology of traditional surgical nets for hernia repair after long-term implantation in humans. *Chirurg* 2000; 71: 43-51

Klinge U, Prescher A, Klosterhalfen B, Schumpelick V. Entstehung und Pathophysiologie der Bauchwanddefekte. *Chirurg* 1997; 68: 293-303

Kluge S, Bekeschus S, Bender C, Benkhail H, Sckell A, Below H, Stope MB, Kramer A. Investigating the mutagenicity of a cold argon-plasma jet in an HET-MN model. *PLoS One* 2016;11(9): e0160667

Köckerling F, Jacob D, Grund S, et al. Prinzipien der minimalinvasiven Chirurgie bei Hernien. *Allgemein- und Viszeralchirurgie*. up2date 2012; 6: 83–93.

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

Komuro T. Re-evaluation of fibroblasts and fibroblast-like cells. *Anat. Embryol* 1990; 182: 103–112

Kopp S, Slumstrup L, Corydon TJ, Sahana J, Aleshcheva G et. al. Identifications of novel mechanisms in breast cancer cells involving duct-like multicellular spheroid formation after exposure to the Random Positioning Machine. *Sci. Rep.* 2016;6: 26887

Korenkov M, Paul A, Sauerland S, Neugebauer EAM, et. al. Classification and surgical treatment of incisional hernia. *Langenbeck's Archives of Surgery* 2021; 386(1):65-73

Laka K, Makgool L, Mbita Z. Survivin Splice Variants in Arsenic Trioxide (As₂O₃)-Induced Deactivation of PI3K and MAPK Cell Signalling Pathways in MCF-7 Cells. *Genes* 2019; 10:41

Langer C, Schaper A, Liersch T, Kulle B, Flosman M, Füzesi L, Becker H. Prognosis factors in incisional hernia surgery: 25 years of experience. *Hernia* 2005; 9(1): p. 16-21

Langer C, Becker H, Liersch T. Bauchwandhernien. *Allgemeine und Viszeralchirurgie* up2date, 2007;3:217–236

Lawson EH, Zingmond DS, Hall BL, et al. Comparison between clinical registry and medicare claims data on the classification on hospital quality of surgical care. *Annals of Surgery* 2015; 261:290–296

Leber GE, Garb GL, Alexander AI, Reed WP. Long-term complications associated with prosthetic repair of incisional hernias. *Arch Surg* 1998; 133: 378-382

Leduc M, Guay D, Leask RL, Coulombe S. Cell Permeabilization Using a Non-Thermal Plasma. *New J. Phys.* 2009;11 (11): 115021

Lee H, Shon C, Kim Y, Kim S, Kim G und Kong MG. Degradation of adhesion molecules of G361 melanoma cells by a non-thermal atmospheric pressure microplasma. *New Journal of Physics* 2009; 11:1-13

Lee J-H, Jeong W-S, Seo S-J, Kim, H-W, Kim K-N, Choi, EH, Kim K-M. Non-thermal atmospheric pressure plasma functionalized dental implant for enhancement of bacterial resistance and osseointegration. *Dent. Mater.* 2017;33:257–270

Maisch T, Shimizu T, Li Y-F, Heinlin J, Karrer S, Morfill G, Zimmermann JL. Decolonisation of MRSA, S. Aureus and E. Coliby Cold-Atmospheric Plasma Using a Porcine Skin Model in Vitro. PLoS One 2012a;7(4): e34610

Maisch T, Shimizu T, Isbary G, Heinlin J, Karrer S, Klämpfl TG, Li, Y-F, Morfill G, Zimmermann JL. Contact-Free Inactivation of Candida Albicans Biofilms by Cold Atmospheric Air Plasma. Appl. Environ. Appl Environ Microbiol. 2012b; 78(12): 4242–4247

Modic M, Kovač J, Nicholls JR, Kos Š, Serša G, Cvelbar U, Walsh J. Targeted plasma functionalization of titanium inhibits polymicrobial biofilm recolonization and stimulates cell function. Appl. Surf. Sci 2019, 487, 1176–1188

Muysoms F, Campanelli G, Champault GG, DeBeaux AC, Dietz UA, et. al. EuraHS: the development of an international online platform for registration and outcome measurement of ventral abdominal wall hernia repair. Hernia 2012;16(3): 239-250

NanoEntek. EVE™ automated Cell Counter.2024. [Zugriffsdatum: 14.07.2024]. Online verfügbar über: URL: https://www.nanoentek.com/theme/nanont2_en/shop/02/product01_view.php?it_id=1547538993.

Nietsch A. Einfluss von kaltem atmosphärischem Plasma auf Nierenzellkarzinomzellen. Aus der Fakultät der Universität Greifswald (2020)

Nitsch A, Strakeljahn S, Jacoby JM, et al. New Approach against Chondrosoma Cells- Cold Plasma Treatment Inhibits Cell Motility and Metabolism, and Leads to Apoptosis. Biomedicines 2022; 10: 688

Ott G, Vollmer J, Hieronymi G. Krebsgefährdung nach Implantation von Kunststoffen. Langenbecks Arch Klin Chir 1963; 302: 608-611

Oppenheimer BS, Oppenheimer ET, Stout AP, Willhite M, Danishefsky I. The latent period in carcinogenesis by plastics in rats and its relation to the presarcomatous stage. Cancer. 1958;11(1):204-213

Park JH, Olivares-Navarrete R, Baier RE, Meyer AE, Tannenbaum R, Boyan BD, Schwartz Z. Effect of cleaning and sterilization on titanium implant surface properties and cellular response. Acta Biomater 2012;8(5):1966-1975

Paul A, Lefering R, Köhler L, Eypasch. [Current practice of incisional hernia reconstruction in Germany]. Zentralbl Chir 1997;122(10): p. 859-861

Pekbağrıyanık T, Dadas FK, Enhoş Ş. Effects of non-thermal atmospheric pressure plasma on palatal wound healing of free gingival grafts: a randomized controlled clinical trial. Clin Oral Investig 2021; 25: 6269–6278

r-biopharm®. Enzytec™ Liquid D-Glucose Anleitung Version 2. 2023. [Zugriffsdatum: 14.07.2024]. Pdf download verfügbar über: URL: https://food.r-biopharm.com/wp-content/uploads/E-Liquid_IFU_E8140_D-Glucose_DE_2023-06_V02.pdf.

Ritz J-P und Buhr HJ. Hernienchirurgie: Klinische Strategien und perioperatives Management. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2006

Ritzert B. Zahnimplantate zunehmend erste Wahl: 1,3 Millionen werden in Deutschland pro Jahr eingepflanzt. Pressemitteilung in der DGI 2018. [Zugriffsdatum: 30.06.2024]. Online verfügbar über: URL: <https://idw-online.de/de/news707107>.

Rockenstiehl M. Hernienchirurgie mit konventioneller Naht und Polypropylen-Netzimplantaten Eine in situ-Analyse von Indikatoren fremdkörperinduzierter Malignisierung und der Dynamik entzündlich/bindegewebiger Organisation. Aus der der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen (2010).

Rosch R, Junge K., Quester R, Klinge U, Klosterhalfen B, Schumpelick V. Vypro II® mesh in hernia repair: impact of polyglactin on long term incorporation in rats. Eur Surg Res 2003; 35: 445-450.

Rosen M, Krpata DM, Petro CC, Carbonell A, Warren J, et. al. Biologic vs Synthetic Mesh for Single-stage Repair of Contaminated Ventral Hernias: A Randomized Clinical Trial. JAMA Surg apr 2022;157(4):293-301

Scheper et al. Cold plasma therapy with the handheld device plasma care® improves the tendency to heal in problem wounds - 10 case studies from diabetological practice. Diabetes Stoffw Herz 2021; 30: 221 – 228

Schmidt A, von Woedtke T, Stenzel J, Lindner T, Polei S, Vollmar B, et al. One year follow-up risk assessment in SKH-1 mice and wounds treated with an argon plasma jet. Int J Mol Sci 2017;18(4):868

Schumpelick V, Conze J, Klinge U. [Preperitoneal mesh-plasty in incisional hernia repair. A comparative retrospective study of 272 operated incisional hernias]. Chirurg 1996;67(10): 1028-1035

Schumpelick V, Klinge U. Zum kanzerogenen Potential von Biomaterialien in der Hernienchirurgie (Kommentar auf Anforderung der Schriftleitung). Chirurg 2002; 73:838.

Schumpelick V, Klinge U, Welty G, Klosterhafen B. Meshes in der Bauchwand. Chirurg 1999; 70: 876-887. 117 (51) Schuster M, Seebauer C, Rutkowski R, Hauschild A, Podmelle F, Metelmann C, et al. Visible tumor surface response to physical plasma and apoptotic cell kill in head and neck cancer. J Craniomaxillofac Surg 2016;44(9):1445-1452

Schuster M, Seebauer C, Rutkowski R, Hauschild A, Podmelle F, Metelmann C, et al. Visible tumor surface response to physical plasma and apoptotic cell kill in head and neck cancer. J Craniomaxillofac Surg 2016;44(9):1445-1452

Siebel A. Interaktionen zwischen den Signaltransduktionswegen der Östrogenrezeptoren und der Tyrosinkinaserzeptoren am Beispiel der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 als Ziel neuer Behandlungsstrategien. Aus der Universität zu Lübeck (2008)

Silich RC und McSherr CK. Spermatic granuloma: An uncommon complication of the tension-free hernia repair. *Surg Endosc* 1996; 10: 537-539

Soler M, Verhaeghe P, Essomba A, Sevestre H, Stoppa R. Treatment of postoperative incisional hernias by a composite prosthesis (polyester-polyglactin 910). Clinical and experimental study. *Ann-Chir* 1993; 47: 598-608

Soule H, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* 1973; 51(5): 1409–1416

Stope MB, Benouahi R, Sander C, et al. Protherapeutic Effects and Inactivation of Mammary Carcinoma Cells by a Medical Argon Plasma Device. *Anticancer Res* 2020;40: 6205–6212

Stope MB. Plasma oncology - Physical plasma as innovative tumor therapy. *Journal of Cancer Biology* 2020; 1: 53–56

Stoppa RE, Rives JL, Warlaumont CR, Palot JP, Verhaeghe PJ, Delattres JF. The use of Dacron in the repair of hernias of the groin. *Surg Clin North Am* 1984; 64(2):269-285

Stoppa RE. The treatment of complicated groin and incisional hernias. *orld J Surg* 1989;13(5):545-54

terraplasma Medical.2024. [Zugriffsdatum: 25.05.2024]. verfügbar über: URL: <https://www.terraplasma-medical.com>.

Theinkom F, Singer L, Cieplik F, Cantzler S, Weilemann H, Cantzler M, et. al. Antibacterial efficacy of cold atmospheric plasma against *Enterococcus faecalis* planktonic cultures and biofilms in vitro. *PLoS One*. 2019; 14(11): e0223925

Tiroch J, Dunkel A, Sterneder S, Zehentner S, Behrens M, et. al. Human Gingival Fibroblasts as a Novel Cell Model Describing the Association between Bitter Taste Thresholds and Interleukin-6 Release. *J Agric Food Chem* 2023;71(13): 5314-5325

Usher FC, Hill JR, Ochsner JL. Hernia repair with Marlex mesh. A comparison of techniques. *Surgery* 1959; 46: 718-724

Vaday GG, Lider O. Extracellular matrix moieties, cytokines, and enzymes: dynamic effects on immune cell behavior and inflammation. *J. Leukocyte Biol* 2000; 67: 149–159

Vantangoli MM, Madnick SJ, Huse SM, Weston P, Boekelheide K. MCF-7 Human Breast Cancer Cells Form Differentiated Microtissues in Scaffold-Free Hydrogels. *PLoS One* 2015; 10(8): e0135426

Van Veen RN, Wijsmuller AR, Vrijland,WW, Hop WC, Lange JF, Jeekel J. Long-term follow-up of a randomized clinical trial of non-mesh versus mesh repair of primary inguinal hernia. *Br J Surg* 2007; 94: 506-510

Van Welzen A, Hoch M, Wahl P, Weber F, et. al. The Response and Tolerability of a Novel Cold Atmospheric Plasma Wound Dressing for the Healing of Split Skin Graft

Donor Sites: A Controlled Pilot Study. *Skin Pharmacology and Physiology* 2021; 34(6):1-9

Vaz M, Krebs RK, Trindade EN, Trindade MRM. Fibroplasie nach Implantation eines Polypropylennetzes zur Reparatur von Bauchwandhernien bei Ratten. *Acta Cir BHs*. 2009; 24(1):19-25

Vogels RM, Lambertz A, Schuster P, et al. Biocompatibility and biomechanical analysis of elastic TPU threads as new suture. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* Jan 2017; 105(1):99-106

Von Lenzen-Schulte M. Hernienchirurgie: Nicht ohne Netz, Register und Studien. *Dtsch Arztebl* 2016; 113(19): A-926 / B-785 / C-769

Von Soleimanian A. Hernienchirurgie: Die Qualität hängt am Chirurgen, nicht an der Technik. *Dtsch Arztebl* 2008; 105(40): A-2080

Von Woedtke T, Kramer A, Weltmann K-D. Plasma Sterilization: What are the Conditions to Meet this Claim? *Plasma Processes and Polymers* 2008; 5:534-539

Von Woedtke T, Schmidt A, Bekeschus S, Wende K. Wissenschaftliche Grundlagen, Stand und Perspektiven der Plasmamedizin. In *Plasmamedizin* 2016:17-32

Weltmann K-D, Kindel E, von Woedtke T, Hähnel M, Stieber M, Brandenburg R. Atmospheric-pressure plasma sources: Prospective tools for plasma medicine. *Pure and Applied Chemistry*. 2010;82(6):1223-1227

Weltmann K-D, Polak M, Masur K, von Woedtke T, Winter J, Reuter S. Plasma processes and plasma sources in medicine. *Contributions to Plasma Physics* 2012a;52(7):644-654

Weltmann K-D, Fricke K, Stieber M, Brandenburg R, von Woedtke T, Schnabel U. New nonthermal atmospheric-pressure plasma sources for decontamination of human extremities. *IEEE Transactions on Plasma Science* 2012b;40(11):2963-2969

Xia J, Zeng W, Xia Y, Wang B, Xu D, Liu D, Kong MG, Dong Y. Cold atmospheric plasma induces apoptosis of melanoma cells via Sestrin2-mediated nitric oxide synthase signaling. *Journal of biophotonics* 2019;12: 1-14

Yan D, Sherman JH, Keidar M. Oncotarget | Cold atmospheric plasma, a novel promising anti-cancer treatment modality. *Oncotarget* 2017; 8(9):15977–15995

Yan D, Xu W, Yao X, Lin L, Sherman JH, Keidar M. The Cell Activation Phenomena in the Cold Atmospheric Plasma Cancer Treatment. *Scientific Reports* 2018; 8: 1-10

Yonson, S, Coulombe S, Léveillé V, Leask RL. Cell Treatment and Surface Functionalization Using a Miniature Atmospheric Pressure Glow Discharge Plasma Torch. *J. Phys. Appl. Phys.* 2006; 39 (16):3508–3513

Zheng Z, Ao X, Xie P, et al. Effects of novel non-thermal atmospheric plasma treatment of titanium on physical and biological improvements and in vivo osseointegration in rats. *Sci Rep* 2020; 10: 10637

Zieren J. Hernienreparationen mit Netzprothesen klinische und experimentelle Untersuchungen. Aus Open-Access-Publikationsserver der Humboldt-Universität (2001)

Ziuzina D, Patil S, Cullen PJ, Keener KM und Bourke P. Atmospheric cold plasma inactivation of *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Listeria monocytogenes* inoculated on fresh produce *Food Microbiology* 2014;42:109-116

11. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Klinik für Gynäkologie und Gynäkologische Onkologie unter Betreuung von PD Dr. Dr. Matthias Stope durchgeführt. Die Konzeption der Studie wurde in Zusammenarbeit mit meinem Doktorvater PD. Dr. Dr. Matthias Stope erstellt.

Nach ausführlicher Schulung vom Laborpersonal wurden sämtliche Versuche/Analysen von mir eigenständig durchgeführt.

Das zur Auswertung verwendete Datenmaterial wurde eigenständig generiert und mit Hilfe von Microsoft Excel statistische ausgewertet.

Bei der Erstellung dieser Arbeit verwendete ich ChatGPT, um die Lesbarkeit und Sprache des Manuskripts zu verbessern. Nach der Verwendung dieses Tools habe ich die entsprechenden Passagen überprüft und bearbeitet und übernehme die volle Verantwortung für den Inhalt der veröffentlichten Dissertationsschrift.

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

12. Veröffentlichungen

Die Inhalte der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Abazid A, Babak A, Huschitt N, Badendieck S. Anwendung von nicht-invasivem physikalischem Plasma in einem in vitro Gewebemodell aus Fibroblasten und Epithelzellen: Gesteigerte Besiedlung von Netzimplantaten. Wehrmedizinische Monatsschrift. 2025; 69:6-12

<https://doi.org/10.48701/opus4-388>

13. Danksagung

Die vorliegende Dissertation wäre ohne die Unterstützung und Hilfe vieler Menschen nicht zustande gekommen. An dieser Stelle möchte ich all den besonderen Personen danken, die mich auf meinem Weg begleitet haben.

Zunächst möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater, Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Dr. rer. med. habil. Matthias Bernhard Stope, für die Möglichkeit, diese Arbeit durchzuführen, und für die exzellente Betreuung bedanken. Sie hatten stets eine Lösung für jedes Problem und motivierten mich, das Ziel nicht aus den Augen zu verlieren. Sie waren jederzeit erreichbar, selbst wenn ich einmal an einem Sonntagabend eine Frage hatte. Die Zusammenarbeit mit Ihnen war stets auf Augenhöhe, und es hat mich gefreut, Teil Ihrer Forschung sein zu dürfen. Vielen Dank für alles!

Mein Dank gilt auch dem gesamten Forschungsteam der Klinik für Gynäkologie und Gynäkologische Onkologie des Universitätsklinikums Bonn, insbesondere Caro und Rachana, die mich im Labor stets unterstützt haben. Außerdem danke ich dem Forschungsteam des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Universität Bonn, das mir das Labor zu Forschungszwecken zur Verfügung gestellt und mich hervorragend betreut und unterstützt hat.

Danken möchte ich auch meinem Freund und ehemaligen Kojenpartner Dr. Hesham Al-Haddad, der mir den ersten Kontakt zu Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Dr. rer. med. habil. Matthias Stope ermöglicht hat.

Des Weiteren möchte ich mich bei meiner wundervollen Familie bedanken. Danke, Mama, dass du immer an mich geglaubt hast. Danke, Papa, du standest stets an meiner Seite und hast mich immer finanziell unterstützt, damit ich mir meine Träume verwirklichen konnte. Ein großes Dankeschön auch an meinen Bruder Arman, der mich stets motiviert hat. Ich liebe euch alle!

Danke auch an Babak und Pourja für eure Unterstützung am Computer – ohne euch wäre ich aufgeschmissen gewesen.

Zu guter Letzt möchte ich allen Freunden und Kommilitonen danken, die mich in guten wie in schlechten Zeiten motiviert und seelisch unterstützt haben. Ihr habt alle an mich geglaubt! Danke dafür!