Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Kaltes atmosphärisches Plasma und seine Wirkung auf humanes Knochengewebe sowie humane Osteoblasten in vitro

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von Felix Otto

2025

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Christoph V. Suschek Zweitgutachter: PD Dr. rer. nat. Csaba Mahotka

Meiner Frau und unseren Kindern

1 Zusammenfassung

Eine Wundinfektion nach knöcherner Verletzung sowie Erregerbesiedlung des Osteosynthesematerials nach operativer Versorgung sind häufige Komplikationen. Studien konnten zeigen, dass kaltes atmosphärisches Plasma (CAP) in der Lage ist, selbst multiresistente Erreger abzutöten, es könnte somit die Rate dieser Komplikationen senken. Daher wurden in dieser Arbeit die Effekte von CAP auf humane Osteoblasten und humanes Knochengewebe untersucht, um geeignete Behandlungsparameter zu finden und negative Effekte auf die Knochenheilung zu minimieren. Das verwendete CAP wurde durch ein Dielectric-Barrier-Discharge-Gerät (DBD) unter starken, wechselnden (300/600 Hz) elektrischen Feldern (13,5 kV) aus der Umgebungsluft generiert und für die Behandlung von Zellen, Behandlungsmedien und Knochengewebe genutzt. Osteoblasten und Knochenbiopsien wurden für die CAP-Behandlung aus Hüftköpfen - aus Hüftgelenksersatzoperationen - isoliert und gewonnen. Mit Hilfe von Viabilitäts- (Resazurin) und Differenzierungs-Assays (Alizarinrot) konnte ein mitunter stark hemmender Effekt auf die Viabilität und die Ausbildung einer Knochenmatrix aufgezeigt werden, dessen Ausprägung von der Behandlungsdauer und Inkubationszeit der Zellen mit Frequenz, dem Behandlungsmedium (PBS) nach Behandlung abhängig war. Während die Kontrolle nach 21 Tagen eine Verdopplung der Viabilität zeigte, führte z.B. eine 5-min CAP-Behandlung bei 300 Hz mit 20-min Belassen des behandelten Mediums auf den Zellen zu einer Stagnation der Viabilität auf Ausgangsniveau an Tag 0. Auch bei 600 Hz und kürzeren Behandlungszeiten (1, 3 min) zeigte dieses Vorgehen nach 21 Tagen signifikant niedrigere Unterschiede zur Kontrolle. Die Knochenbildung zeigte sich ebenfalls gehemmt und fiel z.B. bei 300 Hz um 2729 % zur Kontrolle ab. Eine CAP-Behandlung von Knochenbiopsien mit anschließendem direkten Mediumwechsel zeigte hingegen, dass diese bei 600 Hz und einer Behandlungszeit von 150 s an Tag 7, 23 und 31 eine leichte Erhöhung der Viabilität verursachte. Sie lag um 62, 65 und 84 % höher als die Kontrolle. Die Ergebnisse weisen insgesamt darauf hin, dass CAP, insbesondere bei langen Behandlungszeiten, sowohl das Zellwachstum als auch die Knochenmatrix Ausbildung einer hemmen kann. Dennoch konnten im Knochengewebe bei höherer Frequenz und kürzerer Behandlungszeit auch positive Effekte erzielt und das Zellwachstum stimuliert werden. Zukünftige Studien sollten hier ansetzen, um die Knochenheilung sowie die antimikrobielle Effektivität dieser CAP-Parameter zu untersuchen und möglicherweise für die Klinik nutzbar zu machen.

Abstract

Wound infection after bone injury and pathogen colonization of osteosynthesis material after surgical treatment are common complications. Studies have shown that cold atmospheric plasma (CAP) is able to kill even multidrug-resistant pathogens and could so reduce the rate of these complications. Therefore, in this work the effects of CAP on human osteoblasts and human bone tissue were investigated to find suitable treatment parameters and to minimize negative effects on bone healing. The CAP utilized was generated by a Dielectric Barrier Discharge device (DBD) under strong, alternating (300/600 Hz) electric fields (13.5 kV) from ambient air and used for the treatment of cells, treatment media and bone tissue. Osteoblasts and bone biopsies were isolated and obtained from femoral heads from hip replacement surgery for CAP treatment. Using viability (resazurin) and differentiation assays (alizarin red), a strongly inhibitory effect on the viability and formation of a bone matrix was sometimes demonstrated, the markedness of which was dependent on the frequency, treatment duration and incubation time of the cells with the treatment medium (PBS) after treatment. While the control showed a doubling of viability after 21 days, a 5 min CAP treatment at 300 Hz with the treated medium left on the cells for 20 min, for example, led to a stagnation of viability at the initial level on day 0. Even at 600 Hz and shorter treatment times (1, 3 min), this procedure showed significantly lower differences to the control after 21 days. Bone formation was also inhibited and fell by 2729 % compared to the control at 300 Hz, for example. In contrast, CAP treatment of bone biopsies with subsequent direct medium change showed that this caused a slight increase in viability at 600 Hz and a treatment time of 150 s on days 7, 23 and 31. It was 62, 65 and 84 % higher than the control. Overall, the results indicate that CAP can inhibit cell growth and the formation of a bone matrix, especially with long treatment times. Nevertheless, positive effects were also achieved in bone tissue at higher frequencies and shorter treatment times and cell growth was stimulated. Future studies should start up here in order to investigate bone healing and the antimicrobial effectiveness of these CAP parameters and possibly make them usable for clinical applications.

Abkürzungsverzeichnis

μl	Mikroliter
μΜ	Mikromolar
а	Jahre
α	Signifikanzniveau
Aq. Dest.	Aqua destillata
AK	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
AR	Alizarin-Rot-S
BMP	knochenmorphogenetisches Protein
BMU	basic multicellulär unit
BS	Brutschrank
BSA	bovines Serumalbumin
bspw.	Beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CA ²⁺	Calcium
CAP	Cold atmospheric plasma/kaltes atmosphärisches Plasma
Cm	Zentimeter
d (Zeit)	Таде
d (Distanz)	Durchmesser
d (Statistik)	Effektstärke nach Cohen
DBE/DBD	dielektrisch behinderte Entladung
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMEM/F12	Osteoblasten Differenzierungsmedium
FCS	Fetales Kälberserum
FDA	Fluorescein-Diacetate
g	Gramm
H ₂ O	Wasser
Hz	Herz
Kg	Kilogramm
kNDP	kaltes Niederdruckplasma
kV	Kilovolt
L	Liter

mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
MSCs	mesenchymal stem cells
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂	Stickstoffdioxid
NTP	nichtthermisches Plasma
OD600	optische Dichte, Wellenlängenmessung 600 nm (englisch:
	optical densitiy)
OM	Osteomedium (Herstellung siehe Tabelle x)
p (Statistik)	Signifikanzwert, p-Wert
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (English: phosphate-
	buffered saline)
Pen/Strep (P/S)	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
рН	pondus hydrogenii
PI	Propidium Jodid
pNPP	<i>p</i> -Nitrophenylphosphat
pNP	<i>p</i> -Nitrophenol
PO4 ³⁻	Phosphat
RANKL	Receptor Activator of NF-ĸB Ligand
RNS	reaktive Stickstoffspezies
RONS	reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RUNX2	Runt-related Transkriptionsfaktor 2
S	Sekunde
SD	Standardabweichung
VEGF	vascular endothelial growth factor

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	.I
Abstract	II
AbkürzungsverzeichnisIl	II
Inhaltsverzeichnis	V
2 Einleitung	1
2.1 Plasma, der vierte Aggregatzustand	1
2.2 Kaltes, non-thermales, atmosphärisches Plasma (CAP)	3
2.2.1 Dielektrisch behinderte Entladung / Dielectric Barrier Discharge	4
2.2.2 Weitere Plasmaquellen	5
2.3 Die biologische Wirkung von Plasma	7
2.4 Humanes Knochengewebe	9
2.4.1 Entwicklung, Arten und Aufbau	9
2.4.2 Funktion, Zelltypen und Stoffwechsel1	2
2.4.3 Verletzungen und Erkrankungen1	6
2.4.4 Chirurgische Versorgung einer knöchernen Verletzung1	7
2.5 Ziele der Arbeit	8
3 Material und Methoden1	9
3.1 Material1	9
3.1.1 Geräte und Instrumente1	9
3.1.2 Laborequipment	1
3.1.3 Antikörper pimär und sekundär2	3
3.1.4 Zelltypen	3
3.1.5 Verwendete Software	3
3.1.6 Substanzen und Medien	4

3.2 Methoden
3.2.1 Zellkultivierung25
3.2.2 Zellernte und Passagierung25
3.2.3 Bestimmung der Zellanzahl
3.2.4 Das Einfrieren von Zellen und das Anlegen einer Zelldatenbank
3.2.5 CellTiter-Blue [®] zur Bestimmung der Zellviabilität und des Zellstoffwechsels
3.2.6 Isolierung und Kultivierung speziell von humanen Osteoblasten und Knochenstanzen
3.2.7 Isolierung und Kultivierung speziell von humanen Osteozyten
3.2.8 Nachweis der Aktivität der alkalischen Phosphatase humaner Osteoblasten
3.2.9 Alizarin Rot Assay und Rücklösung zum Nachweis der Ossifikation
3.2.10 Das Behandlungsschema dieser Studie mit der DBD
3.2.11 Die Chemilumineszenz-Methode zum Nachweis freigesetzter Radikale 35
3.2.12 Diffusionsmessung von Knochenstanzen in der Franz-Zelle
3.2.13 Bilddokumentation mit Hilfe des Phasenkontrastmikroskops
3.2.14 Nachweis des osteoblastenspezifischen Transkriptionsfaktors RUNX2 37
3.3 Statistik und Auswertung
4 Ergebnisse
4.1 Zellkultivierung von Osteoblasten und ihre Zellviabilität über die Zeit
4.2 Der osteoblastenspezifische Transkriptionsfaktor RUNX2
4.3 Knochenmatrixbildung und Messung mittels Alizarin-Rot-Assay
4.4 Nachweis und Dynamik der alkalischen Phosphatase über den Verlauf 55
4.5 Toxizität nach Behandlung mit CAP durch die DBD auf Osteoblasten
4.6 CLD: Quantifizierung von Nitrit und Nitrat in PBS nach Behandlung mit CAP . 59
4.7 CLD: Nitrit und Nitrat nach CAP auf Knochenchips in der Franz-Zelle

5 Diskussion (inklusive Schlussfolgerung)	62
5.1 Einfluss von CAP auf die Zellviabilität in vitro	63
5.2 Einfluss auf die Zellviabilität von Knochenstanzbiopsaten: Ein in	vivo-Ansatz
	65
5.3 Einfluss auf die Exprimierung der alkalischen Phosphatase	66
5.4 Einfluss auf die Ausbildung einer Knochenmatrix	68
5.5 Ausblick	68
6 Literaturverzeichnis	71
7 Abbildungsverzeichnis	79
8 Tabellenverzeichnis	
9 Anhänge	
9.1 Einverständniserklärung	
9.2 Peak-Diagramme: Nitrit und Nitrat während CLD	
10 Danksagung	

2 Einleitung

Die Plasmamedizin ist ein junger Forschungszweig, der versucht, die physikalischen Gegebenheiten eines Plasmas, eines ionisierten Gases, für den Menschen anwendbar zu machen. Die Anwendung von künstlich erzeugtem Plasma sowohl in der Produktion konventioneller Güter als auch in der Behandlung am Menschen sind nicht mehr wegzudenken und behaupten in den letzten Jahren zunehmend ihren Stellenwert, wobei es sich hier um sogenannte kalte Plasmen handelt. Weiter kommen Plasmen zur Sterilisation von medizinischen Gerätschaften zur Anwendung, sie helfen bei der Lichterzeugung in Leuchtstoffröhren, werden benutzt, um Kunststoffe zu bedrucken und Glas zu behandeln oder finden ihren Einsatz bei der biologischen Dekontamination von Lebensmitteln.

2.1 Plasma, der vierte Aggregatzustand

Bei dem Begriff Plasma denken die meisten Menschen am ehesten an den flüssigen und zellfreien Bestandteil des Blutes. In dieser Arbeit handelt es sich jedoch um einen angeregten Zustand eines Gases zu ionisiertem Gas (1). Hierbei wird einem Gas Energie, beispielsweise in Form von Wärme, zugeführt oder es wird starken elektrischen Feldern ausgesetzt (1), was neben dem festen, flüssigen und gasförmigen Zustand als der vierte Aggregatzustand (Abbildung 1) bezeichnet wird (2, 3).



Abbildung 1: Schematische Darstellung der vier Aggregatzustände von Materie: Fest, flüssig, gasförmig und in Form von Plasma. (Eigene Darstellung)

Durch die Energiezufuhr werden Elektronen von ihren Atomen entkoppelt und sind nun gewissermaßen frei beweglich (4). Die Atome und Moleküle liegen im Plasma im ionisierten Zustand vor und es wird somit elektrisch leitfähig. Diese Transporteigenschaften erinnerten den Nobelpreisträger Irving Langmuir bezüglich der Namensgebung an Blutplasma, da es als Medium verschiedene Bestandteile wie weiße und rote Blutkörperchen durch den Organismus transportiert (1, 5, 6), wobei für die Bezeichnung Plasma heute per Definition nicht jedes ionisierte Gas auch als solches gilt. Unter anderem muss hierfür eine unter dem Strich neutrale Gesamtladung vorliegen (Quasineutralität) (7).

Die Wissenschaft geht je nach Quellenangabe davon aus, dass circa 99% der Materie im Universum in Form von Plasma vorliegt (2). Hier kann es grob in thermales und non-thermales Plasma unterteilt werden. In thermalen Plasmen besitzen alle Teilchen in etwa dasselbe hohe Temperaturniveau im Gegensatz zum non-thermalen kalten Plasma (8). Ein Beispiel für thermales Plasma ist unsere Sonne. Das Plasma im Kern der Sonne ist jedoch für eine mögliche Anwendung am Menschen zu heiß und entsteht teils nur unter sehr hohem Druck.

In kalten Plasmen sind lediglich die freien Elektronen auf einem höheren Temperaturniveau, da ihnen gezielt Energie zugeführt wird. Sie haben einen vernachlässigbaren Einfluss bezüglich der Temperatur auf die übrigen Atome und Moleküle im Plasma. Die Elektronen liegen in kalten Plasmen auch in einer geringeren Dichte vor. Sie besitzen kein thermisches Gleichgewicht (1, 7-10).

Es musste ein Weg gefunden werden, der Plasma unter atmosphärischem Druck und tolerablen Temperaturen anwendbar macht. William Crookes etablierte im 19. Jahrhundert die Grundlagen für die Anwendung von Plasmen (7). Der weitere Weg der Forschung konzentrierte sich auf die vielversprechenden nichtthermischen Plasmen (NTP), wobei die Niederdruckplasmen zunächst im Fokus lagen.

In den späten 60er Jahren des vergangenen Jahrhunderts gab es die ersten Anwendungen von kaltem Niederdruckplasma (kNDP) zur Oberflächendekontamination. Niederdruckplasmen haben im Gegensatz zum sogenannten kalten atmosphärischen Plasma (CAP) den Nachteil, dass sie ein Vakuum benötigen und nicht unter Atmosphärendruck erzeugt werden können (1). CAP erreicht in Bezug zu den kNDP zwar nicht die hohe Effektivität in der Sterilisation und Dekontamination von Oberflächen, hat jedoch einen nutzbaren Einfluss auf die Senkung von schädlichen Mikroorganismen wie Bakterien und Pilzstämmen (11-14).

Dafür verantwortlich sind freigesetzte Bestandteile (Abbildung 2), die Plasma wechselwirkungsfreudig und seine Anwendung so vielfältig machen (1, 4).



Abbildung 2: Nutzbare Bestandteile eines erzeugten Plasmas (Eigene Darstellung).

2.2 Kaltes, non-thermales, atmosphärisches Plasma (CAP)

In den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts wurde NTP in Form des CAP im Gegensatz zum kNDP für den Menschen effizient anwendbar (15, 16). Wie bereits gesagt benötigt das CAP kein Vakuum und ist somit weniger aufwendig zu erzeugen. Zudem ist es mobil einsetzbar und nicht an große Apparaturen gebunden (17).

Das CAP wird in einer Gasentladung unter Atmosphärendruck erzeugt. Durch die geringe Masse der Elektronen nehmen diese schneller kinetische Energie in elektrischen Feldern auf, wofür allerding eine hohe Feldstärke (kV/mm) nötig ist, um das Arbeitsgas wie beispielsweise das Edelgas Argon und Helium oder Luft als Gasgemisch zünden zu können (1, 18, 19). Das Volumen des erzeugten Plasmas beträgt unter Atmosphärendruck nur wenige mm³ bis cm³ (20). Eine großflächigere Anwendung muss daher mit aneinander gekoppelten Einheiten stattfinden.

Dennoch liegt der Vorteil einer kontaktlos möglichen in vivo Behandlung am Menschen, wie sie heute vor allem im dermatologischen Bereich stattfindet, auf der Hand. Das Gewebe wird weder durch Hitze noch durch direkte Einflüsse des Plasmas geschädigt (16, 21). Es sind die indirekt entstehenden Bestandteile, die Einfluss auf das behandelte Gewebe haben wie beispielsweise reaktive Sauerstoffspezies (ROS),

die relativ instabil sind und nicht lange bestehen. Sie können unter anderem den Zelltod einleiten und sind diesbezüglich interessant für die Behandlung von Tumorgewebe bei einer Krebserkrankung (7, 14, 22-25).

Die Plasmaquelle selbst kann direkt auf dem Gewebe angewendet werden oder es wird ein Zwischenmedium behandelt, bevor oder nachdem es auf einem Gewebe aufgebracht wurde. Die Behandlungszeit spielt in Bezug auf die Konzentration von ROS im behandelten Medium ebenso eine Rolle wie der Effekt auf die Zellviabilität und die Zellproliferation. Vorangegangene Studien haben beispielsweise festgestellt, dass kurze Behandlungszeiten (wenige Sekunden) die Zellproliferation von menschlichen Keratinozyten steigern kann (15, 26, 27).



2.2.1 Dielektrisch behinderte Entladung / Dielectric Barrier Discharge

Abbildung 3: Schematische Darstellung der Behandlung der in dieser Arbeit verwendeten Osteoblasten mit dem DBD-Device (Eigene Darstellung).

Bei der dielektrisch behinderten Entladung werden zwei gegenüberliegende, durch ein Medium getrennte Elektroden an einen AC-Generator angeschlossen, der in der Spannung (kV) und in der Frequenz (Hz) angepasst werden kann (120-900 Hz; 6-19 kV) (1, 28-30). Es gibt je nach Anforderung die verschiedensten Anordnungen der Komponenten (31). Die klassische Ausführung eines DBE-Geräts ist die Volumen DBE. Hierbei sind wie in diesem Versuch auch die beiden Elektroden durch einen Gasspalt, im Falle dieser Arbeit die Umgebungsluft, voneinander getrennt. Mindestens eine Elektrode ist von einem Dielektrikum ummantelt, in der Regel Keramik oder Glas. Das zu behandelnde Medium stellt gewissermaßen die Gegenelektrode dar und wird somit zum Teil des Stromkreislaufs (1, 30, 32). Der Abstand der Plasmaquelle zum Medium muss entsprechend schmal gewählt werden, in dieser Arbeit nicht mehr als 5 mm (Abbildung 3). Zum einen darf die auf die Zellen aufgebrachte Flüssigkeit von der Elektrode nicht berührt werden, zum anderen darf der Kontakt zur Gegenelektrode nicht abreißen. Es wurde festgestellt, dass ein zu großer Abstand der beiden Elektroden zueinander die Bildung eines Plasmas verhindern und ein möglicher Effekt auf das behandelte Gewebe ausbleiben kann (7, 33).

2.2.2 Weitere Plasmaquellen

Grundsätzlich können plasmaerzeugende Quellen in direkte, indirekte und Hybridsysteme unterteilt werden. Die direkten Systeme bieten für die medizinische Anwendung am Menschen einen großen Reiz, da sie transportabel und handlich konstruiert werden können und das menschliche Gewebe als Gegenelektrode dient (34). Außerdem ist die Umgebungsluft bereits als Arbeitsgas vorhanden und muss nicht extra in Form eines Trägergases hinzugefügt werden. Nachteilig ist unter anderem der konstant einzuhaltende geringe Abstand zum Gewebe, um den bestmöglichen Effekt zu erzielen und den Plasmastrom nicht abreißen zu lassen (7, 35). Dennoch haben sich einzelne Geräte etablieren können und kommen im klinischen Alltag bereits zur Anwendung (Abbildung 4).



Abbildung 4: An der Hautoberfläche erzeugtes Luft-Plasma (1).

Es kommt unter anderem zur Anwendung während einer Operation wie dem Plasmablade[™] (36, 37) und zur Behandlung chronischer Wunden und Wunden bedingt durch einen Erregerbefall (11, 38, 39), wie beispielsweise mit dem Dielectric Barrier Discharge-basierenden PlasmaDerm[®]-System (CINOGY GmbH plasma technology for health, Duderstadt, Germany). Hier ist auch eine Behandlung

großflächigerer Wunden durch entsprechende Aufsätze möglich (11, 40, 41), die mitunter bis zu sieben Tage auf der Haut verbleiben können (42).

Bei den indirekten Plasmaquellen kann das Plasma ohne die Notwendigkeit eines Mediums als Gegenelektrode erzeugt werden. In der Regel wird ein Arbeitsgas (Helium, Argon) in Form eines Plasma-Jets oder eines Plasma-Pens zwischen zwei Elektroden gezündet. Das Trägergas lenkt hier die Richtung der Erzeugung (Abbildung 5). Laut aktueller Studienlage produzieren Plasmapens weniger ROS, jedoch mehr UV-Licht und der Ausstrom ist schwieriger zu steuern (43). Ein Anwendungsbeispiel ist der CE-zertifizierte Plasmajet kINPen[®] MED (INP Greifswald/neoplas tools GmbH, Greifswald, Germany) (44-46).



Abbildung 5: a) Schematische Darstellung einer Plasmajetquelle während der Zündung (Eigene Darstellung); **b)** Beispiel einer indirekten Plasmaquelle in Form eines Plasma-Jet-Pens, wie er bei dermatologischen Läsionen Anwendung finden kann. Das Gewebe wird nicht als Gegenelektrode benötigt (3).

Weitere Anwendungsbeispiele finden sich unter anderem in der Verarbeitung und Herstellung konventioneller Güter wie der Keimeliminierung auf der Oberfläche von Hülsenfrüchten (47) (biologische Dekontamination von Lebensmitteln), in Neonröhren, bei der Veredlung von Kunststoffoberflächen und Glasoberflächen (1). In jüngster Vergangenheit fanden darüber hinaus in vivo Versuche an Mäusen (3) und am Menschen zur möglichen Behandlung von Krebserkrankungen statt (48, 49). Der Ansatz der Möglichkeit, Hauttumore oder gar ein Glioblastom, ein Mammakarzinom oder Kolonkarzinom durch die vom Plasma erzeugten zellzerstörenden Effekte behandelbar zu machen, stellt wohl einen der interessantesten Ansätze dar. Fest etabliert hat sich darüber hinaus die Vorbehandlung von Titanzahnimplantaten vor der Implantation zur maximalen Reduktion der Keimlast und einer möglichen postoperativen schwereren Komplikation (50, 51).

2.3 Die biologische Wirkung von Plasma

Auch wenn hauptsächlich von den vielen positiven Anwendungseigenschaften gesprochen wird, so gibt es in Anbetracht der entstehenden Wärme, UV-Strahlung und der freigesetzten Radikalen (52) abzuklären, ob Schäden möglich sind. Untersuchungen beispielsweise zum Plasmapen haben gezeigt, dass es am Ende sehr wichtig zu sein scheint, eine gewebespezifische Behandlungseinstellung herauszufinden, die das Verhältnis Nutzen/Schaden weit auf die Seite des Nutzens schieben sollte. Bei der Wärmemessung hat sich herausgestellt, dass ein gewisser Abstand zur Plasmaquelle eingehalten werden sollte, um thermische Schäden abzuwenden. Auch gilt es, die erzeugte UV-Strahlung auf ein Minimum zu reduzieren, um kanzerogene Dosen zu vermeiden (53, 54). Verlängerte Behandlungszeiten haben ebenfalls zeigen können, dass das Eigengewebe Schaden nehmen kann (43).

Dennoch konnten, wie oben bereits gesagt, unter anderem in der dermatologischen Behandlung bei optimal eingehaltenen Parametern keine signifikanten Schäden festgehalten werden (15, 55). CAP vereint verschiedene separate Behandlungsansätze auf einmal, wirkt vornehmlich jedoch durch die Freisetzung von reaktiven Spezies wie ROS und RNS (reactive nitrogen species), wie bei der Wundversorgung oder bei krebstherapeutischen Ansätzen (56). Auch können Effekte über das entstehende UV-Licht, wie in der Phototherapie, und durch elektrische Felder, wie bei der transkutanen Nervenstimulation (48), vermittelt werden. Während die Wirkung von UV-Licht und die Wirkung von elektrischen Feldern unmittelbar auf das Gewebe bereits erwähnt angewendet wird, kann man wie oben auch ein Zwischenmedium/Trägermedium behandeln. Hierbei macht man sich die durch das Plasma geänderte Konstellation des Mediums und dessen Milieu zunutze, indem man es entweder auf dem Gewebe aufgetragen oder separat behandelt und erst später auf das Gewebe aufbringt (57). Ein Nährmedium oder eine entsprechende Lösung kann also für einen gewissen Zeitraum durch separat behandeltes PBS ersetzt und der Einfluss auf die Zellviabilität, die Gewebeneubildung und die Exprimierung von

gewebespezifischen Markern gemessen werden. Dieser Ansatz bildet eine Alternative zur direkten Zellbehandlung und hat gute Ergebnisse liefern können (25, 58).

Plasma besitzt eine effiziente antimikrobielle Wirkung (59) und eradiziert sogar multiresistente Keime wie beispielsweise den Methicillin-resistenten Staphylococcus aureus ohne bisher erkannte Resistenzen (60, 61). Selbst ein schwierig zu behandelnder Biofilm konnte inaktiviert werden (62). In Bezug auf eukaryonte Zellen hat man feststellen können, dass kurze Behandlungszeiten die Zellproliferation von Endothelzellen begünstigen können. Verlängerte Behandlungskonzepte konnten zeigen, dass diese eher den Zelltod begünstigen (63).

Hauptsächlich ursächlich scheinen hierfür die CAP-induzierten und reaktiven Spezies und biologisch-aktiven Produkte wie Wasserstoffperoxid (H₂O₂), die Hydroxygruppen (-OH), Ozon (O₃), Nitrit (NO₂), Nitrat (NO₃) und Stickstoffmonoxide (NO) zu sein (Abbildung 6) (48, 64).



Abbildung 6: Unter dem Einfluss einer Plasma behandelten Laktat-Ringer-Lösung und durch die Einflüsse eines CAP-behandelten Mediums (PAL: Plasma Activated liquid) auf eine Zelle kann sowohl der direkte Zelltod (Apopotosis) durch H₂O₂ als auch der nicht-programmierte Zelltod wie durch andere Spezies des CAP-behandelten Mediums, welche die Glykolyse und die Vorgänge in den Mitochondrien beeinflussen, eingeleitet werden (68).

Krebszellen sind bekanntermaßen empfindlicher gegenüber dem von der DBE durch CAP erzeugten oxidativen und nitrogenen Stress, während gesunde Zellen bis zu einem gewissen Grad einen natürlichen und effektiven Abwehrmechanismus besitzen, jedoch auch bei direkter Behandlung Schaden nehmen können. So kann es bei gewebespezifischer DBE-Geräteeinstellung zu einem für die Krebszellen sehr viel schädlicheren Milieu kommen, wohingegen angrenzende gesunde Zellen nur geringen Schaden nehmen (65-67). Studien konnten zeigen, dass der, wenn auch geringe, Schaden an gesunden Zellen durch das Auftragen zuvor behandelten Mediums ohne direkte Bestrahlung noch einmal gesenkt werden kann (68, 69).

Je nach Konzentration kann H₂O₂ in geringen Mengen die Zellproliferation begünstigen und in höheren Konzentrationen den Zelltod einleiten. Ebenso verhält es sich mit Stickstoffmonoxid (NO), dass die Membranpermeabilität in geringen Konzentrationen herabsetzt, bei höheren Konzentrationen jedoch den Zelltod bedeuten kann (67).

2.4 Humanes Knochengewebe

2.4.1 Entwicklung, Arten und Aufbau

Die Entwicklung des menschlichen Skeletts kann grob in die desmale und die chondrale Osteogenese unterteilt werden. Diese beiden Prozesse unterliegen unterschiedlichen Umbauvorgängen von Mesenchymzellen, die dem embryonalen Mesoderm entstammen (70). Nach neuer Terminologie steht der Osteogenese die Ossifikation gegenüber. Während die Ossifikation der Begriff für die Bildung von Knochengewebe ist, beschreibt die Osteogenese die Anlage eines gänzlich neuen Knochens (71).

Bei der desmalen Osteogenese finden sich Mesenchymzellen zu einem organisierten Zellhaufen zusammen. Diese Zellhaufen entwickeln sich direkt zu Osteoid bildenden Osteoblasten, welche sich zu einem Geflechtknochen umbauen. Betroffen sind einige Schädelknochen, Mandibula und Klavikula. Bis zum 10. Lebensjahr reifen sie dann zum typischen Lamellenknochen aus. Bei der chondralen Osteogenese hingegen bildet sich ein Geflechtknochen zum knorpeligen Primordialskelett über einen Umweg aus. Der größte Teil der Mesenchymzellen differenziert sich hierbei erst zu Chondroblasten, die eine hyaline Knochenmodellvorstufe des späteren Kindsskeletts bilden und dann erst zu Osteoblasten (70-72). Ein Großteil dieser Chondroblasten geht durch Apoptose zugrunde. Der übrige, zu hypertrophen Osteoblastenvorläufern differenzierte Teil, exprimiert den Wachstumsfaktor VEGF zur Einsprossung von Endothelgefäßzellen in das knorpelige Gewebsgerüst. An denen wandern die Osteoid bildenden Osteoblasten entlang und ziehen Knorpelreste abbauende Chondroklasten

mit. Schlussendlich liegen zellversorgende Kanäle, von ausgebildeten Knochenlamellen umbaut, vor, sowohl waagerecht (Volkmann Kanäle) als auch senkrecht verlaufend (Havers Kanäle) (70, 73). Der Geflechtknochen stellt somit den unreifen, primären, juvenilen Knochen dar. Diesem Knochen fehlt noch die regelrechte Blutgefäßversorgung. Der Lamellenknochen steht hingegen eher für den adulten, sekundären, ausgereiften Knochen. Dessen Hauptgerüst wird durch lamellenartig aufgebaute Osteone, Havers-Systeme, gebildet, die je einen Havers-Kanal mit entsprechenden versorgenden Gefäßen im Zentrum beinhalten (71, 74). Durch schraubenförmig verlaufendes Kollagen vom Typ I werden die vier bis zwanzig Lamellenringe eines Osteons wiederum in sich gestützt (71). Untereinander sind die Osteone mit Schaltlamellen und äußeren sowie inneren Generallamellen verbunden (70). Diesen Bereich des Knochens nennt man Compacta. Der Compacta liegt im inneren des Knochens die Spongiosa mit ihrem Trabekelwerk an. Außen liegt das mit Schmerzfasern durchzogene Periost auf (Abbildung 7). Bestehend aus einem Stratum fibrosum mit in den Lamellenknochen einwachsenden, bindegewebigen Sharpey-Fasern und anheftenden Osteoblasten durchdringen eigentlich nur Hauptgefäßäste (A. u. V. nutricia) den gesamten Knochen von außen bis in den Markraum mit dem blutbildenden Knochenmark. Die Spongiosazellen samt Osteoblasten und Osteoklasten werden im Innern des Knochens lediglich durch Diffusion versorgt (70. 72). Der Spongiosa aufgelagert befinden sich MSCs, im Ruhemodus befindliche Osteoblasten und Osteoklasten, als eine Art Backupsystem. Sie bilden als sogenannte bone-lining-cells, wenn man so will, das Endost, welches wiederum die Innenflächen des Trabekelwerks als auch der Kompakta und der den Knochen durchziehenden, Kanäle überzieht (72).



Abbildung 7: Aufbau des adulten Röhrenknochens am Beispiel des Femurs. a) Adulter Oberschenkelknochen mit anteiligem Längsschnitt, b) Ausschnitt aus dem Hüftkopf mit Darstellung der Spongiosabälkchen, c) Ausschnitt aus der Kompakta des Oberschenkelknochens und Darstellung deren Organisation, d) Struktureller Aufbau eines Osteons mit zentralem Haverskanal, e) Ausschnitt und Aufbau des Periosts (70).

Der noch junge Röhrenknochen beginnt mit der enchondralen Ossifikation zum adulten Lamellenknochen, mit einigen Ausnahmen, erst nach der Geburt. Ein primärer Knochenkern liegt in den meisten Knochenanlagen bereits vor. Während in der mittleren Diaphyse, im Bereich des Röhrenknochens, zeitlebens das Breitenwachstum, wichtig für Knochenfrakturheilung, induziert werden kann, stellt die Epiphyse das Längenwachstum mit steigender Sexualhormonausschüttung langsam ein. In dieser Wachstumsphase bohren sich Osteo- und Chondroklasten förmlich, gefolgt von knochenbildenden Osteoblasten, in Richtung Epiphysenfuge vor, die Knorpelzellen verschiedener Zellstadien beinhaltet und zum Längenwachstum beiträgt (Abbildung 8). Im Zentrum der Epiphyse bildet sich im Laufe des Knochenwachstums ein sekundärer Knochenkern aus, durch Einsprossung von Gefäßen, bis das Gewebe schließlich vollends verknöchert und der Epiphyse nur noch ein Gelenkknorpel aufliegt (70-73).



Osteoblasten Osteoid primäre Spongiosa



Dennoch ist der adulte Knochen zeitlebens einem Umbau unterworfen. Alle zehn Jahre ist das knöcherne System in seiner Substanz einmal komplett ausgetauscht worden. Dieser Sachverhalt ist äußerst wichtig. Bei einer Fraktur oder wechselnden Umweltbedingungen, beziehungsweise Ansprüchen an den Bewegungsapparat, passt sich das Knochengerüst so seinen Anforderungen entsprechend an (70).

2.4.2 Funktion, Zelltypen und Stoffwechsel

Das äußere Erscheinungsbild des Menschen wird hauptsächlich durch sein Skelettsystem bestimmt (70). Mit 99 % von ca. 1 kg Gesamtcalciumanteil stellt das Knochengerüst zudem den größten Calciumspeicher in unserem Körper dar. Die Hauptaufgaben des menschlichen Skelettsystems sind vorrangig die Stützfunktion des Organismus und die Schutzfunktion lebenswichtiger Organe, wie bspw. Hirn, Herz und Lungen (74, 75), außerdem, den Stoffwechsel betreffend, die Aufrechterhaltung des

konstanten Calciumspiegels im Blut und den vom Calcium abhängigen Vorgängen und Zellen, wie bspw. Proteinaktivierung, Kontraktion der Herzmuskelzellen und der am Gerüst selbst ansetzenden Muskelzellen des Bewegungsapparats (75, 76).

Das humane Knochengewebe besteht aus verschiedenen Anteilen organischer und anorganischer extrazellulärer Matrix. In der Literatur ist die prozentuale Gewichtung nicht immer gleich angegeben. Der anorganische Anteil schwankt hier zwischen 65 % und 80 %. Hauptbestandteil ist Hydroxylapatit $[Ca_{10}(PO_3)_6(OH)_2]$ was wiederum aus ca. 35 % Ca²⁺ und 50 % PO₄³⁻ und anderen Mineralien sowie Wasser bestehen soll (71, 75). Der organische Anteil beträgt somit zwischen 20 % und 35 %. Zusammengesetzt ist dieser Anteil aus 10 % ungeformten Komponenten, wie bspw. Proteoglykanen und 90 % geformten Komponenten, wie bspw. Fasern des Kollagentyps I (71, 75, 77).

Grundsätzlich bilden Osteoblasten und Osteozyten das Hauptgerüst unserer Skelettstruktur. Den Knochen aufbauenden Osteoblasten stehen Knochengewebe abtragende Osteoklasten gegenüber. Beide Zelltypen entstammen unterschiedlichen Vorläuferzellen und stehen dennoch eng miteinander in Verbindung. Sie bauen den Knochen ununterbrochen um. Dieser Umbau ist einem fein abgestimmten hormonellen Kontrollsystem unterworfen und wird vom physiologischen Bedarf gesteuert (71, 72, 78).

Osteoblasten sind ca. 15 µm große Zellen, die meist kubisch und epithelartig auf der Knochenoberfläche angeordnet liegen. Sie entstammen modifizierten MSCs und können das ganze Leben, unter Einwirkung verschiedener Aktivatoren und Wachstumsfaktoren wie bspw. BMP, Runx-2 und Osterix, aus diesen Zellen hervorgehen. Osteoblasten stellen mit ca. 5 % einen nur sehr kleinen Anteil aller Knochenzellen. Ihre Lebensspanne ist im aktiven Zustand mit bis zu zweihundert Tagen ebenfalls nur gering. Im Ruhezustand erscheinen die Zellen eher langgestreckt (bone-lining-cells) und die Lebensdauer kann so mehrere Jahre betragen, bevor die Zellen aktiviert werden. Die Hauptaufgaben der Osteoblasten sind die Bildung der Knochenmatrix sowie die Regulation ihrer Gegenspieler, der Osteoklasten, als auch die Differenzierung und Einmauerung ihrer selbst zu den langlebigen Osteozyten (70-72, 74, 79, 80).

Bevor Osteoblasten zu Osteozyten ausdifferenzieren oder in Apoptose gehen können, bilden sie, der Knochenmatrix aufgelagert, die Hauptbestandteile der nichtmineralisierten Knochenmatrix, d.h. das Osteoid. Für die endgültige Mineralisation und Aushärtung des Knochens sind u.a. osteoblastäre Vesikel, die gefüllt sind mit alkalischer Phosphatase, unentbehrlich. Damit ein Gleichgewicht im Knochenumbau, bzw. zwischen Knochenaufbau und -abbau entsteht, aktivieren Osteoblasten die Knochen abbauenden Osteoklasten. Die Aktivierung erfolgt hauptsächlich über den sogenannten RANK-Liganden, auf der Zelloberfläche des Osteoblastenvorläufers verankert. Dieser RANKL bindet an den RANK-Rezeptor der Zelloberfläche von Makrophagen, den Osteoklastenvorläuferzellen, und induziert eine Signalkaskade (NF-кВ). Es folgt ein Zusammenschluss einiger aktivierter mehrkernigen Makrophagen, die zu einem Osteoklasten verschmelzen, ausdifferenzieren und aktiv Knochensubstanz umsetzen (Abbildung 9). Ein Osteoklast ist ca. zehnfach leistungsstärker als ein Osteoblast. Ihm gegenüber müssen also deutlich mehr aktive Osteoblasten stehen, um ein effektives Gleichgewicht zu erreichen. Bei der Erkrankung an Osteoporose bspw. kann mit humanen monoklonalen Antikörpern, wie Denosumab, der Knochenabbau behandelt werden. Diese Antikörper binden, vereinfacht gesagt, an den RANKL und hemmen so die Entstehung von Osteoklasten. Osteoblasten können begrenzt über den löslichen Rezeptor Osteoprotegerin (OPG) die Osteoklastengenese auch selbst steuern (70-72, 74, 79, 80).



Abbildung 9: a) Schematische Darstellung des Knochenumbaus und die Steuerung der Kaskade durch Parameter wie Hormone oder Immunzellen; **b)** Aktivierung der Osteoklasten durch die Osteoblasten über den RANK-Liganden (81).

Osteoklasten entwickeln sich demnach aus dem System der mononukleären Phagozyten. Sie stellen mit gerade einmal 2 % den geringsten Anteil aller Knochenzellen. Während Osteoblasten ein Leben lang teilungsfähig sind und unter

dem Einfluss von VEGF proliferieren können, ist die Lebensphase aktiver, nicht teilungsfähiger Osteoklasten mit bis zu fünfundzwanzig Tagen recht kurz. Osteoklasten binden über Integrine an die Knochenoberfläche. Der Knochenseite zugewandt faltet sich die Zellmembran zur sogenannten "ruffled border" auf und vergrößert so die aktive Oberfläche. Unter ATP-Verbrauch pumpt die Zelle H⁺-Ionen in diesen Zwischenraum, den so genannten Howship-Lakunen. Weiter pumpt die Zelle Cl⁻Ionen in die Lakunen, die sie im Austausch mit HCO₃⁻Ionen erhält. Die Zelle schafft auf diese Art ein abgeschlossenes, saures Milieu (pH 4,5), das ihr den Knochenabbau erst möglich macht (70-72, 74, 79, 80).

Ein denkbarer Versuch, die Induktion des Knochenumbaus zu erklären, bilden die sogenannten BMUs (basic multicellulär units). Osteozyten spielen hierbei eine entscheidende Schlüsselrolle. Osteozyten stellen mit bis zu 95 % den größten Anteil aller Knochenzellen dar. Sie sind in ihrem bewegungslosen, stoffwechselarmen Zustand dennoch zur Interaktion in der Lage. Über Canaliculi, innerhalb der Knochenlamellen verlaufend, strecken Osteozyten ihre Fortsätze aus und stehen so mit anderen Osteozyten in Verbindung. Dieses sensible Netz wird "Osteozytensynzytium" genannt. Über mechanische Beanspruchung des Knochens registrieren die Fortläufer der Osteozyten eine Dehnung oder Komprimierung des Knochens und schütten vermutlich VEGF aus. Unter diesem Einfluss induzieren sie eine Einstülpung von Endothelzellen, denen Osteoklasten, einem Bohrkopf ähnlich, durch den Knochen folgen. Den Osteoklasten wiederum folgen einige Reihen von Osteoblasten, die den Knochen letztlich umbauen und selbst, in Form von Osteozyten, neue Osteone und Querlamellen bilden (Abbildung 10).

Das Zusammenspiel dieser Zellen und seiner Faktoren wird schließlich als BMU bezeichnet. Daraus folgt die Vermutung, dass Knochengewebe im Alltag physischer Bewegung und Belastung ausgesetzt sein muss, um über eine ausreichende Festigkeit zu verfügen und umgebaut werden zu können. Andernfalls wird Knochengewebe relativ schnell abgebaut, was zu Funktionseinbußen, sowie Erkrankungen führen kann (70-72, 74, 78-80).



Abbildung 10: Strukturierte Darstellung der Entstehung eines Osteons. **a)** "Bohrkopf" in der Resorptionshöhle, **b)** Resorptionshöhle im Querschnitt, **c)** Umwandlungszone der Osteoblasten, **d)** Aufbau der Lamellenstruktur durch Osteoblasten, **e)** Querschnitt durch erstelltes Osteon (70).

2.4.3 Verletzungen und Erkrankungen

Wenn Knochen äußeren, physikalischen Kräften ausgesetzt ist, die seine Belastungsgrenze überschreiten oder bspw. im Krankheitsbild der Osteoporose in seiner inneren Struktur geschwächt ist und an Statik einbüßen muss, dann ist eine häufige Folge die Fraktur des Knochens (70, 79, 80, 82).

Die Klassifikation von Frakturen kann nach ganz unterschiedlichen Aspekten erfolgen. Wichtigste Merkmale der Einteilung sind vor allem die Entstehung, die Lokalisation, der Schweregrad und die Weichteilbeteiligung. Nach diesen Kriterien kann mit weiteren diagnostischen Mitteln, wie dem Röntgenbild in zwei Ebenen, das therapeutische Vorgehen festgelegt werden. In der Unfallchirurgie findet vor allem die AO-Klassifikation Anwendung, die in vier aufeinander folgenden Schritten eine genaue Kodierung der Fraktur systematisch festlegt (70, 83). Die Klassifikation der Weichteilschäden bei offenen Frakturen wird in der Regel nach Anderson und Gustilo vorgenommen. Diese Einteilung erfolgt in Grad I-III und spielt in Hinsicht auf mögliche Anwendungsgebiete der in dieser Arbeit verwendeten DBD-Apparatur eine wichtige Rolle, wichtiger in jedem Fall als die Einteilung nach Tscherne und Oestern bei geschlossenen Frakturen (82). Neben der Bildung eines unechten Gelenks, einer fehlenden knöchernen Verheilung nach sechs Monaten (Pseudarthrose), ist die Osteomyelitis und die Osteitis eine gefürchtete Komplikation im Heilungsverlauf (70).

2.4.4 Chirurgische Versorgung einer knöchernen Verletzung

Die knöcherne Fraktur wird je nach Lokalisation mittels Plattenosteosynthesen, Osteosyntheseschrauben, Drähten, künstlichen Gelenken, Nägeln, internen und externen Fixteuren, Cerclagen, Zuggurtungen oder konservativ versorgt (84).



Abbildung 11: Im Oberschenkelknochen (Femur) und im Unterschenkel (Tibia) verankerter, das Kniegelenk überbrückender Fixateur externe. Die kutanen Durchtrittstellen, die bis tief in das Knochengewebe reichen bilden eine potentielle Eintrittspforte für Keime, die das angrenzende Gewebe besiedeln können (89).

Hierbei können unterschiedlichste Komplikationen entstehen, die es zu minimieren gilt. Grundsätzlich ist beim Einbringen eines Fremdmaterials in den menschlichen Körper die Gefahr gegeben, Keime mit in den Wundbereich oder als Biofilm auf das Osteosynthesematerial zu bringen. Bei dem externen Fixateur (Abbildung 11), der die Fraktur von außen durch die Haut mittels im Knochen verankerten Stäben stabilisiert, ist eine offene transkutane Eintrittspforte bis in das Knochenmark gegeben. Eine offene Fraktur bedeutete in früheren Zeiten nicht selten ein Todesurteil (85). Auch heute kommt es immer wieder zu Infektionen nach operativ versorgter Fraktur und der Besiedlung mit Keimen wie dem MRSA (30 %), Pilzen oder *Pseudomonas aeroginosa* (5 %) bei bis zu 50 % der Fälle je nach Versorgung und Frakturmorphologie (84, 86). Hier kann die Behandlung mit CAP ansetzen und möglicherweise zu einer Senkung der Komplikationsraten beitragen. Versuche haben gezeigt, dass eine Senkung und Eradikation genannter Keime mittels CAP möglich ist (87, 88). Auch bei der gefürchteten Sepsis nach Osteosynthese kann CAP ein Ansatz zur Heilung sein (22).

2.5 Ziele der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Wirkung von kaltem atmosphärischem Plasma auf humane Osteoblasten hinsichtlich seiner Wirkung vor allem auf die Zellviabilität, die Exprimierung der alkalischen Phosphatase und die Differenzierung sowie Ausbildung der Knochenmatrix zu untersuchen.

Die Kernfrage ist, kann eine Geräteeinstellung der DBD und das entsprechende Setting gefunden werden, dass die zu untersuchenden Zelleigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten humanen Osteoblasten begünstigt?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte und Instrumente

Tabelle 1: Übersicht der verv	wendeten Geräte u	ind Instrumente
-------------------------------	-------------------	-----------------

Geräte und Instrumente	Hersteller
Biophotomoeter	Eppendorf Hamburg, Deutschland
Dielectric Barrier Discharge (DBD); kaltes atmosphärisches Plasma erzeugendes Gerät	Leihgabe der Fa. Cinogy und charakterisiert durch AEPT Ruhr-Universität-Bochum, Deutschland
Diffusionszellen/Franz-Zellen	PermeGear Inc. Hellertown, PA, USA
Druckmesser	ENFM -1.0 bis 1.5 bar Dordrecht, Niederlande
Einhängethermostate	 Thermo Scientific HAAKE SC 100 Waltham, MA, USA Lauda E 100 Lauda-Königshofen, Deutschland
Elektro-Multiwerkzeug	WMW 300-1 WORKZONE Anif, Österreich
Flockeneisbereiter	Scotsman AF 80 Vernon Hills, IL, USA
Fluoreszenz Mikroskopkamera	Axiocam mono Zeiss Oberkochen, Deutschland
Gasbrenner	Fuego basic SCS WLD-TEC WLD-Tec GmbH Arenshausen, Deutschland
Gefrierbehälter	Thermo Scientific Nalgene Mr. Frosty Waltham, MA, USA
Gefrierschrank	Liebherr Economy Ochsenhausen, Deutschland
Inkubatoren	 Thermo Scientific HERAcell 150i Waltham, MA, USA Nuaire AutoFlow NU-4500 CO2 Water-Jacketed Incubator Plymouth, MN, USA
Laborwaagen/Analysewaagen	 Kern und Söhne 440-33N Kern und Söhne ABJ 220-4M Balingen-Frommern, Deutschland
Magnetrührer	Heidolph Kelheim, Deutschland

Mikroskop	Zeiss Axiovert 40	
	Oberkochen, Deutschland	
NO-Analysatoren	CLD 88 und CLD 88 e, eco physics,	
	Durnten, Schweiz	
Pipetten	Eppendon Research	
Dinettenetänder	APIMED L angenfold Douteobland	
	Abimed Langemend Deutschland	
Pipettierhelfer	Wertheim, Deutschland	
	Perkin Elmer Victor3 1420 Multilabel	
Plattenphotometer	Counter	
	Rodgau, Deutschland	
Rollenmischer	RM5-V 1750; RM5-V80 1752, Ratek	
	Boronia, Victoria, Australia	
	Heidolph REAX top	
Schüttel- und Mischgeräte	Schwabach, Deutschland	
	IKA MS 3 basic	
	Staufen, Deutschland	
Schüttelwasserbad	Witeg Labortechnik GmbH	
	Wertheim, Deutschland	
Spectrometer	Eppendorf BioPhotometer 6131	
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		
	Inermo Fisher	
Sterilwerkbänke/Benches		
	Clean Alf EF-A	
Taschenrechner	Barsinghausen Deutschland	
	ELMA Transsonic TL-H-10	
	Singen Deutschland	
Wärmebäder	 Julabo ED W26 	
	Seelbach Deutschland	
	Eppendorf MiniSpin Minizentrifuge	
	Hamburg, Deutschland	
Zentrifugen	Thermo Scientific Megafuge 16R	
	Thermo Scientific Heraeus Pico 17	
	Waltham, MA, USA	

3.1.2 Laborequipment

	Tabelle 2:	Übersicht über	das verwendete	Laborequipment
--	------------	----------------	----------------	----------------

Laborequipment	Hersteller
	• 5 mm Stiefel Biopsy Punch
Biopsiestanze	Stiegelmeyer
	Köln. Deutschland
	0,5 ml conical tube -Eppendorf Safe-
	Lock Tubes 0,5 ml
	 1,5 ml conical tube -Eppendorf Safe-
	 2 ml conical tube -Eppendorf Safe-
	Lock Tubes 2 ml
Konische Röhrchen	Hamburg, Deutschland
	2 ml Cryos Cryo Tube greiner bio one
	15 ml CELLSTAR® TUBE3 greiner bio
	one CatNo. 188 271
	50 ml CELLSTAR® TUBE3 greiner bio
	one CatNo. 227 261
	Frickennausen, Deutschland
Küvetten	Sarstedt AG & Co
	Nümbrecht Deutschland
	XL MICRO-TOUCH Nitra-Tex Ansell
Laboreinmalhandschuhe	Brüssel, Belgien
	6 Well Zellkulturplatte CELLSTAR
	greiner bio one CatNo. 657 160
	12 Well Zellkulturplatte CELLSTAR
	greiner bio one CatNo. 665 180
Multikammerplatten	24 Well Zellkulturplatte CELLSTAR
	greiner blo one CatNo. 662 160
	96 Well Microplatte greiner bio one Apolycoplatte
	Frickenhausen Deutschland
Parafilm [®] M	Merck KgaA
	Darmstadt, Deutschland
Pasteurpipetten	Natron-Kalk-Glas ISO 7712 Brand Merck
	Taufkirchen, Deutschland
Petrischale	100 mm TC Dish Standard REF 83.3902
	Sarstedt
	Nurnberg, Deutschland
Pipetten mit/ohne Filter	• 1000 µI XL TIPONE RPT MIT FIITER
	Hamburg. Deutschland

Skalpell	Feather Disposable Scalpel No. 21 pfm medical GmbH Köln, Deutschland
Sterile Filter	Millex-GS 0.22 µm sterile Filter Unit MF- Mp. MCE Membrane Merck Millipore Ltd. Tullagreen, Carrigtwohill, Cork, Irland
Sterile Handschuhe	Vasco surgical powder-free B Braun Melsungen AG Größe 8 ArtNr. 6081141 Melsungen, Deutschland
Sterile Spritzen	10 ml Injekt Luer Solo BRAUN Melsungen, Deutschland
Steriler OP-Kittel	Sentinex PRO OP-Mantel Spunlace XL Lohmann & Rauscher GmbH Neuwied/Rengsdorf, Deutschland
Steriler Schraubbecher	100 ml steril, mit Graduierung, mit montiertem Deckel, Länge 73 mm, Öffnungsdurchmesser 62 mm – Sarstedt Nümbrecht, Deutschland
Steriles Abdecktuch	Raucodrape Lohmann & Rauscher 38 x 45 cm steriles OP-Tuch Neuwied/Rengsdorf, Deutschland
Stripetten	 5 ml COSTAR. Stripette Corning Incorporated 10 ml COSTAR. Stripette Corning Incorporated 25 ml COSTAR. Stripette Corning Incorporated New York, NY, USA
Zählkammer	Neubauer Zählkammer, LO-Laboroptik Friedrichsdorf, Deutschland
Zellkulturflaschen	 50 ml, 25 cm², PS, Filter- Schraubverschluss rot, transp., Merck CELLSTAR® TC Art.No. 690175 250 ml, 75 cm², PS, Filter- Schraubverschluss rot, transp., Merck CELLSTAR® TC Art.No. 658175 550 ml, 175 cm², PS, Filter- Schraubverschluss rot, transp., Merck CELLSTAR® TC Art.No. 661175 Darmstadt, Deutschland
Zellschaber	Cell Scraper greiner bio one CatNo. 541 070 Frickenhausen, Deutschland

3.1.3 Antikörper pimär und sekundär

Tabelle 3: Verwendete primäre Antikörper

Antikörper	Hersteller
RUNX2 (M-70): sc-10758 rabbit	Santa Cruz Biotechnology, inc., Dallas, TX, USA

Tabelle 4: Verwendete sekundäre Antikörper

Antikörper	Hersteller
Fluorescin (FITC) anti-rabbit	Jackson-Immuno-Research Laboratories Inc.
	Ely, Cambridgeshire, United Kingdom

3.1.4 Zelltypen

Tabelle 5: Verwendete Zellen

Zelltyp	Herkunft
Humane Osteoblasten	Hüftkopf (Mensch), aus Hüftgelenksersatzoperationen
Humane Keratinozyten	Bauch- und Oberschenkelhaut (Mensch), aus plastischer Operation, laborinterne parallel geführte Arbeitsgruppe

3.1.5 Verwendete Software

 Tabelle 6:
 Verwendete
 Software

Software	Hersteller
Windows, Microsoft Office 365	Microsoft Corporation Redmond, WA, USA
Endnote	Principal executive office London, United Kingdom
OriginPro 2024	OriginLab Corporation Northamptom, MA, USA

3.1.6 Substanzen und Medien

Tabelle 7: Verwendete Substanzen

Substanzen/Medium	Bedeutung/Hersteller
1-Cetylpyridiniumchlorid Monohydrat	Merck KgaA Darmstadt, Deutschland
<i>p</i> -Nitrophenol	Sigma Darmstadt, Deutschland
Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Alizarin Rot S mono	Merck KgaA Darmstadt, Deutschland
Aqua destillium	Aqua B. Braun, 1000 ml Melsungen, Deutschland
CellTiter-Blue Cell Viability Assay	Promega Cat. Nr. G8081 Madison, WI, USA
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium gibco Thermo-Fisher sci. Life Tech. GmbH Darmstadt, Deutschland
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium + Nährstoffmedium F-12 (Ham) gibco Thermo-Fisher sci. Life Tech. GmbH Darmstadt, Deutschland
Formaldehyd	Applichem Panreac Darmstadt, Deutschland
Händedesinfektion	Sterillium® classic pure Bode Hamburg, Deutschland
Isopropanol 99,5 %	Merck Emplura [®] KgaA Darmstadt. Deutschland
Natronlauge	Merck KgaA Darmstadt, Deutschand
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung Thermo-Fisher sci. Life Tech. GmbH Darmstadt, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	Antibiotikum PAN-Biotech Aidenbach, Deutschland
Triton™ X-100	Sigma Darmstadt, Deutschland
Trypsin-EDTA	bio West Nuaillé, Frankreich
DMSO	Dimethylsulfoxid Sigma Aldrich St. Louis, MO, USA
Isopropanol	Merck Darmstadt, Deutschland
<i>p</i> -Nitrophenylphosphat/4-Nitrophenol	SIGMA Darmstadt, Deutschland

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultivierung

Alle Zellen dieser Arbeit wurden mit sterilen/autoklavierten Materialien isoliert und verarbeitet. Die Aufbewahrung und Kultivierung fand unter standardisierten Bedingungen in einem aus der Materialliste (Tabelle 1) zu entnehmenden Inkubator statt. Die gewählten Bedingungen betrugen über die gesamte Versuchsreihe hinweg konstante 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂. Die Zellen selbst wurden in CELLSTAR Zellkulturflaschen zwischen 25 cm² und 175 cm² und Mehrkammerplatten kultiviert, aufbewahrt und passagiert. Die Behältnisse wurden vor dem Platzieren in den Inkubator mit in Ethanol getränkten Tüchern gereinigt. Die Arbeitsflächen der Werkbank (Bench) wurden vor und nach jedem Arbeitstag ebenfalls gereinigt.

3.2.2 Zellernte und Passagierung

Die Zellkulturflaschen wurden regelmäßig unter dem Lichtmikroskop auf Adhärenz und Konfluenz des Zellrasens kontrolliert. Das Nährmedium wurde je nach Modifikation alle 24-48 h unter sterilen Bedingungen unter der Arbeitsbank abgesaugt und durch äquivalente Nährmedien gleicher Menge ersetzt. Bei gegebener lückenfreier Dichte des Zellrasens wurde das Nährmedium unter sterilen Bedingungen abgesaugt und durch eine Trypsin-EDTA in PBS-Lösung ersetzt. Anschließend erfolgte die circa 5-minütige Lagerung im Inkubator unter mikroskopischer Kontrolle bis zur Aufhebung der Adhärenz. Die Lösung wurde zuvor unter sterilen Bedingungen mittels PBS-Lösung und Trypsin-EDTA Lösung in einem 15 bzw. 50 ml Falcon im Verhältnis 9:1 angesetzt. Die Reaktion der Zellablösung wurde mittels Zugabe von Nährmediumslösung mindestens im Verhältnis 10:7 geblockt. Mit einem Zellschaber wurden anschließend die noch nicht in Gänze abgelösten Zellen, um eine maximale Zellausbeute zu erreichen, vorsichtig abgelöst. Die Zelllösung wurde mittels Pipette in ein Falcon überführt und in der Zentrifuge bei 1300 U/min und 3 min bei 17 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit der Glaspipette abgesaugt. Das Zellpellet wurde mit einer entsprechenden Menge Medium in der Pipette durch An- und Absaugen gelöst und je 1 ml auf eine Zellkulturflasche aufgeteilt. Die Beschriftung der Flaschen erfolgte nach Passage und Spendernummer, sowie Zelltyp.

3.2.3 Bestimmung der Zellanzahl

Die Bestimmung der Zellanzahl nach der Zellernte erfolgte mittels Neubauer-Zellzählkammer. Nach Abzentrifugieren wurden 20 µl des in Nährmedium gelösten Zellpellets in ein 500 µl Eppendorf-Tube mit 20 µl Trypanblau vermischt. Hiervon wurden 10 µl auf die zentral vorgesehene Einkerbung der zuvor mittels Isopropanol gereinigten Glasplatte, in die die Zählkammer eingraviert wurde, pipettiert. Ein gereinigtes, zentral aufgelegtes, plan geschliffenes Glasplättchen verteilt die Probe durch Adhäsion auf die Quadrate der eingravierten Zählkammer. Diese besteht aus identischen 3 x 3 angeordneten Quadraten mit der Kantenlänge 1 mm. Diese Quadrate sind in den vier äußeren Quadranten wiederum unterteilt in 16 identische Quadrate. Diese vier Quadrate wurden unter dem Mikroskop bei zehnfacher Vergrößerung betrachtet und die in den Quadraten befindlichen vitalen Zellen wurden erfasst. Da nur avitale Zellen den Farbstoff Trypanblau aufnehmen, ist die Unterscheidung unter dem Mikroskop einfach und die blau angefärbten Zellen innerhalb der zu beachtenden Quadrate wurden nicht berücksichtigt.

Anschließend erfolgte nach untenstehender Formel die Hochrechnung der Anzahl der lebendigen Zellen auf einen Milliliter:

Zellanzahl/ml = Verdünnungsfaktor x
$$\frac{\text{Anzahl der Zellen}}{4}$$
 x 10⁴

So konnte für die Versuchsreihe eine gleiche Anzahl an Zellen auf die Wells aufgeteilt werden (90, 91).

3.2.4 Das Einfrieren von Zellen und das Anlegen einer Zelldatenbank

Zum Anlegen einer Gewebe- und Zellbank für schwerpunktmäßig knochenbildende Zellen und bei Nichtverwendung von Zellen aus dieser Versuchsreihe wurden diese in Stickstofftanks und Tiefkühlschränken (-80 °C) eingefroren.

Hierfür wurden die einzufrierenden Zellen wie oben beschrieben geerntet und gezählt. Zunächst wurde ein Gemisch (Kryomedium) aus FCS und Dimethylsulfoxid (DMSO) unter dem Abzug hergestellt. Für 4 ml Kryomedium wurden 3,6 ml FCS und 400 µl DMSO zusammengeführt. Je 1 ml des Kryomediums wurden auf eine entsprechende Anzahl an Kroyoröhrchen in einen Gefrierbehälter (Mr. Frosty[™]) gegeben. Nachträglich erfolgte die Aufteilung der gewonnen, einzufrierenden Zellen in einer
Anzahl zwischen 250.000–1.000.000 Zellen auf die Kryoröhrchen. Durch Resuspendieren erfolgte eine ausreichende Durchmischung.

Der Gefrierbehälter wurde in einen der vorhandenen Tiefkühlschränke bei -80 °C gestellt.

Der Gefrierbehälter ist mit Isopropylalkohol gefüllt und sorgt für ein schonend gleichmäßiges Herunterkühlen der Zellen im Behältnis von circa 1 °C/min. Am nächsten Tag, nach Erreichen der Zieltemperatur, wurden die Kryoröhrchen aus dem Behälter genommen und in entsprechend beschriftete Boxen überführt.

Die Zellen stehen somit für zukünftige Verwendungen zur Verfügung.

3.2.5 CellTiter-Blue[®] zur Bestimmung der Zellviabilität und des Zellstoffwechsels

Um ein Maß für den Metabolismus und die mögliche Toxizität in Bezug auf die in dieser Studie verwendeten Zellen mit und ohne Behandlung durch die Dielectric Barrier Discharge (DBD) bekommen und miteinander vergleichen zu können, wurde der CellTiter-Blue[®] Assay verwendet.

Hierbei wird der blaue Farbstoff Resazurin nur durch vitale Zellen unter Reduktase zum Farbstoff Resorufin umgesetzt (Abbildung 12). Die Farbe schlägt vom ursprünglichen blauen in einen violetten bis pinken Farbton um (92). Da beide Farbstoffe ein eigenes spezifisches Absorptionsmaximum besitzen, kann die durch lebende Zellen umgesetzte Menge im in dieser Studie verwendeten multimodalen Mikroplattenlesegerät Victor gemessen werden.



Abbildung 12: Die Reduktion von Resazurin zu Resorufin; Strukturformeln (93)

CellTiter-Blue[®] wird im Verhältnis 1:20 mit dem entsprechenden Nährmedium vermengt und direkt auf die Wells der Zellen gegeben. In der Regel handelte es sich um 24-Well-Platten, wobei jedes Well mit 500 µl befüllt wurde. Die Zellen kamen in dieser Arbeit jeweils für 60–75 min in den Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂.

Danach wurden aus jedem Well je 3 x 100 µl Proben mit der Pipette entnommen und in eine 96-Well-Platte überführt. Zusätzlich erfolgte zur Vergleichbarkeit die Messung eines Blanks mit reinem CellTiter-Blue[®]/Nährmedium-Gemisch, der ebenfalls für 60–75 min im Brutschrank gelagert wurde.

Die Messung wurde bei einer Wellenlängeneinstellung von 590 nm (Filter: P540, F590), dem Absorptionsmaximum von Resorufin, im Victor Plattenlesegerät durchgeführt. Hieraus wurde versucht, grafisch darzustellen, ob und inwieweit der Metabolismus und das Überleben der Zellen durch die Behandlung mit der DBD beeinflusst werden.

Außerdem wurde mithilfe des CellTiter-Blue[®] Assay die Zellproliferation über einen festgelegten Zeitraum beobachtet.

Zur weiteren Verwendung der Zellen wurden die Wells mit PBS bis zur Entfärbung gewaschen und mit neuem Nährmedium zurück in den Brutschrank gestellt.

3.2.6 Isolierung und Kultivierung speziell von humanen Osteoblasten und Knochenstanzen

Die Isolierung der in dieser Studie verwendeten humanen knochenbildenden Zellen erfolgte auf der Basis des Protokolls von Robey and Termine (94).

Das humane Knochenmaterial dieser Studie stammt von Spendern im Alter zwischen 35 und 90 Jahren (n=9; Mittelwert=73,6 a; SD=15,7; Median=78) aus elektiven operativen Eingriffen, welches unter sterilen Bedingungen intraoperativ entnommen, in ebenfalls sterile Behältnisse, befüllt mit 30 ml PBS/PS Lösung im Verhältnis 1:50, übergeben und dieser Studie vom Molekularbiologischen Forschungslabor der Orthopädie und Unfallchirurgie der Heinrich-Heine-Universität zur Verfügung gestellt wurde. Es handelte sich ausschließlich um Hüftgelenksersatz-Operationen, sogenannte Hüft-TEP Operationen, bei denen dem betroffenen Patienten, meist aufgrund von degenerativen Prozessen oder eines traumatischen Ereignisses, die eigene biologische Artikulation mit Hilfe alternativer Verfahren nicht erhalten werden konnte und durch ein künstliches Gelenk ersetzt werden musste (95). Im Normalfall würde das anfallende humane Knochenmaterial während dieses Eingriffs entsprechend entsorgt. Je nach Fragestellung und Krankheitsbild oder Infekt wird das Knochenmaterial zur histologischen Begutachtung und Bewertung dem Pathologen übergeben. Die Patienten wurden am Vortag der Operation im Anschluss an das ob ihr präoperative Vorgespräch befragt, sie intraoperativ anfallendes Knochenmaterial dem Molekularbiologischen Forschungslabor der Orthopädie und Unfallchirurgie der Heinrich-Heine-Universität zur nicht personenbezogenen Sammlung von Körpergewebe zur Erstellung einer Gewebe- und Zellbank für wissenschaftliche Zwecke zur Verfügung stellen wollen (Studiennummer: 3634), bei vorliegendem positivem Ethikvotum. Die Patienten willigten via einer vorgegebenen Einverständniserklärung (Anhang 1) ein oder lehnten entsprechend ab.

Die bereitgestellten Hüftköpfe wurden bis zu ihrer Verarbeitung binnen vierundzwanzig Stunden im Kühlschrank bei 4 °C im Transportbehältnis aufbewahrt. Die PBS/PS Lösung wurde bei Ankunft im Labor unmittelbar steril unter der Werkbank abgesaugt und durch eine adäquate Menge ossärer Nährlösung DMEM/F12+FCS+PS ersetzt.

Die Verarbeitung erfolgte unter bestmöglichen sterilen Bedingungen unter der Werkbank. Dabei wurde die Werkbank vor der Zerlegung des Knochenmaterials gereinigt und es wurden sterile Abdecktücher ausgelegt. Auf den sterilen Abdecktüchern wurden die benötigten, teils sterilen, teils autoklavierten Instrumente sowie Substanzen bereitgestellt. Dabei handelte es sich in der Regel um eine chirurgische Pinzette, ein Skalpell, eine oszillierende Säge, Biopsiestanzen und einen scharfen Löffel. Zur Verarbeitung wurden ein steriler OP-Kittel und sterile Handschuhe getragen. Die oszillierende Säge wurde in ein steriles Abdecktuch gewickelt. Das Sägeblatt und die Fixierschrauben des Blatts wurden zuvor in 70 % Alkohol gelagert und vor Gebrauch zusätzlich über dem Gasbrenner abgeflämmt. Der zu verarbeitende Hüftkopf wurde mittels Pinzette aus dem Behältnis entfernt und auf das Abdecktuch gelegt. Anschließend wurden grob mit dem scharfen Löffel Gewebereste entfernt und mit Hilfe der Biopsiestanzen (8 mm im Durchmesser, 1 cm Tiefe) so viele Biopsate gewonnen wie möglich. Diese wurden in PBS+PS (50:1) gewaschen und separat in eine 24-Well-Platte zu je einem Biopsat pro Well gegeben, welches zuvor mit 1 ml ossärem Nährmedium DMEM/F12+FCS+PS befüllt wurde. Daraufhin wurden circa 0,5 cm dicke Scheiben aus dem Hüftkopf zugeschnitten (Abbildung 13) und gründlich in einer mit PBS/PS (1:50) befüllten 550 ml Zellkulturflasche oder entsprechender Falconröhrchen mindestens viermal gewaschen. Die gewaschenen Knochenfragmente wurden in 50 ml Falconröhrchen gegeben, die zuvor mit 40 ml steril gefiltertem DMEM/F12+40 mg Kollagenose Typ IV befüllt worden war. Die Behältnisse wurden im Wasserschwenkbad bei 37 °C gestellt und für 2,5 h belassen. Alle 15 min wurde zusätzlich per Hand vertikal geschüttelt. Anschließend wurde der Überstand unter der Werkbank vorsichtig abgesaugt, in ein Falconröhrchen gegeben und bei 1500 U/min für 10 min in die Zentrifuge gestellt. Das Zellpellet wurde in 15 ml

DMEM/F12+FCS+PS resuspendiert, in eine beschriftete 175 cm² Zellkulturflasche überführt und zusammen mit der 24-Well-Platte zur Kultivierung in den Inkubator gestellt. Im Verlauf wurden die Zellen der Zellkulturflasche täglich auf Adhärenz unter dem Phasenkontrastmikroskop überprüft. Der Mediumwechsel erfolgte in der Regel alle 1-2 Tage je nach Farbumschlag und Zellumsatz.



Abbildung 13: Knochenscheiben aus dem Hüftkopf eines menschlichen Spenders in einem Nährmedium zur weiteren Verarbeitung und Gewinnung von Osteoblasten (Eigene Quelle).

3.2.7 Isolierung und Kultivierung speziell von humanen Osteozyten

Bei den Spendern 1 und 2 wurden die zugeschnittenen Knochenscheiben im Anschluss an das Resuspendieren des Zellpellets aus 3.2.3 in eine mit DMEM/F12+FCS+PS befüllte Petrischale gegeben und ebenfalls in den Inkubator gestellt. Laut Protokoll sollte nach 14–21 Tagen eine Emigration von Osteozyten erfolgen, die in dieser Studie jedoch nach zahlreichen phasenkontrastmikroskopischen Kontrollen ausblieb. Der mögliche Versuch der Kultivierung von Osteozyten wurde daher verworfen und nicht wiederholt.

3.2.8 Nachweis der Aktivität der alkalischen Phosphatase humaner Osteoblasten

Im Heilungsverlauf einer knöchernen Fraktur und in Phasen des Knochenwachstums kann ein Anstieg der alkalischen Phosphatase im Blut als Hinweis auf eine erhöhte Aktivität knochenbildender Osteoblasten nachgewiesen werden (96, 97).

In ihrer Differenzierung zu Osteozyten exprimieren Osteoblasten bei zunehmender Bildung einer knöchernen Matrix zunehmende Mengen alkalischer Phosphatase (Abbildung 14) (98).



Abbildung 14: Aktivierungskaskade der alkalischen Phosphatase (ALP) im Rahmen der Knochenbildung durch Osteoblasten (99).

Zur Quantifizierung der Exprimierung der alkalischen Phosphatase wurde nach dem vom Institut erstellten Assay vorgegangen. Im Blut müssen erhöhte Mengen alkalischer Phosphatase (ALP), Osteonektin, Osteopontin, Knochensialoprotein und Osteocalcin für eine stabile Osteogenese (Knochenbildung) und bei der Ossifikation nach Verletzung vorliegen (98, 100).

Auch wenn erhöhte Spiegel alkalischer Phosphatase im Blut unspezifisch in ihrer Aussagekraft sind (Leber, Bauchspeicheldrüse, Niere und unter anderem die Plazenta bilden ebenfalls nicht unerhebliche Mengen) (101, 102), so zeigt sie in dieser Studie in vitro gemessen eine Aktivität der unbehandelten und mit CAP behandelten Osteoblasten an.

Die alkalische Phosphatase ist ein Metalloenzym, das für seine katalytische Aktivität Metallionen benötigt (99).

Zur Quantifizierung wurde das Medium von den zu messenden Zellen abgenommen, nachdem die Zellen auf Raumtemperatur gebracht wurden. Die Zellen wurden je zweimal mit 1 ml PBS gewaschen. Es erfolgte die Abnahme der PBS-Mengen. Die Zellen wurden für 5–15 min mit 250 μ l einer 4-Nitrophenol-Solution überschichtet, mit Parafilm abgedeckt und für 15 min in den Brutschrank gestellt. Der Überstand wurde je in ein 1 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Je zweimal wurden 10 μ l in eine 96-Well-Platte überführt zur Doppelbestimmung, aus der der Mittelwert gebildet wurde. Zur vergleichbaren Mengenerfassung der alkalischen Phosphatase unter Umsetzung von p-Nitrophenylphosphat zu p-Nitrophenol und Phosphat (Abbildung 15) wurde ein Blank-Wert der 4-Nitrophenol-Solution bestimmt. Die Messung erfolgte im Victor unter dem gespeicherten "96-Well-Programm" bei 405 nm.



Abbildung 15: Umsetzung von p-Nitrophenylphosphat unter alkalischer Phosphatase zu p-Nitrophenol und Phosphat; Strukturformeln (93).

3.2.9 Alizarin Rot Assay und Rücklösung zum Nachweis der Ossifikation

Zur Quantifizierung der Mineralisation beziehungsweise als Nachweis der Bildung von humanem Knochengewebe durch die Aktivität der in dieser Studie verwendeten Osteoblasten wurde als Methode die Anfärbung mittels Alizarin-Rot-S verwendet. Alizarin ist ein Stoff aus der Gruppe der Anthrachinone und kommt in der Natur in den Wurzeln der Krapp-Pflanze vor (Abbildung 16) (103). Schon in der Antike wurde Alizarin zum Färben verwendet (104). Heute wird das Alizarin-S, das Natriumsalz der Alizarinsulfonsäure, synthetisch hergestellt. Im Labor findet es wie in dieser Arbeit Anwendung, um Calcium-Ionen nachzuweisen. Die durch Osteoblasten gebildete Knochenmatrix wird in diesem Fall leuchtend Rot angefärbt (105, 106).



Abbildung 16: Strukturformel von Alizarin (93)

Zunächst wurde die gebildete Knochenmatrix von in 24-Well-Platten ausgesäten Osteoblasten unter dem Mikroskop beurteilt, die als vergleichbarer Normverlauf (Kontrolle) nicht mit der DBD behandelt wurden. Anschließend erfolgte die Beurteilung von in 24-Well-Platten ausgesäten Osteoblasten, die mit der DBD nach verschiedenen Schemata behandelt wurden.

Behandelt wurden die Zellen mittels 250 µl PBS-Behandlungsmedium mit 13,5 kV bei 300 und 600 Hz zu je 1, 3 und 5 min Bestrahlungsdauer. Zusätzlich wurde nach der Behandlung der einen Hälfte der Platten die behandelte PBS-Lösung für 20 min im Brutschrank in der Zellkulturschale belassen und anschließend durch OM ersetzt. Die behandelte PBS-Lösung der anderen Hälfte der Platten wurde hingegen unmittelbar nach Bestrahlung durch OM ersetzt.

Das Anfärben erfolgte nach einem institutsinternen Protokoll angelehnt an Sheehan et al.. Zunächst wurde im Verhältnis 1:20 Alizarin-Rot-S in Aq. Dest. gelöst (0,05 g AR/10 ml Aq. Dest.). Die anzufärbenden Zellen wurden nach Abnahme des OM mit 1 ml PBS einmalig gewaschen und für 15 min mit 4%igem PFA in PBS bei Raumtemperatur im Well fixiert. Nach Abnahme der Lösung wurde das Well fünffach mit 1 ml Aq. Dest. gewaschen. Nun erfolgte die Zugabe von 1 ml/Well Alizarin-Rot-S-Lösung und die Inkubation für 20 min bei 37 °C, 5 % CO₂ im Brutschrank. Die übrigen nicht anzufärbenden Wells wurden während des gesamten Prozesses zum Schutz mit Parafilm verschlossen. Nun wurde die Färbelösung abgenommen und solange mit Aq. dest. gewaschen, bis eine vollständige Entfärbung zu sehen war. Die fixierten, angefärbten und gewaschenen Zellen wurden mit PBS beschichtet. Die Zellen wurden mit dem Mikroskop kontrolliert. Mit der Axiocam mono Mikroskopkamera wurden die Zellen fotografiert und die Fotos digital gespeichert.

Um eine Quantifizierung der angefärbten Knochenmatrix zu erhalten, wurde eine Rücklösung der Alizarin-Rot-Färbung durchgeführt. Hierfür wurde Cetylpyridiumchlorid in Aq. Dest. unter dem Abzug zur Herstellung einer 10%igen Cetylpyridiniumchlorid-Lösung (pH=7) für 90 min auf dem Rollenmischer gelöst. Die PBS-Lösung wurde vom Well abgenommen und durch die Cetylpyridiniumchlorid-Lösung ersetzt. Bei Raumtemperatur erfolgte die 1–2-stündige Inkubation bis zur vollständigen Entfärbung der Zellen. Der Überstand wurde in geeigneten Polystyrolküvetten im Eppendorf Biophotometer bei der Wellenlänge OD₆₀₀ gemessen. Als Blank wurde eine reine Menge der Cetylpyridiniumchlorid-Lösung photometrisch gemessen.

3.2.10 Das Behandlungsschema dieser Studie mit der DBD

In dieser Arbeit wurden Osteoblasten in vitro in einem Behandlungsmedium, einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS), mit einer direkten Plasmaquelle, die sich das Konzept der dielektrisch behinderten Entladung (DBE/DBD) zu eigen macht, behandelt (Abbildung 17).





Abbildung 17: Geräteaufbau der genutzten DBE-Anlage dieser Arbeit ohne Netzgerät. Zur Verfügung gestellt vom molekular-biologischen Labor. In Zusammenarbeit mit der Ruhr-Uni-Bochum (Eigene Darstellung).

Es wurden 25.000 Zellen/Well einer 24-Well-Platte in der ersten Plattenreihe ausgesät und mit 500 µl eines entsprechenden Differenzierungsmediums bedeckt. Die Behandlung erfolgte nach vollständiger Adhärenz der Zellen unter regelmäßigem Mediumswechsel. Die Einstellungen des DBD-Device wurden auf 13,5 kV und 300 Hz beziehungsweise 600 Hz gesetzt. Es erfolgten unmittelbar vor und nach der Behandlung Bildkontrollen mit dem Mikroskop und die Speicherung digitaler Bilder. Außerdem wurde zur Kontrolle und Normierung die Zellviabilität/der Zellstoffwechsel vor Behandlung an Tag 0 (d0) und an den Folgetagen in festen Abständen (zwischen d1 und d21) mittels CellTiter-Blue[®] Assay bestimmt.

Unmittelbar nach der Behandlung erfolgten zwei Ansätze bezüglich des Mediumswechsels. Um mögliche Effekte des Einflusses der Behandlung bezüglich der Einwirkdauer erfassen zu können, wurde zum einen eine Versuchsreihe mit Belassen des behandelten Mediums für 20 min im Brutschrank vorgenommen, zum anderen erfolgte das direkte Absaugen des Behandlungsmediums, welches durch frisches Differenzierungsmedium ersetzt wurde.

Äquivalente Behandlungsschemata erfolgten zur Erfassung möglicher Einflüsse auf die Exprimierung der alkalischen Phosphatase und auf die Bildung einer Knochenmatrix (Alizarin-Rot-Assay).

Außerdem wurde als Kontrolle je für die entsprechenden Testreihen eine Kontrollreihe ohne Behandlung mit dem DBD-Device verfolgt.

Nach Abnahme des Differenzierungsmediums wurde das zu behandelnde Well zweimal mit 500 µl frischer PBS gewaschen. Die anschließend aufgebrachte Menge des Behandlungsmediums (PBS) betrug 250 µl. Die DBD-Elektrode wurde so nah wie möglich an das Behandlungsmedium herangeführt, jedoch nicht unterhalb 1 mm und nicht weiter weg als 5 mm, da eine Zündung des Geräts sonst ausgeblieben wäre.

3.2.11 Die Chemilumineszenz-Methode zum Nachweis freigesetzter Radikale

Die Detektion von freigesetzten Nitrit- und Nitratmengen durch die DBD-Behandlung in PBS wurde mittels zweier Stickstoffmonoxid (NO) Analysatoren durchgeführt (eco physics, Schweiz). Das Stickstoffdioxid (NO₂), das durch die Reaktion von NO mit Ozon entsteht, gibt einen Teil seiner Energie als messbare Lichtquanten ab. Beide Analysatoren wurden separat für die Bestimmung eines Gases verwendet.

Mittels einer 10 µl Glasspritze (Hamilton) wurden während des Behandlungsschemas 5 µl der entnommenen Probe in einen Messzylinderkolben injiziert. Der Nitrit-Zylinderkolben wurde zuvor mit 20 ml Essig-Jod/Iodin-Lösung bei 65 °C befüllt (selbst hergestellt aus 780 mg Kaliumiodid, 240 mg Iodin und 100 ml 96%iger Essigsäure).

Parallel wurde ein zweiter Zylinderkolben für die Nitratmessung zuvor mit 15 ml Vanadiumchloridlösung bei 95 °C befüllt (selbst hergestellt aus 150 mg Chrom-Vanadiumchlorid und 15 ml 1-molarer Salzsäure). Nachgeschaltete Abfangzylinder wurden mit 1-molarer Natronlauge befüllt und im Eisbad positioniert. Die Eichung erfolgte im Vorfeld je mit einer 100 µM Eichlösung. Das abgefangene Gas wurde über das Schlauchsystem in die Analysatoren geleitet. Die Erwärmung erfolgte im Wasserbad.

Die Werte wurden mit Hilfe eines Excel-Makros im Computer in Form von Excel-Tabellen gespeichert. Zur Auswertung wurden die Messsignale mit Hilfe der Software Origin 8 analysiert und die jeweiligen Konzentrationen an Nitrit und Nitrat bestimmt.

3.2.12 Diffusionsmessung von Knochenstanzen in der Franz-Zelle

Um einen Ausblick darauf zu haben, wie sich eine mögliche in vivo Behandlung von Knochen auf das Gewebe im Sinne eines Durchdiffundierens auswirken kann, wurde der Versuch durchgeführt, die entnommenen 8 mm Knochenstanzen (3.2.6 Isolierung und Kultivierung speziell von humanen Osteoblasten und Knochenstanzen) im Ganzen in einer Franz-Diffusions-Zelle mit der DBD zu behandeln. Hierfür wurde das Stanzbiopsat in einen passenden Silikonring eingespannt. Dieser wurde in einen weiteren Silikonring eingespannt und in die obere Öffnung der Zelle dicht eingedrückt, mit der Knochenhaut nach außen und der Spongiosa nach unten. Der Knochenchip wurde so eingespannt, dass er circa 1 mm den Ring überragte. Lufteinschlüsse in Form von Blasen wurden mit einer sterilen Spritze abgesaugt, so dass der Chip mit dem PBS an der Unterkante luftfreien Kontakt zur Flüssigkeit hatte. In die Füllkammer der Zelle wurde ein Rührfisch eingebracht und die Zelle selbst bis zum Eichstrich mit 3 ml PBS befüllt. Die Franzzelle wurde stabil und gerade auf eine Magnetrührplatte gestellt und angeschaltet (Abbildung 18).



Abbildung 18: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung mit der Franz-Diffusions-Zelle. Ein Knochenchip wurde mit der Knochenhaut außen trocken mit dem DBD-Device über 30 min behandelt. Es erfolgten Nitrit-/Nitrat-Messungen alle 10 min in der CLD-Anlage bis 40 min post DBD. Entnahme der Proben (50 µl) über den Füllkammerhals. Die entnommenen Mengen wurden durch frisches PBS ersetzt (Eigene Darstellung).

Die Behandlung mit dem DBD-Device erfolgte über 30 min trocken. Alle 10 min wurde eine 50 µl Probe über den Füllkammerhals entnommen, wovon 5 µl mit einer Hamilton-Spritze zur Nitrit-/Nitrat-Messung in die CLD-Anlage überführt wurden. Äquivalente Mengen frischer PBS wurden wieder zugeführt. Die Messungen erfolgten bis 70 min, also bis 40 min post DBD.

3.2.13 Bilddokumentation mit Hilfe des Phasenkontrastmikroskops

Alle visuellen Kontrollen der Zellkulturen, alle fluoreszensmikroskopischen und alle mikroskopischen Arbeiten erfolgten mit dem Axiovert 40.

Die Erstellung digitaler Bilder erfolgte mit der Axiocam mono.

3.2.14 Nachweis des osteoblastenspezifischen Transkriptionsfaktors RUNX2

Der Runt-related Transkriptionsfaktor 2 (RUNX2), auch Cbfa1 genannt, ist ein Transkriptionsfaktor aus der RUNX-Gen-Familie, der essentiell für die Reifung von Osteoblasten und letztlich für die Bildung einer Knochenmatrix ist (107, 108). Versuche mit einem RUNX2-Knockout in Mäusen haben gezeigt, dass das Fehlen des Faktors zu einem postnatalen Tod bei respiratorischer Insuffizienz und einem vollständigen Fehlen der knöchernen Mineralisation führt (Abbildung 19) (109).



Abbildung 19: a) Maus-Wildtyp, b) RUNX2 Knockout Maus mit fehlender Mineralisation des Skelettsystems. Färbung mit Alcianblau: Knorpelgewebe und Alcianrot: Knochengewebe (109).

Eine erhöhte Exprimierung von RUNX2 in Kombination mit einer Krebserkrankung wie beispielsweise Lungen- und Brustkrebs zeigten darüber hinaus ein ungünstigeres Überleben im Verlauf der Erkrankung (110, 111).

RUNX2 wird in Mesenchymzellen und Osteoblastenvorläuferzellen exprimiert und in den weiteren Entwicklungsstufen über unreife Osteoblasten maximal hochgeregelt und in reifen Osteoblasten letztlich wieder heruntergeregelt (112-114). RUNX2 steht während der Proliferation und der Osteoblastendifferenzierung sowie Reifung mit weiteren Proteinen wie Hedgehog, Fgf, Wnt und Sp7 über Signalkaskaden in Verbindung (107, 115).

In dieser Arbeit erfolgte eine immunfluoreszenzmikroskopische Analyse zum Nachweis von RUNX2 nach laboreigenem Protokoll. Nach mikroskopischer Kontrolle der auf einem Glasplättchen in einem Well einer 24-Well-Platte ausgesäten Osteoblasten auf Adhärenz erfolgte die Fixierung der Zellen mit 4%igem Paraformaledhyd (PFA) für 10 min bei Raumtemperatur. Währenddessen erfolgte die Herstellung von 3 x 10 ml einer Triton (0,03 %) / PBS-Lösung je im 50 ml Röhrchen. Zum Blocken wurde BSA (3 %) zugegeben und die Wells mit einer Lösung für 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe des 1. Antikörpers (AK) und der Lösung in unterschiedlichen Verhältnissen wie in Tabelle 8 angegeben für 30 min bei 37 °C.

Mall	Verhältnis AK 1 RUNX2 rabbit /	Menge 1. AK	Menge 0,03% Triton / PBS
wen	(0,03%Triton/PBS Lösung)	in µl	Lösung in µl
1	/	/	1000
2	1:50	20	980
3	1:100	10	990
4	1:250	4	996
5	1:500	2	998

Tabelle 8:Verdünnungsverhältnis zur immunfluoreszenzmikroskopischen Analyse mit RUNX2Antikörper (AK) rabbit.

Anschließend wurden die Zellen auf Raumtemperatur gebracht. Nun erfolgte die Gabe des 2. AK FITC anti-rabbit zu je 1 µl im Verhältnis 1:1000 für 30 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Glasplättchen der Wells auf Objektträger

mit Dako/Dapi im Verhältnis 1:500 eingebettet. Alle Arbeiten erfolgten unter dem Abzug. Von den Färbungen wurden Bilder unter der Fluoreszenzmikroskopkamera aufgenommen.

3.3 Statistik und Auswertung

Nach statistischer Beratung in Kollaboration des *Institute of Systems Neuroscience*, dem *Institute of Neuroscience and Medicine* und dem *Forschungszentrum Jülich* durch die Heinrich-Heine-Universität erfolgte die Ausarbeitung des statistischen Anteils dieser Arbeit. Angewandt wurde der gepaarte t-Test zur Ermittlung der Signifikanz sowie die Berechnung der Standardabweichung und des arithmetischen Mittels (Mittelwerten) sowie des Median. Das Signifikanzniveau wurde standardmäßig bei α =.05 festgelegt. Als Maß für einen Effekt der signifikanten Ergebnisse erfolgte die Errechnung des Maßes des Effekts durch Cohen's Effektstärke *d* (116). Die Stärken des Effekts wurden mit *klein* bei Werten ab *d* ≥ 0.2, mit *mittel* ab *d* ≥ 0.5 und mit *groß* ab *d* ≥ 0.8 angegeben.

4 Ergebnisse

In dieser Arbeit sollte primär der Effekt von CAP auf humane Osteoblasten untersucht werden. Das Knochenmaterial wurde eigens aus dem OP nach Zustimmung seitens der Patienten nach Schenkelhalsfraktur im Rahmen einer HÜFT-Operation mit Einbringen einer Totalendoprothese abgeholt. Die Osteoblasten wurden aus diesen nach Protokoll (94) gewonnen.

Zunächst erfolgte die Kultivierung der Osteoblasten. Der Nachweis zur Typisierung wurde mittels Nachweises des osteoblastenspezifischen Transkriptionsfaktors RUNX2 erreicht. Parallel erfolgten die Messungen zur physiologischen Zellviabilität mittels CellTiter-Blue[®] Assay. Diesen Messungen schlossen sich der Nachweis der Bildung von Knochenmatrix durch die Osteoblasten (Alizarin-Rot-Assay) und die Quantifizierung der exprimierten alkalischen Phosphatase an. Demgegenüber standen die festgelegten Behandlungsschemata mit der DBD, um die Effekte durch CAP auf humane Osteoblasten vergleichen zu können.

Da bereits gezeigt werden konnte, dass reaktive Stickstoffspezies (RNS) zytotoxisch sein, aber auch Krebszellen schädigen können (22, 117, 118), wurden die Mengen Nitrit und Nitrat mit Hilfe der CLD-Methode über die Zeit ermittelt, die durch die Behandlung an PBS unter verschiedenen Geräteeinstellungen entstehen.

Um eine Vorstellung von Effekten auf humanes Knochengewebe in vivo erhalten zu können, wurden ganze Knochenchipsbiopsate (8 mm Durchmesser, 1 cm Tiefe) aus den Hüftköpfen gewonnen und ebenfalls in ihrer Viabilität untersucht. Außerdem wurde in der Franzzelle untersucht, ob und in welchen Mengen Nitrit und Nitrat durch den Chip hindurchdiffundieren.

4.1 Zellkultivierung von Osteoblasten und ihre Zellviabilität über die Zeit

Die kultivierten Osteoblasten waren in ihrer Form sehr variabel, zeigten sich jedoch hauptsächlich länglich parallel organisiert und gezogen. Von ihrer Morphologie ähneln sie Fibroblasten (119). Sie bildeten zügig einen dichten Zellrasen und hielten teils überlappenden Zell-Zell-Kontakt. Mit fortschreitender Zeit änderte sich die Morphologie der Zellen, die ab dem 14. Tag gröber erschienen und flächig sichtbar eine Knochenmatrix ausbildeten, die bis zum beobachteten 21. Tag dichter wurde, während in den ersten 7 Tagen nur vereinzelt kleinere Knocheninseln gesichtet werden konnten. Studien haben gezeigt, dass bis zu 20 % der Osteoblasten im menschlichen Körper zu den nicht mehr teilungsfähigen Osteozyten ausdifferenzieren

(120), während sie von ihrer eigens exprimierten Matrix eingemauert werden. Osteozyten steuern zwar noch Signalwege, verfügen jedoch nicht mehr über den Stoffwechsel ihrer Vorläufer.

Abbildung 20 zeigt den zeitlichen Verlauf der zunehmenden knochenbildenden Organisation von Osteoblasten.



Abbildung 20: Mikroskopaufnahmen von humanen Osteoblasten bei 10facher Vergrößerung. Die anfängliche lockere, vornehmlich länglich konfigurierte Organisation (Tag 1) nach Aussaat im Osteomedium (DMEM/F12) **a)** geht über in eine zunehmend organisierte Zelldichte (Tag 5) **b)**. Schließlich erfolgt die Bildung einer dichten Knochenmatrix nach 1 bis 2 Wochen **c)**, hier mit Nachweis durch Alizarin-Rot-Färbung.

Bezüglich der Zellviabilität mittels CellTiter-Blue[®] Assay wurde zunächst der physiologische Zellstoffwechsel in vitro festgehalten. Dabei wird der Farbstoff Resazurin zum Resorufin über eine Reduktase nur von lebenden Zellen umgesetzt. Der Unterschied ist im Plattenphotometer messbar. Abbildung 21 zeigt über 21 Tage einen steten Anstieg des Metabolismus der Zellen.



Abbildung 21: Unbehandelte Kontrolle. Physiologische Zellviabilität der Osteoblasten in vitro, mittels CellTiter-Blue[®] Assay über 21 Tage. Messungen an den Tagen 0, 3, 7 und 21. Differenzierungsmedium DMEM/F12. (n=8; nach Zelladhärenz; auf d0 normiert)

Demgegenüber stehen die Messungen des Osteoblastenmetabolismus mittels CellTiter-Blue[®] Assay nach Behandlung mit CAP durch die DBD. Es wurde mit zwei unterschiedlichen Geräteeinstellungen (13,5 kV und 300 Hz bzw. 600 Hz) und wiederum zwei unterschiedlichen post-DBD-Konzepten behandelt, so dass vier Behandlungsgruppen mit je drei unterschiedlichen Behandlungszeiten, 1 min, 3 min und 5 min festgelegt wurden. Behandelt wurde in 250 µl PBS/Well. Beobachtet und gemessen wurde über 21 Tage. Die post-DBD Konzepte beinhalteten zum einen das direkte Absaugen des behandelten PBS und zum anderen das Belassen für 20 min im Brutschrank mit anschließendem Absaugen.

Hierdurch sollte beobachtet werden, ob die gelösten Spezies (u.a. ROS und RNS) für weitere 20 min einen zusätzlichen Effekt auf die Zellen zeigen. Nach der Behandlung wurde frisches DMEM/F12 Medium auf die Zellen gegeben. Diese kamen anschließend zurück in den Brutschrank.

Abbildung 22 zeigt die Behandlung von Osteoblasten mit CAP mit den oben beschriebenen DBD-Einstellungen und Konzepten.



Abbildung 22: Zellviabilität der einmalig über 1, 3 und 5 min behandelten Osteoblasten mittels CellTiter-Blue[®] Assay über 21 Tage nach Behandlung bei **a**) 13,5 kV und 300 Hz und **b**) 600 Hz mit direktem Absaugen des behandelten Mediums (PBS) sowie **c**) 300 Hz und **d**) 600 Hz mit Belassen des behandelten Mediums für 20 min im Brutschrank. Anschließend Aufbringen von frischem DMEM/F12. (n=5; auf d0 (unbehandelte Kontrolle) normiert); */** zeigt an, dass die Werte entsprechend signifikant zu Abbildung 21 oder interexperimentell sind (α = .05, * = p < .05, ** = p < .01)

Die unbehandelten Zellen (Abbildung 21) zeigten einen nahezu linearen Anstieg der Viabilität über die beobachteten 21 Tage. Nach Tag 7 war ein durchschnittlicher Zuwachs um 72 % zu verzeichnen, nach 21 d waren es schon 105 % und der Ausgangswert hatte sich hier mehr als verdoppelt Tabelle 9 A.

Tabelle 9 B zeigt demgegenüber das Konzept des direkten Mediumwechsels bei 300 Hz. Im Vergleich zur Kontrolle gab es hier keine signifikanten Ergebnisse und somit auch keine Effektstärke. Die Viabilität sinkt mit zunehmender Behandlungsdauer und ist bei der längsten Behandlungsdauer von 5 min am niedrigsten. An Tag 21 bei 5 min fällt die Wachstumsrate durchschnittlich um 58 % niedriger aus im Vergleich zu Tag 21 bei 1 min, was ein signifikantes Ergebnis (*p*=.031) mit mittlerer Effektstärke (*d*=0.72) darstellt.

Tabelle 9 C zeigt bei gleichem Konzept, jedoch bei 600 Hz an Tag 7 nach 3 und 5 min Behandlungsdauer signifikant niedrigere Ergebnisse gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Der Effekt d ist nach Cohen nach 3 min als mittel und nach 5 min als stark zu werten. Die Viabilität der Osteoblasten war hier mit zunehmender Behandlungsdauer zunehmend reduziert, was sich jedoch nach 21 Tagen wieder relativierte. Die Ergebnisse waren dann wiederum nicht mehr signifikant. Die Zuwachsrate fiel bei 1 min gegenüber 5 min Behandlungsdauer an Tag 21 durchschnittlich um 88 % niedriger aus. Auch hier ist der Unterschied von 1 min gegenüber 5 min Behandlungsdauer signifikant (p=.024), der Effekt ist klein (d=0.43). Tabelle 9 D zeigt im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bei 300 Hz und zweitem Konzept nach der Behandlung durchweg niedrigere Werte, auch im Vergleich zum anderen Konzept bei gleicher Frequenz. Die Ergebnisse sind bei 1 und 5 min Behandlungszeit sowohl an Tag 7 und an Tag 21 gegenüber der unbehandelten Kontrolle signifikant. Die Effektgröße ist jeweils groß. Nach 5 min Behandlungszeit konnten die Zellen auch an Tag 21 den Ausgangswert nicht wiederherstellen und behielten ein Defizit von 7 %. Mit zunehmender Behandlungsdauer sind die Ergebnisse hier an Tag 21 nach 1 min gegenüber 5 min signifikant höher (p=.027) bei mittlerer Effektgröße (d=0.58).

Der Unterschied beider Behandlungskonzepte war bei 300 Hz, gegenübergestellt, an Tag 7 nach 1 (p=.044) und 5 min (p=.031) sowie an Tag 21 nach 1 min (p=.046) signifikant bei kleiner (d=0.34), kleiner (d=0.25) und großer Effektstärke (d=0.97). Die Unterschiede bei 5 min nach 21 d waren nicht signifikant. Zumal die langen Behandlungszeiten von 5 min generell für niedrige Zuwachsraten zu sorgen scheinen. Ähnliches lässt sich beim 2. Konzept bei 600 Hz beobachten. Tabelle 9 E zeigt diesbezüglich die ermittelten durchweg signifikant niedrigeren Zuwachsraten. Bis auf Tag 7 nach 5 min Behandlung (mittlerer Effekt) war die Effektstärke hier groß. Die Wachstumsraten sind hierunter insgesamt niedrig. Ein signifikanter Unterschied innerhalb der Gruppe wie bei den oben aufgeführten anderen Behandlungsgruppen zeigt sich mit zunehmender Behandlungsdauer nicht mehr. Gegenübergestellt zeigen beide Konzepte bei 600 Hz an Tag 7 (p=.032; d=0.55 mittel) und 21 (p=.024; d=0.43 klein) nach 1 min signifikante Ergebnisse, nach 5 min nicht.

Tabelle 9: Durchschnittlicher Zuwachs der Viabilität in % nach Tag 7 und 21 der **A** unbehandelten Kontrolle und der einmalig mit 1, 3 und 5 min behandelten Zellen bei 13,5 kV und direktem Mediumwechsel bei **B** 300 Hz bzw. **C** 600 Hz sowie Belassen des behandelten PBS für 20 min auf den Osteoblasten bei **D** 300 Hz bzw. **E** 600 Hz. (*/**) zeigt an, dass die Ergebnisse gegenüber den unbehandelten Osteoblasten signifikant sind ($\alpha = .05$, * = p < .05, ** = p < .01). Die Effektstärke *d* der signifikanten Ergebnisse wurde nach Cohen (116) bestimmt.

A	Behandlungsdauer	Tag	Ø Zuwachs der Viabilität in %	Effektstärke d=
	0 min	7	72	
	0 11111	21	105	
B	Behandlungsdauer	Tag	Ø Zuwachs der Viabilität in %	Effektstärke d=
	1 min	7	14	
	1 111111	21	88	
	3 min	7	8	
	0 11111	21	54	
	5 min	7	-3	
	5 11111	21	30	
C	Behandlungsdauer	Tag	Ø Zuwachs der Viabilität in %	Effektstärke d=
	1 min	7	7	
	1 11111	21	162	
	3 min	7	28 (*)	mittel
-		21	160	
	5 min	7	1 (*)	groß
		21	74	
_				
D	Behandlungsdauer	Tag	Ø Zuwachs der Viabilität in %	Effektstärke d=
	1 min	7	-12 (*)	groß
	1 11001	21	13 (**)	groß
	3 min	7	-8	
-	5 11111	21	18	
	5 min	7	-20 (*)	groß
	5 11111	21	-7 (**)	groß
E	Behandlungsdauer	Tag	Ø Zuwachs der Viabilität in %	Effektstärke d=
	1 min	7	-12 (*)	groß
	1 11111	21	17 (**)	groß
	2 min	7	-9 (**)	groß
	3 11111	21	23 (*)	groß
	5 min	7	13 (*)	mittel
	5 11111	21	9 (**)	groß

Inwiefern ein mit CAP in vivo behandelter humaner Knochen beeinflusst wird und welche Effekte zu erwarten wären, lässt sich übertragen nur schwer abschätzen. Um

sich dem anzunähern, wurden bei der Knochenverarbeitung rundliche (d=8 mm) Knochenbiopsate mit einer Tiefe von 1 cm und einem durchschnittlichen Gewicht von 0,23 g steril aus den Hüftköpfen entnommen und mit CAP behandelt. Abbildung 23 zeigt eine unbehandelte und zwei mit der DBD behandelte Knochenchipsreihen bei 13,5 kV und 600 Hz über 0 (Kontrolle), 60 und 150 s, weil in Abbildung 22 gezeigt wurde, dass es sich hierbei um die dafür geeignetste Einstellung handelte. Gemessen wurde über Zeitraum 31 Behandlung. einen von Tagen nach Der Osteoblastenmetabolismus in den Knochenchips steigt sowohl unbehandelt als auch behandelt stetig bis auf ein Vielfaches der Kontrolle (d0 vor Behandlung) an. Wobei die mit 150 s behandelten Chips eine größere Bandbreite/Streuung als die unbehandelten und die mit 60 s behandelten Chips zeigen.



Abbildung 23: Zellviabilität der unbehandelten Kontrollreihe (0 s) im Differenzierungsmedium und mit der DBD bei 13,5 kV und 600 Hz einmalig über 60 und 150 s behandelten Knochenchips (d=8 mm, 1 cm Tiefe) mittels CellTiter-Blue[®] Assay über 31 Tage. Behandelt wurde in PBS. Anschließend direktes Absaugen des behandelten Mediums. Frisches Medium (DMEM/F12) wurde aufgebracht (n=4; auf d0 (unbehandelte Kontrolle) normiert), * zeigt an, dass die Ergebnisse gegenüber den unbehandelten Knochenchips signifikant sind (α = .05, * = p < .05)

4.2 Der osteoblastenspezifische Transkriptionsfaktor RUNX2

Der Transkriptionsfaktor RUNX2 ist spezifisch für die Ausbildung einer Knochenmatrix durch Osteoblasten. Er sollte in dieser Arbeit als Beweis für die erfolgreiche Gewinnung von Osteoblasten selbst dienen. Nach Durchführung des Protokolls zeigt eine grünlich fluoreszierende Färbung erfolgreich an, dass es sich um Osteoblasten handelt. Eine erfolgreiche Kontrolle wurde ebenfalls durchgeführt. Auch eine Negativkontrolle mit Keratinozyten (Tabelle 5), die als freundliche Spende der parallel geführten Arbeitsgruppe (121) zur Verfügung gestellt wurden, zeigte wie die Kontrolle keine RUNX2-spezifische Anfärbung.

Abbildung 24 zeigt den erfolgreichen Nachweis des Transkriptionsfaktors RUNX2 in unbehandelten Zellen nach Differenzierung.



Abbildung 24: A) 2 Nachweise des osteoblastenspezifischen RUNX2-Transkriptionsfaktors links (grün) unter dem Immunfluoreszenzmikroskop bei 40facher Vergrößerung. (1. AK RUNX2 rabbit, 2. AK FITC (Fluoresceinisothiocyanat) anti-rabbit); Verdünnungsverhältnis 1. AK 1:500, 2. AK 1:1000. Zellkernspezifische Anfärbung mittels DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) rechts (blau). **B)** Kontrolle. (Spender 4)

4.3 Knochenmatrixbildung und Messung mittels Alizarin-Rot-Assay

Die Bildung der Knochenmatrix durch die Osteoblasten wurde über einen Zeitraum von 3 Wochen beobachtet. Zunächst erfolgte die Quantifizierung ohne eine Behandlung mit dem DBD-Device.

Es erfolgten mikroskopische Aufnahmen nach der Anfärbung mittels Alizarin-Rot zur visuellen Darstellung der gebildeten Knochenmatrix, bevor eine Rücklösung vorgenommen wurde. Abbildung 26 zeigt die mikroskopischen Kontrollaufnahmen über den zeitlichen, physiologischen Verlauf der unbehandelten Zellen. Während bis Tag 7 nur vereinzelte kleine knöcherne Inseln zu sehen sind, zeigt Tag 14 und 21 eine kräftige rote Knochenmatrix. Das lässt im Gegensatz zu den ersten 7 Tagen eine größere Dynamik in der Rücklösung an Tag 14 und noch deutlicher an Tag 21 erwarten.



Abbildung 25: Darstellung des physiologischen, zeitlichen Verlaufs der Bildung von Knochenmatrix durch Osteoblasten mit dem Alizarin-Rot-Assay. Die Aufnahmen erfolgten an a) d0, b) d1, c) d3, d) d7, e) d14 und f) d21. Die Zellen wurden nicht mit dem DBD-Device behandelt. Medium: DMEM/F12. Vergrößerung 10fach. Spender 3.

Abbildung 26 zeigt über die ersten 7 Tage einen verhältnismäßig flachen Anstieg der quantifizierten Rücklösung nach Alizarin-Rot-Färbung. An Tag 14 gibt es einen

mäßigen Anstieg, der sich in einen steilen Anstieg an Tag 21 fortsetzt. Die Dynamik passt zu der deutlichen Rotfärbung an Tag 14 und Tag 21 aus Abbildung 20.



Abbildung 26: Unbehandelte Kontrolle. OD600 nach Rücklösung der vorgenommenen Alizarin-Rot-S-Färbung der ausgesäten Osteoblasten (25.000/Well) in Wells einer 24-Well-Platte nach 0, 1, 3, 7, 14 und 21 Tagen zur graphischen Darstellung der von den Osteoblasten gebildeten Mengen von Knochengewebe. Es erfolgte ein regelmäßiger Wechsel des Mediums DMEM/F12. Die exprimierten Mengen wurden in Relation zu d0 gesetzt (n=6; auf d0 normiert)

Es folgten Rücklösungen und Kontrollaufnahmen nach den festgelegten Behandlungsschemata mit dem DBD-Device zur Erfassung möglicher Effekte von CAP auf die Bildung der Knochenmatrix der Osteoblasten.

Die Behandlung mit der DBD wurde hier mit zwei unterschiedlichen Geräteeinstellungen (13,5 kV und 300 Hz bzw. 600 Hz) und wiederum zwei unterschiedlichen post-DBD-Konzepten durchgeführt, so dass vier Behandlungsgruppen mit je drei unterschiedlichen Behandlungszeiten, 1 min, 3 min und 5 min festgelegt wurden. Da in der unbehandelten Versuchsreihe in der 1. Woche wenig Dynamik beobachtet wurde, wurde Tag 3 nicht mehr erfasst. Behandelt wurde in 250 µl PBS/Well. Die post-DBD Konzepte beinhalteten zum einen das direkte Absaugen des behandelten PBS und zum anderen das Belassen für 20 min im Brutschrank mit anschließendem Absaugen. Hierdurch sollte beobachtet werden, ob die gelösten Spezies (u.a. ROS und RNS) für weitere 20 min einen zusätzlichen Effekt auf die Zellen zeigen. Nach der Behandlung wurde frisches DMEM/F12 Medium auf die Zellen gegeben. Diese kamen anschließend zurück in den Brutschrank.

Abbildung 27 zeigt die Mikroskopkontrollaufnahmen über den zeitlichen Verlauf nach Behandlung bei 13,5 kV, 300 Hz und den beiden post-DBD-Konzepten (Gruppe A mit direktem Absaugen, Gruppe B für 20 min in den Brutschrank).



5 min

Abbildung 27: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Bildung von Knochenmatrix der Osteoblasten mit dem Alizarin-Rot-Assay nach Behandlung mit der DBD bei 13,5 kV und 300 Hz über 1, 3 und 5 min. Behandelt wurde in PBS. Gruppe A zeigt das Konzept mit direktem Mediumwechsel und Gruppe B zeigt das Konzept mit Belassen über 20 min im BS. Die Aufnahmen erfolgten an Tag 1, 7, 14 und 21 in alphabetischer Reihenfolge a) - x). Vergrößerung 10fach. Spender 3

Die Zellen scheinen nach der Behandlung bis Tag 21 nur wenig Knochenmatrix auszubilden. Diese Beobachtung scheint sich mit zunehmender Behandlungsdauer zu verstärken. Nach 5 min Behandlungsdauer weisen die Zellen bei beiden Konzepten keinen zusammenhängenden Zellrasen mehr auf. Wobei in Gruppe B der visuelle Eindruck entsteht, dass im Vergleich zu Gruppe A noch einmal weniger Knochenmatrix gebildet wurde.

Ähnlich sieht es bei 600 Hz aus, wie in Abbildung 28 zu sehen.



5 min

5 min

Abbildung 28: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Bildung von Knochenmatrix der Osteoblasten mit dem Alizarin-Rot-Assay nach Behandlung mit der DBD bei 13,5 kV und 600 Hz über 1, 3 und 5 min. Behandelt wurde in PBS. Gruppe **A** zeigt das Konzept mit direktem Absaugen und Gruppe **B** zeigt das Konzept mit Belassen über 20 min im BS. Die Aufnahmen erfolgten an Tag 1, 7, 14 und 21 in alphabetischer Reihenfolge **a**) - **x**). Vergrößerung 10fach. Spender 4

Im Vergleich scheint es, dass noch einmal weniger Knochenmatrix ausgebildet wurde. Einzig an Tag 21 nach 1 min in Gruppe A ist eine kleine angefärbte knöcherne Insel zu sehen. An Tag 21 nach 5 min in Gruppe B sind kaum mehr zusammenhängende Zellverbände ersichtlich. Abbildung 29 zeigt die quantifizierten Mengen der Rücklösung nach Alizarin-Rot-Färbung bei 13,5 kV, 300 Hz und dem direkten Absaugen des behandelten Mediums mit einer Behandlungsdauer von 1 min, 3 min, und 5 min über 21 Tage. Die Zellen, die über 1 min behandelt wurden, zeigen über den zeitlichen Verlauf einen sehr geringen Anstieg der Rücklösung bis Tag 7. An Tag 14 zeigt sich hier ein geringer Abfall mit dann mäßigem Anstieg an Tag 21. Bei längeren Behandlungszeiten von 3 min und 5 min steigen die Werte insgesamt nur wenig bis Tag 21 an. Die quantifizierten Mengen spiegeln den gewonnenen Eindruck der mikroskopischen Aufnahmen wider.



Abbildung 29: OD600 nach Rücklösung der Alizarin-Rot-S-Färbung der ausgesäten Osteoblasten (25.000/Well) in Wells einer 24-Well-Platte nach 0 (unbehandelte Kontrolle), 1, 7, 14 und 21 Tagen (nach Behandlung) zur graphischen Darstellung der von den Osteoblasten gebildeten Mengen von Knochengewebe. Die Zellen wurden bei 13,5 kV und 300 Hz 1, 3 und 5 min mit CAP behandelt. Das behandelte PBS wurde direkt von den Zellen abgesaugt. Frisches DMEM/F12 wurde aufgetragen. Die exprimierten Mengen wurden in Relation zur Kontrolle gesetzt (n=5; auf d0 normiert)

Im Gegensatz zu Abbildung 27 zeigt Abbildung 30 bei einem Konzeptwechsel mit 20 min längerem Belassen der behandelten PBS-Lösung auf den Zellen insgesamt rückläufige Werte mit insgesamt niedrigen Werten in allen Behandlungszeiten.



Abbildung 30: OD600 nach Rücklösung der Alizarin-Rot-S-Färbung der ausgesäten Osteoblasten (25.000/Well) in Wells einer 24-Well-Platte nach 0 (unbehandelte Kontrolle), 1, 7, 14 und 21 Tagen (nach Behandlung) zur graphischen Darstellung der von den Osteoblasten gebildeten Mengen von Knochengewebe. Die Zellen wurden bei 13,5 kV und 300 Hz 1, 3 und 5 min mit CAP behandelt. Das behandelte PBS wurde für 20 min auf den Zellen im BS belassen und anschließend durch frisches DMEM/F12 ersetzt. Die exprimierten Mengen wurden in Relation zu d0 gesetzt (n=5; auf d0 normiert), * zeigt an, dass die Ergebnisse der Rücklösung gegenüber den unbehandelten Osteoblasten signifikant sind ($\alpha = .05$, * = p < .05)

Eine Steigerung auf 600 Hz bei direktem Absaugen des behandelten PBS zeigt noch einmal fallende Werte bezüglich der Alizarin-Rot-Rücklösung im Vergleich zu Abbildung 30. Zu sehen in Abbildung 31.



Abbildung 31: OD600 nach Rücklösung der Alizarin-Rot-S-Färbung der ausgesäten Osteoblasten (25.000/Well) in Wells einer 24-Well-Platte nach 0 (unbehandelte Kontrolle), 1, 7, 14 und 21 Tagen (nach Behandlung) zur graphischen Darstellung der von den Osteoblasten gebildeten Mengen von Knochengewebe. Die Zellen wurden bei 13,5 kV und 600 Hz 1, 3 und 5 min mit CAP behandelt. Anschließend erfolgte der direkte MW. Frisches DMEM/F12 wurde aufgetragen. Die exprimierten Mengen wurden in Relation zu d0 gesetzt (n=5; auf d0 normiert), * zeigt an, dass die Ergebnisse der Rücklösung gegenüber den unbehandelten Osteoblasten signifikant sind ($\alpha = .05$, * = p < .05)

Der Konzeptwechsel bei 600 Hz auf Belassen der behandelten PBS-Lösung für 20 min auf den Zellen im Brutschrank zeigt ähnlich niedrige Werte (Abbildung 32). Insgesamt bestätigt sich der gewonnene Eindruck aus den Bildern in Abbildung 27 und Abbildung 28.



Abbildung 32: OD600 nach Rücklösung der vorgenommenen Alizarin-Rot-S-Färbung der ausgesäten Osteoblasten (25.000/Well) im Well einer 24-Well-Platte nach 0 (unbehandelte Kontrolle), 1, 7, 14 und 21 Tagen (nach Behandlung) zur graphischen Darstellung der von den Osteoblasten gebildeten Mengen von Knochengewebe. Die Zellen wurden bei 13,5 kV und 600 Hz 1, 3 und 5 min mit CAP behandelt. Das behandelte PBS wurde für 20 min auf den Zellen post DBD im Brutschrank belassen und anschließend durch frisches DMEM/F12 ersetzt. Es erfolgte ein regelmäßiger Wechsel. Die exprimierten Mengen wurden in Relation zu d0 gesetzt (n=5; auf d0 normiert), * zeigt an, dass die Ergebnisse der Rücklösung gegenüber den unbehandelten Osteoblasten signifikant sind (α = .05, * = p < .05)

Die Unterschiede innerhalb der Behandlungskonzepte in Bezug auf die Behandlungsdauer von 1 min im Vergleich zu 5 min zeigten keine signifikanten Änderungen.

Die Messungen der Rücklösungen der AR-Färbung hatten bei der unbehandelten Kontrolle eine durchschnittliche Steigerung an Tag 7 zu Tag 0 von 88 % und an Tag 21 waren es 3691 % im Vergleich zum Ausgangswert.

Bei 300 Hz und direktem Mediumwechsel (Tabelle 10 B) zeigten sich an Tag 7 im Vergleich zu den unbehandelten Zellen bei 1, 3 und 5 min Behandlungsdauer durchschnittlich höhere Werte. An Tag 21 gab es noch einmal nicht signifikante mäßige Steigerungen dieser Werte. Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen fielen diese Werte jedoch deutlich niedriger aus. Auch mit zunehmender Behandlungsdauer nahmen die Werte ab.

Ähnlich bei 300 Hz und zweitem Konzept sowie bei beiden Konzepten bei 600 Hz, hier zeigten sich an Tag 21, bis auf 5 min Behandlungsdauer bei 300 Hz, durchweg signifikant niedrigere Ergebnisse im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Effekte waren hier stets groß.

Tabelle 10: Durchschnittlicher Anstieg der AR-Rücklösungen in % der **A** unbehandelten Kontrolle und bei 13,5 kV und **B** 300 Hz + MW, **C** 300 Hz + 20 min im BS, **D** 600 Hz + MW und **E** 600 Hz + 20 min im BS behandelten humanen Osteoblasten nach 1, 3 und 5 min. Messung nach 7 d und 21 d. (*) zeigt an, dass die Ergebnisse gegenüber den unbehandelten Osteoblasten signifikant sind (p=.05). Die Effektstärke *d* der signifikanten Ergebnisse wurde nach Cohen (116) bestimmt. (+) zeigt an, dass der Anstieg an Tag 7 größer, (-), dass er niedriger ausfiel im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle.

Α	Behandlungsdauer	Tag	Ø Anstieg der AR-Rücklösung in %	Effektstärke d=
	0	7	88	
	0 min	21	2791	
В	Behandlungsdauer	Tag	Ø Anstieg der AR-Rücklösung in %	Effektstärke d=
	1 min	7 (+)	254	
		21	783	
	2 min	7 (+)	153	
	5 11111	21	422	
	5 min	7 (+)	245	
		21	346	
С	Behandlungsdauer	Tag	Ø Anstieg der AR-Rücklösung in %	Effektstärke d=
ĺ	1 min	7 (+)	226	
		21	289 (*)	groß
	3 min	7 (+)	198	
-		21	191 (*)	aroß
	F units	7 (+)	251	
	5 min	21	440	
D	Behandlungsdauer	Tag	Ø Anstieg der AR-Rücklösung in %	Effektstärke d=
	1 min	7 (-)	70	
		21	220 (*)	groß
	3 min	7 (-)	71	-
		21	192 (*)	groß
	E win	7 (+)	163	
	o min	21	62 (*)	groß
			•	
Е	Behandlungsdauer	Tag	Ø Anstieg der AR-Rücklösung in %	Effektstärke d=
	1	7 (-)	51	
	1 min	21	262 (*)	groß
	2 main	7 (+)	101	
	3 min	21	128 (*)	groß
	E min	7 (+)	220	<u> </u>
	5 min	21	143 (*)	groß

Die rundliche Aussparung in Abbildung 33 zentral entspricht dem Bereich, auf den die DBD-Sonde direkt gewirkt hat. Der Bereich imponiert wie ein Brandloch. Die noch

vorhandenen Osteoblasten im Zentrum scheinen einer Knochenbildung wie im Randbereich nicht nachzukommen.



Abbildung 33: Ausbildung einer mittels Alizarin-Rot-Anfärbung sichtbar gemachten Knochenmatrix, gebildet durch Osteoblasten am 14. Tag nach der Behandlung mit CAP. Das nur spärlich mit einzelnen Osteoblasten durchsetzte Zentrum entspricht in etwa dem kreisrunden Behandlungsradius durch die direkte Einwirkung der DBD-Sonde. Die Ausbildung einer Knochenmatrix im Vergleich zum Randwall scheint erschwert. Vergrößerung 10fach

4.4 Nachweis und Dynamik der alkalischen Phosphatase über den Verlauf

Während der Knochenheilung oder der Bildung einer Knochenmatrix durch Osteoblasten spielt das Vorhandensein der alkalischen Phosphatase eine wichtige Rolle. Auch wenn sie in vielen anderen Geweben ebenfalls sezerniert wird, so wäre sie in dieser Arbeit ein Hinweis darauf, dass die Osteoblasten versuchen, eine Knochenmatrix aufzubauen.

Abbildung 34 zeigt den physiologischen Verlauf der exprimierten alkalischen Phosphatase durch die Osteoblasten in vitro über 21 Tage an. Die Zellen sind nicht mit CAP behandelt worden. Zunächst zeigt sich ein geringer bis mäßiger Anstieg der alkalischen Phosphatase und steigert sich an Tag 14 und 21 deutlich auf ein Vielfaches. In Anbetracht der graphischen Darstellung der Alizarin-Rot-Rücklösung unbehandelter Zellen (Abbildung 26) deckt sich die Beobachtung mit dem dortigen Anstieg.



Abbildung 34: Unbehandelte Kontrolle. OD₄₀₅ Quantifizierung der exprimierten Mengen alkalischer Phosphatase durch die ausgesäten Osteoblasten (25.000/Well) im Well einer 24-Well-Platte nach 1, 3, 7, 14 und 21 Tagen mittels alkalische-Phosphatase-Assay. Die Zellen wurden nicht mit dem DBD-Device behandelt. Es erfolgte ein regelmäßiger Wechsel des Differentierungsmediums (DMEM/F12). Die exprimierten Mengen wurden in Relation zu d0 gesetzt (n=6; auf d0 normiert)

Als Nullkontrolle wurde über 7 Tage dasselbe Protokoll an den Keratinozyten aus der Parallelarbeitsgruppe angewandt. Über die 7 Tage ist kein Anstieg der Exprimierung erkennbar (Abbildung 35).



Abbildung 35: Nullkontrolle der Messung einer möglichen Exprimierung von alkalischer Phosphatase durch unbehandelte Keratinozyten (parallel geführte Arbeitsgruppe) über 7 Tage. (n=1; auf d0 normiert)

Es folgten die Behandlungen mit CAP zur Erfassung von Effekten auf die Exprimierung der alkalischen Phosphatase der Osteoblasten. Das Behandlungsschema wurde äquivalent zum Schema des Alizarin-Rot-Assay (Kapitel 4.3) durchgeführt.



Abbildung 36: OD₄₀₅ Quantifizierung der exprimierten alkalischen Phosphatase über einen zeitlichen Verlauf von 21 Tagen (d0=unbehandelte Kontrolle) nach Behandlung mit CAP durch die DBD bei 13,5 kV a) 300 Hz und direktes Absaugen, b) 300 Hz und 20 min Belassen des behandelten Mediums. c) 600 Hz und direktes Absaugen und d) 600 Hz und 20 min Belassen des behandelten Mediums mit Behandlungszeiten von 1, 3 und 5 min. Behandelt wurde in PBS. (n=5, auf d0 normiert)

Die exprimierten Mengen alkalischer Phosphatase in Abbildung 36 nach CAP-Behandlung sind bei den verschiedenen Behandlungskonzepten unterschiedlich breit gestreut. Tendenziell erfolgt jedoch ein deutlicherer Anstieg an Tag 14, verhältnismäßig weniger an Tag 21. Eine Ausnahme bildet Tag 1 in **d**) jeweils bei 1, 3 und 5 min. Hier zeigen sich verfrühte, überproportional steile Anstiege.

4.5 Toxizität nach Behandlung mit CAP durch die DBD auf Osteoblasten

Um einen visuellen Eindruck möglicher sichtbarer Effekte der Behandlung bezüglich der Toxizität mit CAP auf Osteoblasten erhalten zu können, wurden Mikroskopaufnahmen vor und nach den Behandlungen aufgenommen. Zudem wurden mittels Propidium-Jodid-Färbung im Zentrum des Behandlungsbereichs des Wells durch die DBD die Anzahl Zellen, die membrangeschädigt, nekrotisch oder tot waren, visuell erfasst. Propidium Jodid (PI) dringt nicht in lebende Zellen ein (122), färbt die Zellkerne rot an und würde somit eine toxische Wirkung auf die Osteoblasten zeigen. Der Farbstoff ist nicht in der Lage, die Membran lebender Zellen zu durchdringen. Weiter wurden die Zellen mit Hoechst (123) angefärbt, wobei alle Zellkerne, sowohl lebender als auch toter Zellen, blau markiert werden. Um lebende Zellen zu erfassen, wurden die Zellen mit Fluorescein-Diacetate (FDA), einem Esterasesubstrat, gefärbt. Durch intrazelluläre Esterasen wird nach der Hydrolyse in der Zelle der Farbstoff freigesetzt (124) und wird wie die anderen Färbungen auch im Fluoreszenzmikroskop bei entsprechender Wellenlänge sichtbar. Diese Zellen leuchten grün und sind klar von den avitalen Zellen zu unterscheiden.

Abbildung 37 zeigt die Anfärbung mit CAP behandelter Osteoblasten mit Hoechst, FDA und PI im Zentrum des Wirkbereichs der DBD-Sonde bei 13,5 kV, 300 Hz und direktem Mediumwechsel nach der Behandlung.



Abbildung 37: A Färbung von mit CAP behandelten Osteoblasten im Zentrum des Wirkbereichs der DBD-Sonde bei 13,5 kV, 300 Hz und direktem Mediumwechsel mit 1, 5 und 10 min Behandlungsdauer (DMEM/F12) mittels FDA (grün) zur Quantifizierung der lebenden Zellen, mittels Hoechst zur Färbung aller vitalen und avitalen Zellkerne und mittels PI zur Darstellung der toten Zellen. Die Aufnahme erfolgte unmittelbar nach Anfärbung nach der Behandlung. 5fache Vergrößerung, **B** unbehandelte Kontrolle. 10fache Vergrößerung. Spender 4

Vor allem bei den Aufnahmen mit FDA-Färbung ist das rundlich konfigurierte Zentrum des Wirkbereichs der DBD-Sonde zu erkennen. Mit zunehmender Behandlungsdauer scheint der Radius des Wirkbereichs erweitert und die vitalen Zellen im Randbereich aufgelockerter. Die Zellen im Zentrum und Randbereich zeigten eine zunehmend rundliche Konfiguration und es bildeten sich teils gelöste Zellhaufen. Das Absaugen musste unter größter Vorsicht geschehen, da die gelösten Haufen sonst mit abgesaugt worden wären.

Abbildung 38 zeigt bei 1,25facher Vergrößerung eine Übersicht eines Wells nach CAP-Behandlung mit voll erfasstem Radius des Wirkbereichs der DBD-Sonde.



Abbildung 38: Mit FDA angefärbte vitale Osteoblasten in vitro eines mit CAP behandelten Wells durch die DBD bei 13,5 kV, 600 Hz und direktem Absaugen des behandelten Mediums über 5 min. Die Aufnahme erfolgte unmittelbar nach Anfärbung nach der Behandlung. 1,25fache Vergrößerung, Spender 4

4.6 CLD: Quantifizierung von Nitrit und Nitrat in PBS nach Behandlung mit CAP

Mit der Chemiluminescence Detection (CLD) wurden die freigesetzten bzw. durch CAP erzeugten Mengen von Nitrit und Nitrat quantifiziert. Behandelt wurde in 250 μ I PBS im Well einer 24-Well-Platte äquivalent zu den Behandlungen der Osteoblasten. Es wurde bei 13,5 kV 150, 300 und 600 Hz je über 1, 2, 3, 4, 5 und 10 min behandelt. Nach jeder Behandlungszeit wurden 5 μ I über eine 10 μ I Glasspritze in die Messapparatur je Messkolben für Nitrit und Nitrat gegeben.

Abbildung 39 zeigt die vom System erfassten Mengen von Nitrat in ihrer Konzentration (µM) aufgetragen auf die Behandlungszeit. Die Konzentration steigt nahezu linear mit zunehmender Hz-Zahl bis 600 Hz und Behandlungsdauer bis 10 min an.



Abbildung 39: Konzentration von Nitrat nach Behandlung von PBS mit CAP bei 13,5 kV 150, 300 und 600 Hz über 1, 2, 3, 4, 5 und 10 min. (n=3)

Auch die Konzentration von Nitrit steigt nahezu linear mit zunehmender Hz-Zahl und Behandlungsdauer an. Wobei die freigesetzten Mengen Nitrat diese um ein Vielfaches übersteigen wie in Abbildung 40 zu sehen.



Abbildung 40: Konzentration von Nitrit nach Behandlung von PBS mit CAP bei 13,5 kV 150, 300 und 600 Hz über 1, 2, 3, 4, 5 und 10 min. (n=3)

4.7 CLD: Nitrit und Nitrat nach CAP auf Knochenchips in der Franz-Zelle

Als Annäherung an einen in vivo Versuch an humanem Knochengewebe mit CAP wurden 8 mm im Durchmesser messende Knochenbiopsiestanzen aus humanen Hüftköpfen gewonnen und in einem Versuchsaufbau in der Franz-Diffusions-Zelle mit CAP trocken behandelt. Erfasst wurden Nitrit- und Nitratkonzentrationen in PBS in der Zelle, die durch Diffusion durch die Knochenzelle entstanden waren. Hier wurden mit einer Glaspipette (Hamilton) alle 10 min 50 µl entnommen, frisch wieder aufgefüllt und 5 µl der Probe je in den Nitrat- und den Nitrit-Messzylinderkolben der CLD-Apparatur zur Quantifizierung gegeben.

Behandelt wurde bei 13,5 kV und 300 Hz über 30 min. Die Proben wurden noch weitere 40 min über die Behandlungszeit hinaus entnommen. Abbildung 41 zeigt die Konzentration von Nitrit und Nitrat die nach Diffusion durch den mit CAP behandelten Knochenchip im PBS nachgewiesen wurden. Die Nitratkonzentration steigt zunächst linear auf etwa 1000 µM bis zum Ende der Behandlung an und fällt dann mäßig stufenweise auf etwa 450 µM ab. Das Konzentrationsmaximum liegt am Ende der CAP-Behandlung. Nitrit hat zunächst einen nur sehr flachen linearen Anstieg, der sich bis 30 min post-DBD (60 min) zieht und hier sein Maximum von etwa 50 µM erreicht. Die Kurve bleibt flach und die Konzentrationen niedrig.



CLD CAP Knochenchips in PBS

Abbildung 41: Konzentration von Nitrit und Nitrat nach Behandlung von Knochenchips in der Franz-Diffusions-Zelle in PBS nach Diffusion bei 13,5 kV 300 Hz über 30 min CAP-Behandlung. Messung alle 10 min, bis 40 min post DBD. (n=1)

5 Diskussion (inklusive Schlussfolgerung)

Auch wenn die Plasmamedizin einen noch verhältnismäßig jungen Forschungszweig darstellt, so versuchen die Forschungsteams, die mit CAP arbeiten, zunehmend, in Bezug auf mögliche Behandlungskonzepte am Menschen, diese Konzepte zu etablieren, insbesondere was die Behandlung von Hauterkrankungen angeht, seien es chronische Wunden oder Wunden mit Erregerbefall. Hier gibt es Produkte, die bereits seit einigen Jahren ihren Beitrag zur besseren Wundversorgung leisten, wie das bereits erwähnte PlasmaDerm[®]-System (40, 41). Studien konnten sogar zeigen, dass bei entsprechender Geräteeinstellung und entsprechendem Setting die Proliferation von epidermalen Keratinozyten in geringem Umfang begünstigt werden kann (27). Auch eine erfolgreiche Behandlung der aktinischen Keratose wurde bereits beschrieben (26). Darüber hinaus werden diverse Ansätze zur Behandlung von Krebserkrankungen wie einem Melanom (17, 118, 125) oder einem Glioblastom am Mausmodell (3) genauer erforscht. Die größte Herausforderung in den Versuchsmodellen zur Behandlung verschiedenster Zellarten stellt mit Sicherheit das breite Spektrum der entstehenden Bestandteile eines erzeugten Plasmas dar (Abbildung 2). Erschwerend kommen diverse Möglichkeiten der Geräteeinstellungen (hauptsächlich modulierbar in Abstand zum Medium, kV und Hz) hinzu. Zudem gibt es verschiedene Anordnungen der Elektroden und der Positionierung des Plasmas in den einzelnen unterschiedlichen DBD-Devices sowie verschiedene Konzepte vor und nach der Behandlung. So kann beispielsweise ein Medium vorher behandelt und erst danach auf die Zellen gegeben werden (57), um unter anderem den Effekt der gelösten Spezies und Moleküle genauer zu untersuchen, weniger die direkten Effekte wie UV-Strahlung oder elektromagnetische Felder. Am Ende beeinflusst dies auch die Frage nach der Vergleichbarkeit der einzelnen Studien.

Da es schwierig ist zu differenzieren, welcher Bestandteil von CAP einen Effekt ausgelöst hat, müssen diese in Studien einzeln und später in möglicher Wechsel- oder Zusammenwirkung betrachtet werden. In dieser Arbeit wurde der Hauptfokus auf die Viabilität humanen Knochengewebes und speziell humaner Osteoblasten gelegt, inwieweit die Effekte von CAP diese unter verschiedenen Geräteeinstellungen und zwei Konzepten beeinflussen (1. direktes Ersetzen des behandelten PBS durch frisches Medium, 2. 20 min Belassen im Brutschrank). Aufgrund des enormen Umfangs der Versuche wurde sich auf zwei post-DBD Konzepte beschränkt. Das Behandlungsmedium war stets PBS.
5.1 Einfluss von CAP auf die Zellviabilität in vitro

Die in vitro verwendeten, mit CAP in PBS behandelten Osteoblasten wurden unbehandelten Zellen gegenübergestellt. Es wurde einmalig direkt behandelt und die Viabilität vor sowie bis zu 3 Wochen nach der Behandlung gemessen. Lediglich der Abstand der Sonde zum Medium ließ technisch bedingt keinen Spielraum zu und blieb konstant.

Das Belassen des behandelten Mediums für 20 min auf den Zellen nach der Behandlung stellt in vitro kein sinnvolles Konzept dar, weder bei 300 noch bei 600 Hz. Die Osteoblasten werden übermäßig gestresst und erreichen teils nach 3 Wochen nicht einmal mehr den Ausgangswert ihrer Viabilität. Die partiell starken, offensichtlich negativen Effekte auf die Viabilität der Osteoblasten wirken sich letztlich auch auf eine erhofft günstige Bildung einer Knochenmatrix negativ aus. Dieses Konzept wäre eventuell eine Möglichkeit, um erregerbefallenes Knochengewebe, bspw. nach osteosynthetisch versorgter Fraktur, keimfrei zu bekommen, ohne eine größere operative Sanierung anstreben oder das Fremdmaterial entfernen zu müssen. Wie in Tabelle 9 zu sehen, sinkt die Viabilität hier bei beiden Frequenzen und zunehmend mit steigender Behandlungsdauer im Vergleich zu unbehandelten Zellen signifikant ab. An Tag 21 nach Behandlung war die Viabilität bei beiden Frequenzen nur halb so groß wie bei den unbehandelten Zellen, die somit die doppelte Vitalität aufwiesen. Zur Förderung der Knochenheilung kann dieses Konzept nicht beitragen. Bei 600 Hz und direktem MW zeigt die Tabelle an Tag 21 nach Behandlung nur 31 % weniger Vitalität. Das Konzept des direkten Mediumwechsels weist zwar mit zunehmender Frequenz und Behandlungsdauer auch eine zunehmende, wenn auch geringer ausgeprägte durchschnittliche Abschwächung der Viabilität auf, es bietet jedoch einen der interessanteren Ansätze, da die Ergebnisse bei 300 Hz durchweg nicht signifikant niedriger waren als bei den unbehandelten Zellen. Hier könnte bei der Behandlungszeit von 1 min der interessanteste Ansatz zur Eradikation von Erregern liegen, ohne das Knochengewebe übermäßig zu schädigen. Eine Studie, bei der Knochentumorzellen (Osteosarkom) und humane Osteoblasten mit CAP behandelt wurden (126), konnte zeigen, dass unter speziellen Bedingungen und Geräteeinstellungen in vitro Knochentumorzellen durch ROS zum Großteil zerstört werden konnten und die scheinbar gegenüber ROS weniger empfindlichen humanen Osteoblasten fast keinen Schaden genommen haben. Auch hier ist ein Ansatz vorstellbar, solange sich die höhere Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber ROS bestätigen ließe. Einige Studien berichten, dass kurze Behandlungszeiten die Proliferation von Osteoblasten angeregt haben sollen (35). Sogar die Exprimierung der alkalischen Phosphatase und die Mineralisierung sollen stimuliert worden sein (127). Die Behandlungszeit lag hier bei nur wenigen Sekunden. Es handelte sich um Präosteoblasten der Maus, also Vorläuferzellen. Die längeren Behandlungszeiten über 1 min senkten die Viabilität ebenso wie in dieser Arbeit. Die Behandlungszeiten waren also zu lang gewählt und müssen noch weiter nach unten angepasst werden, um einen ähnlich positiven Effekt zeigen zu können. In genannten Studien konnte der Abstand zu den behandelten Zellen und zu den behandelten Medien darüber hinaus großzügig gewählt werden. Technisch bedingt war dies bei dem in dieser Arbeit verwendeten Gerät leider nicht möglich, der verwendete sehr geringe Abstand ist in Konzepten der direkten Behandlung von Zellen in vitro nicht geeignet. Bliebe man bei dem empfindlich einzustellenden geringen Abstand, müsste hier zusätzlich ein Ansatz zur indirekten Behandlung verfolgt werden. Dann würden direkte Effekte wie UV-Licht oder elektromagnetische Felder wegfallen und die Effekte könnten isolierter betrachtet werden. So würden größere Schäden wie in Abbildung 37 zentral im Zellrasen verhindert werden.

Bezüglich der gewählten beiden Konzepte kamen andere Studien ebenfalls wie in dieser Arbeit zu dem Ergebnis, dass für eine bestmögliche Differenzierung der Osteoblasten ein direkter Mediumwechsel nach der Behandlung erfolgen sollte (128). Die entstehenden RONS schädigen in steigender Konzentration zunehmend die betreffenden Zellen. Wasserstoffperoxid, dessen Zugabe und Einfluss in zukünftigen Versuchen eine ebenfalls wichtige Rolle spielen kann, ist in der Lage, in geringer Konzentration nach kurzen Behandlungszeiten (< 1 min) in Verbindung mit CAP die Viabilität von beispielsweise Fibroblasten zu stimulieren, in zu hoher Konzentration aber auch zu schädigen, wie in der Parallelarbeitsgruppe um Stephanie M. Schöpe eindrücklich gezeigt werden konnte (129). Daher sollten ebenfalls Versuche mit künstlich zugesetzten H₂O₂-Mengen (ROS) in steigender Reihe erfolgen.

Abschließend sei gesagt, dass auch das Alter und die Ursache für die Hüftgelenksersatzoperation, aus der das Spendermaterial stammte, vermutlich einen Einfluss auf die Auswirkung der Behandlung auf die Zellviabilität haben. Aufgrund der geringen Gesamtanzahl der Spender (n=9) kann diesbezüglich jedoch keine genauere Aussage getroffen werden. Hier müssen weitere Studien ansetzen und zeigen, inwieweit das biologische Alter der Osteoblasten Einfluss auf die Viabilität nehmen kann. Eine mögliche Tendenz ließ sich jedoch bereits erkennen. Der jüngste Spender wies unbehandelt nach 21 d den höchsten Zuwachs um 250 % auf, die Ursache war hier eine komplizierte Schenkelhalsfraktur nach einem schweren Sturz. Der Spender mit dem niedrigsten Zuwachs nach 21 d (34 %) war zugleich einer der ältesten Spender. Die Ursache war eine Insuffizienzfraktur bei ausgeprägter Osteopenie. Man kann davon ausgehen, dass jüngere Menschen einen höheren Stoffwechsel und eine höhere Knochendichte aufweisen als Menschen fortgeschrittenen Alters mit Osteopenie. Ob dies nun ein Vorteil gegenüber CAP ist, vermag diese Arbeit nicht näher zu zeigen. Die jüngeren Spender funktionierten in Ernte, Anzucht und Differenzierung besser als die älteren Spender. Die Passagierung verlief bei diesen eher schleppend.

5.2 Einfluss auf die Zellviabilität von Knochenstanzbiopsaten: Ein in vivo-Ansatz

Im komplexeren Verbund in Form von Knochenchips waren die Auswirkungen auf die Zellviabilität innerhalb des Knochens weniger ausgeprägt als rein in vitro den Zellrasen im Well betreffend. Die aus humanen Hüftköpfen gewonnenen und mit CAP behandelten Knochenchipsbiopsate zeigten im Vergleich zu den unbehandelten Chips nach 60 s Behandlungsdauer bei 600 Hz und direktem Mediumwechsel an Tag 23 und 31 nach Behandlung signifikant niedrigere Ergebnisse (p=.05). An Tag 7 nicht. Die Effektstärke d nach Cohen (116) war nach 23 Tagen mittel, nach 31 Tagen klein. Trotz längerer Behandlungsdauer von 150 s zeigte diese zweite Gruppe keine signifikanten Ergebnisse. Im Vergleich zur ersten Gruppe fiel auf, dass die durchschnittlichen Wachstumsraten hier jedoch höher ausfielen als bei der unbehandelten Kontrolle. An Tag 7 waren es 62 %, an Tag 23 65 % und an Tag 31 84 % mehr. Möglicherweise zeigt sich hier der Bereich der Konzentration an RONS, wie aus der Parallelarbeitsgruppe bekannt (129), der nötig wäre, um einen stimulierenden Effekt auf die Knochenzellen im Verbund zu haben. Bei den erfassten Nitratmengen aus Abbildung 39, die bei der Behandlung von PBS entstehen, zeigte sich nach ca. 300 s Behandlungszeit bei 300 Hz eine 500 µM Konzentration. Diese Konzentration wird bei Diffusion durch den Knochen, wie in Abbildung 41 zu sehen, erst nach der doppelten Behandlungsdauer in 600 s erreicht. Bei 600 Hz wurde dieser Wert nach 150 s in PBS erreicht. Geht man von einem, wie beobachtet, relativ linearen Anstieg der Konzentrationen aus, dann würde die Konzentration, die die Zellen im Chip erreicht, nach 150 s bei 600 Hz 250 µM betragen. Dieser Wert wird, wie in Abbildung 39 zu sehen, in PBS in unter 60 s Behandlungsdauer erreicht. Daher fehlen dieser Arbeit Versuche zur Viabilität, in denen isoliert festgelegte Konzentrationen an NOS humanen Osteoblasten im Vergleich zu mit CAP behandelten Zellen in vitro zugegeben werden. Eine Studie mit gestanzten humanen Knochenchips aus Hüftköpfen (130) konnte zeigen, dass die Behandlung mit CAP nach 3 min signifikante Unterschiede zu unbehandelten Knochenchips aufwies, so dass die Viabilität und die Exprimierung der alkalischen Phosphatase erhöht ausfiel. Zwar wurde hier länger behandelt als in üblichen vergleichbaren Studien (1, 3 und 5 min), verwendet wurde jedoch ein Plasma-Pen, so dass hiermit erklärt sein dürfte, warum in vorliegender Arbeit dieser stimulierende Effekt nicht nachgewiesen werden konnte. Das Arbeitsgas war nicht die Umgebungsluft, sondern zugeführtes Argon und Helium, gemischt mit Sauerstoff und Stickstoff. Der Abstand war abermals wählbar und hierdurch wieder variabler. Die verwendete DBD scheint für lange Behandlungszeiten zur positiven Stimulierung nicht geeignet.

Interessant ist, dass bei der Behandlung der Knochenchips gezeigt werden konnte, dass die NOS durch eine komplette Stanze hindurchdiffundieren können und somit tiefe Knochenschichten bei einer äußeren in vivo Behandlung erreichen würden. Hier stellt sich ein vielleicht lohnender Ansatz dar, die Komplikationsrate durch Erregerbefall bei einliegendem Fixateur externe zu senken. Dieser liegt, wie in Abbildung 11 zu sehen, tief im Knochen ein oder überragt sogar die Gegenkortikalis. Die Bohrköpfe wären somit auch tief gelegen zur Erregereradikation ohne Ausbau des Fremdmaterials erreichbar.

5.3 Einfluss auf die Exprimierung der alkalischen Phosphatase

In etwa die eine Hälfte des exprimierten Hauptanteils der alkalischen Phosphatase im menschlichen Organismus stammt aus der Leber, die andere aus dem knöchernen System (101). Es gibt weitere Organe wie die Nieren oder die Plazenta (97), die AP exprimieren. Sie ist also kein rein knochenspezifisches Enzym. Dennoch bleibt sie ein wichtiger Marker bezüglich der Aktivität von Osteoblasten und möglichen Erkrankungen rund um das den Knochen modellierende System. Was den unter 5.1 abschließend erwähnten Aspekt des Alters des Patienten angeht, konnten Studien darauf hinweisen, dass die Knochendichte mit zunehmendem Alter bei beiden Geschlechtern im Vergleich zu jungen Menschen signifikant abzunehmen scheint (131). Bezüglich der alkalischen Phosphatase im Serum, so wurde hier festgestellt, zeigt sich bei Männern und Frauen ein in den Fokus gerücktes unterschiedliches Bild. Während Frauen vor allem postmenopausal einen höheren AP-Spiegel aufweisen,

sinkt der Spiegel bei Männern. Die AP, so konnte gezeigt werden, ist ein möglicher Prädiktor für die Knochendichte postmenopausaler Frauen (132). Hinsichtlich dieser Arbeit sollte für zukünftige Studienansätze eine an das Alter und Geschlecht angepasste Vorgehensweise des Nachweises der Exprimierung der alkalischen Phosphatase vor und nach CAP-Behandlungen erfolgen. Vor allem in Ausblick auf die Differenzierung stimulierende Konzepte wie bei der Behandlung der Osteopenie oder Osteoporose, wäre dieser Aspekt zu beachten.

Vielleicht ist es neben der geringen Spenderanzahl genau diesem Aspekt geschuldet, dass die Exprimierung in den äquivalent zu den CTB-Versuchen durchgeführten Behandlungen keine signifikanten Effekte gegenüber den unbehandelten Zellen zeigen konnte. Der jüngste (männlich) Spender hatte bei 600 Hz und dem Konzept des direkten Mediumwechsels nach 5 min an Tag 7 einen im Durchschnitt zu den anderen Spendern um 465 % höheren Wert. An Tag 21 nach Behandlung waren es bereits 1059 %. Selbst beim Konzept des Belassens des behandelten Mediums für 20 min auf den Zellen im Brutschrank bei 600 Hz und 5 min Behandlungszeit lag der Wert an Tag 7 um 514 %, an Tag 21 um 1045 % höher. Und das bei wie bereits festgestellt ungünstigerer hoher Frequenz, zweitem Konzept und hoher Behandlungsdauer.

Wie ebenfalls unter 5.1 erwähnt konnte in einer Studie gezeigt werden, dass bei der Behandlung mit CAP die Aktivität der AP erhöht wurde (127). Im Unterschied zu dieser Arbeit handelte es sich um eine präosteoblastische Zelllinie der Maus. Die Untersuchungszeiten waren wie gesagt deutlich kürzer (wenige Sekunden). In einer weiteren Studie wurde ebenfalls eine Zunahme der Knochenmatrixbildung und eine Hochregulierung der alkalischen Phosphatase und von RUNX2 (133) durch CAP festgestellt. Es wurden jedoch Zementoblasten des Zahns der Maus in vitro untersucht. Die Kultivierung zur AR-Anfärbung erfolgte lediglich über 7 Tage. Das DBD-Gerät wurde nicht bei 13,5 kV, sondern bei 18 kV im Vergleich zu dieser Arbeit verwendet. Die AP wurde bei 1 bis 2 Tagen bestimmt. Behandelt wurde hier allerdings bis zu 1 Minute. Die Ergebnisse konnten im Setting der vorliegenden Arbeit in vitro nicht reproduziert werden, jedoch eine grundsätzliche Beobachtung, dass eine steigende Exprimierung der AP bei den unbehandelten Zellen mit einer steigenden Viabilität und Differenzierung unabhängig von Alter und Geschlecht, wenn auch in unterschiedlicher Ausprägung, einherzugehen scheint.

5.4 Einfluss auf die Ausbildung einer Knochenmatrix

Bei Betrachtung von Abbildung 27 und Abbildung 28 im Vergleich zu Abbildung 25 wird rein visuell deutlich, dass die durchgeführten Behandlungen mit CAP die Ausbildung einer Knochenmatrix über 21 Tage durch humane Osteoblasten zu erschweren scheinen.

Wie unter 5.2 beschrieben wurde in einer Studie mit Zementoblasten von Mäusen eine Zunahme der Knochenmatrixbildung nach Behandlung mit CAP festgestellt (133). Die Kultivierung erfolgte jedoch nur über 7 Tage, interessant wäre gewesen, ob die Arbeitsgruppe diesen Effekt bis zu den relevanteren Tagen 14 und 21 halten konnte. In vorliegender Arbeit wurde ebenfalls nach 7 Tagen in zahlreichen Einstellungen, wie unten näher erläutert, eine Steigerung gegenüber den unbehandelten Zellen festgestellt. Diese Steigerungen waren nicht signifikant, fielen jedoch auf. Möglicherweise wird die Ausbildung der Knochenmatrix bis Tag 7 kurzfristig minimal durch CAP stimuliert. Dieser Trend setzt sich nicht fort. An Tag 21 zeigten sich größtenteils signifikant niedrigere Ergebnisse mit durchweg starkem Effekt. Schlussfolgernd sollte anknüpfend zukünftig die niedrige Frequenz von 300 Hz gewählt werden und das Konzept des direkten Mediumwechsels. Zudem eine Behandlungszeit von ≤1 min. Hier zeigten sich keine signifikant niedrigeren Ergebnisse an Tag 21. Tag 7 zeigte mit 166 % bei dieser Einstellung höhere durchschnittliche Rücklösungen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Zusätzlich sollte daher eine Wiederholung der Behandlung alle 7 Tage oder kürzer erfolgen, um diesen Effekt nicht nur beibehalten, sondern ggf. noch steigern zu können.

Anmerkend sei hinzugefügt, dass hinsichtlich der Ausbildung einer Knochenmatrix die Osteoblasten jüngerer Patienten zügiger ausgesät und behandelt werden mussten, da sie wenig zeitlichen Spielraum zuließen. Ihre Ausbildung der Matrix war sowohl behandelt als auch unbehandelt gegenüber älteren Spendern verhältnismäßig früher erkennbar.

5.5 Ausblick

Nach wie vor gibt es viele Unklarheiten bezüglich der möglichen Effekte von CAP auf Zellen und Gewebe. Selbst wenn aussichtsreiche Effekte festgehalten werden können, ist teils nicht klar, welcher Bestandteil von CAP, welche Kombination oder welche gewebespezifische Eigenschaft diesen Effekt auslöst. Daher gilt es weitere Geräteeinstellungen der DBD zu finden, die in den Therapiekonzepten der Wundversorgung, der Onkologie und der Orthopädie und Unfallchirurgie Einzug finden

können. Dies ist in dieser Arbeit teils gelungen, dass die Behandlung mit der DBD eine lohnende Ergänzung im klinischen Alltag darstellen könnte. Es konnten aber auch Konzepte und Einstellungen ausgeschlossen werden, die in Zukunft toxische Milieus vor allem für Knochengewebe produzieren würden.

Kritisch geäußert sollte darüber nachgedacht werden, den Aufbau des verwendeten DBD-Geräts neu zu überdenken oder gar den Typ zu wechseln und sich dem vor allem im Abstand besser händelbaren Plasmajet zuzuwenden oder zumindest weitere Vergleichsarbeiten der beiden Konzepte durchzuführen. Zudem könnte es zunächst sinnvoller sein, die bereits gut erforschten Einflüsse der RONS auf Zellen in der indirekten Behandlung kontrollierter in einem Behandlungsmedium zu erzeugen und sekundär aufzutragen, da sich die direkte Anwendung als noch nicht durchweg konstant gezeigt hat. Das in vitro schon viel zu anfällige Versuchssetting wäre direkt in vivo nur schwer vorstellbar sicher anzuwenden. Hier könnte man sich an den Weiterentwicklungen des zugelassenen PlasmaDerm[®]-Systems orientieren und anwendungsund gewebespezifische Aufsätze entwickeln, die für die Mehrfachanwendung auf dem Körper verbleiben können und somit einen konstanteren Abstand einhalten und eine konstantere Intensität abgeben würden.

Dennoch vor allem für die Erregereradikation in Rahmen einer osteosynthetischen Versorgung einer Fraktur konnten Einstellungen gefunden werden, die angepasst und optimiert die noch recht hohen perioperativen Komplikationsraten senken könnten. Zudem gab es Anzeichen dafür, dass bei zukünftig empfohlener geringer Behandlungsdauer von ≤1 min, 300 Hz und direktem Mediumwechsel die Frakturheilung bei wiederholten Behandlungen mit CAP unter sterileren Bedingungen positiv stimuliert werden könnte. Selbst diese Tendenz ließe sich wohlmöglich mit angepasstem Abstand der DBD zum Medium noch steigern. Als Ausblick könnten, weitergedacht, hier spezielle Fixateuranker, eventuell aus semiporösen Materialien zur besseren Durchlässigkeit oder mit Hohlkopf zur direkten Spülung des Knochens mit indirekt behandeltem Medium. entwickelt werden. Oder beschichtete Osteosyntheseplatten, die eine gewünschte Menge an gebundenen RONS über den Zeitraum der Frakturheilung sukzessive an das umgebende Gewebe abgeben.

Zuvor müsste allerdings untersucht werden, inwieweit ein systemischer Schaden für den Organismus ausgeschlossen werden kann, da es sich bei Knochen um durchaus sehr gut durchblutetes Gewebe handelt. Eine in vivo Behandlung würde zunächst ein besseres Verständnis über den Verbleib eines behandelten, aufgebrachten Mediums und dessen Kompensation durch den Organismus voraussetzen.

Zur Behandlung von Krebserkrankungen im Bezug zu Knochengewebe wurden ergänzend zu aktuell funktionierenden Studien mit dem Konzept des direkten Mediumwechsels und einer niedrigen Behandlungszeit ebenfalls mögliche Einstellungen des DBD-Geräts gefunden. Diese Einstellungen können gängige Therapiekonzepte als schonendere und lokal gezieltere Maßnahmen sinnvoll ergänzen, ohne das umliegende Knochengewebe signifikant zu schädigen.

Es sind definitiv weitere Versuche in vitro und eine Weiterentwicklung des in vivo Ansatzes notwendig, um eine Übertragung in den klinischen Alltag möglich und die Konzepte für den Menschen anwendbar zu machen. Zu lange Behandlungszeiten und Intensitäten direkt und indirekt schädigen die Zellen mitunter in hohem Maße. Geringe Intensitäten und Behandlungszeiten zeigen demgegenüber aussichtsreiche Ansätze zur Förderung der Differenzierung und Viabilität. Schlussendlich bietet das Gebiet der Plasmamedizin noch viel Potenzial, zukünftig kostengünstig und möglichst noninvasiv unterschiedlichste Erkrankungen des Menschen sowohl in Ergänzung als auch in primärer Anwendung behandeln und heilen zu können.

6 Literaturverzeichnis

1. Metelmann H-R. Plasmamedizin Kaltplasma in der medizinischen Anwendung. Metelmann H-R, von Woedtke T, Weltmann K-D, editors. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg Imprint: Springer; 2016.

2. Adhikari BRK, R. Introduction to the Plasma State of Matter. The Himalayan Physics. 2013;4:60-4.

3. Yan X, Ouyang J, Zhang C, Shi Z, Wang B, Ostrikov KK. Plasma medicine for neuroscience-an introduction. Chin Neurosurg J. 2019;5:25.

4. Han L, Patil S, Keener KM, Cullen PJ, Bourke P. Bacterial inactivation by highvoltage atmospheric cold plasma: influence of process parameters and effects on cell leakage and DNA. J Appl Microbiol. 2014;116(4):784-94.

5. Langmuir I. Oscillations in Ionized Gases. Proc Natl Acad Sci U S A. 1928;14(8):627-37.

6. Mott-Smith HM. History of "plasmas". Nature. 1971;233(5316):219.

7. Braný D, Dvorská D, Halašová E, Škovierová H. Cold Atmospheric Plasma: A Powerful Tool for Modern Medicine. Int J Mol Sci. 2020;21(8).

8. Sakudo A, Yagyu Y, Onodera T. Disinfection and Sterilization Using Plasma Technology: Fundamentals and Future Perspectives for Biological Applications. Int J Mol Sci. 2019;20(20).

9. Chaudhary K. Plasma Kinetic Theory. Rijeka; Croatia: IntechOpen; 2018. 138 p.

10. Bittencourt JA. Fundamentals of Plasma Physics. 3rd 2004. ed. New York, NY: Springer New York : Imprint: Springer; 2004.

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

12. Xiong Z, Roe J, Grammer TC, Graves DB. Plasma Treatment of Onychomycosis. Plasma Processes and Polymers. 2016;13(6):588-97.

13. Klämpfl TG, Isbary G, Shimizu T, Li YF, Zimmermann JL, Stolz W, et al. Cold atmospheric air plasma sterilization against spores and other microorganisms of clinical interest. Appl Environ Microbiol. 2012;78(15):5077-82.

14. Fiebrandt M, Lackmann J-W, Stapelmann K. From patent to product? 50 years of low-pressure plasma sterilization. Plasma Processes and Polymers. 2018;15(12):1800139.

15. Bekeschus S. Medical gas plasma technology: Roadmap on cancer treatment and immunotherapy. Redox Biology. 2023;65:102798.

16. Laroussi M. Plasma medicine: A Brief Introduction. mdpi. 2018:47-60.

17. Arndt S, Wacker E, Li YF, Shimizu T, Thomas HM, Morfill GE, et al. Cold atmospheric plasma, a new strategy to induce senescence in melanoma cells. Exp Dermatol. 2013;22(4):284-9.

18. Stoffels E, Kieft IE, Sladek REJ, van den Bedem LJM, van der Laan EP, Steinbuch M. Plasma needle for in vivo medical treatment: recent developments and perspectives. Plasma Sources Science and Technology. 2006;15(4):S169.

19. Hefny MM. Experimental study of cold atmospheric plasma for plasma medicine research and applications 2019.

20. Chen Z, Wirz RE. Cold Atmospheric Plasma (CAP) Technology and Applications: Springer International Publishing; 2022.

21. Napp J, Daeschlein G, Napp M, von Podewils S, Gümbel D, Spitzmueller R, et al. On the history of plasma treatment and comparison of microbiostatic efficacy of a

historical high-frequency plasma device with two modern devices. GMS Hyg Infect Control. 2015;10:Doc08.

22. Kumar S, Saxena J, Srivastava VK, Kaushik S, Singh H, Abo-El-Sooud K, et al. The Interplay of Oxidative Stress and ROS Scavenging: Antioxidants as a Therapeutic Potential in Sepsis. Vaccines (Basel). 2022;10(10).

23. Bekeschus S, Schmidt A, Bethge L, Masur K, von Woedtke T, Hasse S, et al. Redox Stimulation of Human THP-1 Monocytes in Response to Cold Physical Plasma. Oxid Med Cell Longev. 2016;2016:5910695.

24. Tanaka H, Mizuno M, Ishikawa K, Takeda K, Nakamura K, Utsumi F, et al. Plasma Medical Science for Cancer Therapy: Toward Cancer Therapy Using Nonthermal Atmospheric Pressure Plasma. IEEE Transactions on Plasma Science. 2014;42(12):3760-4.

25. Tanaka H, Bekeschus S, Yan D, Hori M, Keidar M, Laroussi M. Plasma-Treated Solutions (PTS) in Cancer Therapy. Cancers (Basel). 2021;13(7).

26. Friedman PC, Miller V, Fridman G, Lin A, Fridman A. Successful treatment of actinic keratoses using nonthermal atmospheric pressure plasma: A case series. J Am Acad Dermatol. 2017;76(2):349-50.

27. Hasse S, Duong Tran T, Hahn O, Kindler S, Metelmann HR, von Woedtke T, et al. Induction of proliferation of basal epidermal keratinocytes by cold atmospheric-pressure plasma. Clin Exp Dermatol. 2016;41(2):202-9.

28. Donohoe KG, Wydeven T. Plasma polymerization of ethylene in an atmospheric pressure-pulsed discharge. Journal of Applied Polymer Science. 1979;23(9):2591-601.

29. Kogelschatz U. Silent discharges for the generation of ultraviolet and vacuum ultraviolet excimer radiation. Pure and Applied Chemistry. 1990;62(9):1667-74.

30. Kogelschatz U. Filamentary, patterned, and diffuse barrier discharges. IEEE Transactions on Plasma Science. 2002;30(4):1400-8.

31. Brandenburg R. Dielectric barrier discharges: progress on plasma sources and on the understanding of regimes and single filaments. Plasma Sources Science and Technology. 2017;26(5):053001.

32. Nguyen TM, Kaushik N, Nguyen TT, Choi EH, Nguyen LN, Kaushik NK. The outlook of flexible DBD-plasma devices: Applications in food science and wound care solutions. Materials Today Electronics. 2024;7:100087.

33. A. V. Nastute VP, I. Topala. Atmospheric pressure plasma jet—Living tissue interface: Electrical, optical, and spectral characterization. Journal of Applied Physics. 2013;113(18).

34. Isbary G, Shimizu T, Li YF, Stolz W, Thomas HM, Morfill GE, et al. Cold atmospheric plasma devices for medical issues. Expert Rev Med Devices. 2013;10(3):367-77.

35. Eggers B, Wagenheim AM, Jung S, Kleinheinz J, Nokhbehsaim M, Kramer FJ, et al. Effect of Cold Atmospheric Plasma (CAP) on Osteogenic Differentiation Potential of Human Osteoblasts. Int J Mol Sci. 2022;23(5).

36. Peprah K, Spry C. CADTH Rapid Response Reports. Pulsed Electron Avalanche Knife (PEAK) PlasmaBlade versus Traditional Electrocautery for Surgery: A Review of Clinical Effectiveness and Cost-Effectiveness. Ottawa (ON): Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health

Copyright © 2019 Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health.; 2019.

37. Kaya E, Siebermair J, Azizy O, Dobrev D, Rassaf T, Wakili R. Use of pulsed electron avalanche knife (PEAK) PlasmaBlade[™] in patients undergoing implantation of subcutaneous implantable cardioverter-defibrillator. IJC Heart & Vasculature. 2019;24:100390.

38. Stratmann B, Costea TC, Nolte C, Hiller J, Schmidt J, Reindel J, et al. Effect of Cold Atmospheric Plasma Therapy vs Standard Therapy Placebo on Wound Healing in Patients With Diabetic Foot Ulcers: A Randomized Clinical Trial. JAMA Netw Open. 2020;3(7):e2010411.

39. Landscheidt K, Engelhardt C, Hernekamp JF, Goertz O. Use of Cold Plasma in Wound Healing: A Case Report. Adv Skin Wound Care. 2022;35(12):1-3.

40. Brehmer F, Haenssle HA, Daeschlein G, Ahmed R, Pfeiffer S, Görlitz A, et al. Alleviation of chronic venous leg ulcers with a hand-held dielectric barrier discharge plasma generator (PlasmaDerm(®) VU-2010): results of a monocentric, two-armed, open, prospective, randomized and controlled trial (NCT01415622). J Eur Acad Dermatol Venereol. 2015;29(1):148-55.

41. Ernst J, Tanyeli M, Borchardt T, Ojugo M, Helmke A, Viöl W, et al. Effect on healing rates of wounds treated with direct cold atmospheric plasma: a case series. J Wound Care. 2021;30(11):904-14.

42. van Welzen A, Hoch M, Wahl P, Weber F, Rode S, Tietze JK, 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):328-36.

43. Bekeschus S, Lin A, Fridman A, Wende K, Weltmann K-D, Miller V. A Comparison of Floating-Electrode DBD and kINPen Jet: Plasma Parameters to Achieve Similar Growth Reduction in Colon Cancer Cells Under Standardized Conditions. Plasma Chemistry and Plasma Processing. 2018;38(1):1-12.

44. Chaerony Siffa I, Gerling T, Masur K, Eschenburg C, Starkowski F, Emmert S. Development of a Mobile Sensory Device to Trace Treatment Conditions for Various Medical Plasma Source Devices. Sensors (Basel). 2022;22(19).

45. Breathnach R, McDonnell KA, Chebbi A, Callanan JJ, Dowling DP. Evaluation of the effectiveness of kINPen Med plasma jet and bioactive agent therapy in a rat model of wound healing. Biointerphases. 2018;13(5):051002.

46. Bekeschus S, Schmidt A, Weltmann K-D, von Woedtke T. The plasma jet kINPen – A powerful tool for wound healing. Clinical Plasma Medicine. 2016;4(1):19-28.

47. Perni S, Liu DW, Shama G, Kong MG. Cold atmospheric plasma decontamination of the pericarps of fruit. J Food Prot. 2008;71(2):302-8.

48. Girard PM, Arbabian A, Fleury M, Bauville G, Puech V, Dutreix M, et al. Synergistic Effect of H2O2 and NO2 in Cell Death Induced by Cold Atmospheric He Plasma. Sci Rep. 2016;6:29098.

49. Cao X, Fang T, Chen M, Ning T, Li J, Siegel PM, et al. Trehalose enhanced cold atmospheric plasma-mediated cancer treatment. Biomaterials. 2024;309:122582.

50. Hoffmann C, Berganza C, Zhang J. Cold Atmospheric Plasma: methods of production and application in dentistry and oncology. Med Gas Res. 2013;3(1):21.

51. Kerlikowski A, Matthes R, Pink C, Steffen H, Schlüter R, Holtfreter B, et al. Effects of cold atmospheric pressure plasma and disinfecting agents on Candida albicans in root canals of extracted human teeth. J Biophotonics. 2020;13(12):e202000221.

52. Kim SJ, Chung TH, Bae SH, Leem SH. Induction of apoptosis in human breast cancer cells by a pulsed atmospheric pressure plasma jet. Applied Physics Letters. 2010;97(2):023702--3.

53. Weltmann K-D, Kindel E, Brandenburg R, Meyer C, Bussiahn R, Wilke C, et al. Atmospheric Pressure Plasma Jet for Medical Therapy: Plasma Parameters and Risk Estimation. Contributions to Plasma Physics. 2009;49(9):631-40.

54. Weltmann K-D, von Woedtke T. Basic requirements for plasma sources in medicine. Eur Phys J Appl Phys. 2011;55(1):13807.

55. Bekeschus S, von Woedtke T, Emmert S, Schmidt A. Medical gas plasmastimulated wound healing: Evidence and mechanisms. Redox Biology. 2021;46:102116.

56. Kim SJ, Chung TH. Cold atmospheric plasma jet-generated RONS and their selective effects on normal and carcinoma cells. Sci Rep. 2016;6:20332.

57. Yan D, Sherman JH, Keidar M. Cold atmospheric plasma, a novel promising anti-cancer treatment modality. Oncotarget. 2017;8(9):15977-95.

58. Hwang SY, Nguyen NH, Kim TJ, Lee Y, Kang MA, Lee JS. Non-Thermal Plasma Couples Oxidative Stress to TRAIL Sensitization through DR5 Upregulation. Int J Mol Sci. 2020;21(15).

59. Cooper M, Fridman G, Staack D, Gutsol AF, Vasilets VN, Anandan S, et al. Decontamination of Surfaces From Extremophile Organisms Using Nonthermal Atmospheric-Pressure Plasmas. IEEE Transactions on Plasma Science. 2009;37(6):866-71.

60. Maisch T, Shimizu T, Li YF, Heinlin J, Karrer S, Morfill G, et al. Decolonisation of MRSA, S. aureus and E. coli by cold-atmospheric plasma using a porcine skin model in vitro. PLoS One. 2012;7(4):e34610.

61. Zimmermann JL, Shimizu T, Schmidt HU, Li YF, Morfill GE, Isbary G. Test for bacterial resistance build-up against plasma treatment. New Journal of Physics. 2012;14(7):073037.

62. Ziuzina D, Boehm D, Patil S, Cullen PJ, Bourke P. Cold Plasma Inactivation of Bacterial Biofilms and Reduction of Quorum Sensing Regulated Virulence Factors. PLoS One. 2015;10(9):e0138209.

63. Wu Y, Yu S, Zhang X, Wang X, Zhang J. The Regulatory Mechanism of Cold Plasma in Relation to Cell Activity and Its Application in Biomedical and Animal Husbandry Practices. International Journal of Molecular Sciences. 2023;24(8):7160.

64. Semmler ML, Bekeschus S, Schäfer M, Bernhardt T, Fischer T, Witzke K, et al. Molecular Mechanisms of the Efficacy of Cold Atmospheric Pressure Plasma (CAP) in Cancer Treatment. Cancers (Basel). 2020;12(2).

65. Kalghatgi S, Fridman A, Azizkhan-Clifford J, Friedman G. DNA Damage in Mammalian Cells by Non-thermal Atmospheric Pressure Microsecond Pulsed Dielectric Barrier Discharge Plasma is not Mediated by Ozone. Plasma Processes and Polymers. 2012;9(7):726-32.

66. Kalghatgi S, Kelly CM, Cerchar E, Torabi B, Alekseev O, Fridman A, et al. Effects of non-thermal plasma on mammalian cells. PLoS One. 2011;6(1):e16270.

67. Snezhkina AV, Kudryavtseva AV, Kardymon OL, Savvateeva MV, Melnikova NV, Krasnov GS, et al. ROS Generation and Antioxidant Defense Systems in Normal and Malignant Cells. Oxid Med Cell Longev. 2019;2019:6175804.

68. Karthik C, Sarngadharan SC, Thomas V. Low-Temperature Plasma Techniques in Biomedical Applications and Therapeutics: An Overview. Int J Mol Sci. 2023;25(1).

69. Attri P, Park JH, Ali A, Choi EH. How Does Plasma Activated Media Treatment Differ From Direct Cold Plasma Treatment? Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry- Anti-Cancer Agents). 2018;18(6):805-14.

70. Schünke M. Prometheus LernAtlas der Anatomie Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem. 4., überarbeitete und erweiterte Auflage ed. Voll M, editor2014.

71. Aumüller G. Anatomie. 5., korrigierte Auflage ed. Stuttgart: Thieme; 2020.

72. Wennemuth G. Taschenatlas Histologie mit 24 Tabellen. 1. Aufl. ed. Wennemuth G, editor. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2012.

73. Heinrich PC. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9., vollständig überarbeitete Auflage ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014.

74. Böcker W. Pathologie mit rund 150 Tabellen ; [Plus im Web mediscript]. 5., vollst. überarb. Aufl. ed. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2012.

75. Rassow J. Biochemie. 2., aktualisierte Auflage ed. Stuttgart: Thieme; 2008.

76. Hart NH, Newton RU, Tan J, Rantalainen T, Chivers P, Siafarikas A, et al. Biological basis of bone strength: anatomy, physiology and measurement. J Musculoskelet Neuronal Interact. 2020;20(3):347-71.

77. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. Clin J Am Soc Nephrol. 2008;3 Suppl 3(Suppl 3):S131-9.

78. Doherty AH, Ghalambor CK, Donahue SW. Evolutionary physiology of bone: bone metabolism in changing environments. Physiology (Bethesda). 2015;30(1):17-29.

79. Friedmann A, Strietzel FP, Maretzki B, Pitaru S, Bernimoulin JP. Histological assessment of augmented jaw bone utilizing a new collagen barrier membrane compared to a standard barrier membrane to protect a granular bone substitute material. Clin Oral Implants Res. 2002;13(6):587-94.

80. Friedmann A, Friedmann A, Grize L, Obrecht M, Dard M. Convergent methods assessing bone growth in an experimental model at dental implants in the minipig. Ann Anat. 2014;196(2-3):100-7.

81. Bartl R, Bartl C. Knochenumbau. Das Osteoporose Manual: Biologie, Diagnostik, Prävention und Therapie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2021. p. 41-53.

82. Harrasser N. Facharztwissen Orthopädie Unfallchirurgie. Harrasser N, editor. Berlin u.a.: Springer; 2016.

83. Kanta P, Ghosh T, Kaur A, Muthukumarappa T. An innovative and cost-effective way to estimate alkaline phosphatase activity in in vitro cellular model systems. Int J Biochem Mol Biol. 2021;12(1):1-7.

84. Harder L, Kuster M. Östeosynthesen. In: Grifka J, Kuster M, editors. Orthopädie und Unfallchirurgie: Für Praxis, Klinik und Facharztprüfung. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011. p. 13-28.

85. Iselin H-U. Ein Jahrhundert Unfallchirurgie. Iselin H-U, editor: schwabe; 2023.

86. Maurer TB, Ochsner PE. Infekt nach Knietotalprothesenimplantation. Der Orthopäde. 2006;35(9):917-28.

87. Liao X, Cullen PJ, Liu D, Muhammad AI, Chen S, Ye X, et al. Combating Staphylococcus aureus and its methicillin resistance gene (mecA) with cold plasma. Sci Total Environ. 2018;645:1287-95.

88. Kim EJ, Hyun JE, Kang YH, Baek SJ, Hwang CY. In vitro antibacterial and antibiofilm effects of cold atmospheric microwave plasma against Pseudomonas aeruginosa causing canine skin and ear infections. Vet Dermatol. 2022;33(1):29-e10.

89. Cramer C, Frosch KH. Gelenkübergreifender Fixateur externe zur temporären Stabilisierung komplexer Frakturen des Kniegelenks. Operative Orthopädie und Traumatologie. 2020;32(5):410-20.

90. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. Curr Protoc Immunol. 2015;111:A3.B.1-a3.B.

91. Shapiro HM, ProQuest. Practical flow cytometry. 4th ed. New York: Wiley-Liss; 2003.

92. Vieira-da-Silva B, Castanho M. Resazurin Reduction-Based Assays Revisited: Guidelines for Accurate Reporting of Relative Differences on Metabolic Status. Molecules. 2023;28(5).

93. Besecke KFW. Entwicklung von Freisetzungssystemen für Biomoleküle

für regenerative Anwendungen. Hannover: Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der

Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover; 2020. p. 182.

94. Robey PG, Termine JD. Human bone cells in vitro. Calcif Tissue Int. 1985;37(5):453-60.

95. Saul D, Riekenberg J, Ammon JC, Hoffmann DB, Sehmisch S. Hip Fractures: Therapy, Timing, and Complication Spectrum. Orthopaedic Surgery. 2019;11(6):994-1002.

96. Chen Z, Xie L, Xu J, Lin X, Ye J, Shao R, et al. Changes in alkaline phosphatase, calcium, C-reactive protein, D-dimer, phosphorus and hemoglobin in elderly osteoporotic hip fracture patients. Annals of Palliative Medicine. 2020;10(2):1079-88.

97. Siller AF, Whyte MP. Alkaline Phosphatase: Discovery and Naming of Our Favorite Enzyme. J Bone Miner Res. 2018;33(2):362-4.

98. Briot K, Roux C. Adult hypophosphatasia. Arch Pediatr. 2017;24(5s2):5s71-5s3.
99. Vimalraj S. Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. Gene. 2020;754:144855.

100. Obermayer-Pietsch B, Schwetz V. Biochemische Marker des Knochenstoffwechsels und ihre Bedeutung. Zeitschrift für Rheumatologie. 2016;75(5):451-8.

101. Riancho JA. Diagnostic Approach to Patients with Low Serum Alkaline Phosphatase. Calcif Tissue Int. 2023;112(3):289-96.

102. Haarhaus M, Cianciolo G, Barbuto S, La Manna G, Gasperoni L, Tripepi G, et al. Alkaline Phosphatase: An Old Friend as Treatment Target for Cardiovascular and Mineral Bone Disorders in Chronic Kidney Disease. Nutrients. 2022;14(10).

103. Sheehan DC, Hrapchak BB. Theory and practice of histotechnology. 2nd ed ed. St. Louis London: Mosby; 1980.

104. Puchtler H, Meloan SN, Terry MS. On the history and mechanism of alizarin and alizarin red S stains for calcium. J Histochem Cytochem. 1969;17(2):110-24.

105. Bernar A, Gebetsberger JV, Bauer M, Streif W, Schirmer M. Optimization of the Alizarin Red S Assay by Enhancing Mineralization of Osteoblasts. Int J Mol Sci. 2022;24(1).

106. Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. Anal Biochem. 2004;329(1):77-84.

107. Komori T. Regulation of Proliferation, Differentiation and Functions of Osteoblasts by Runx2. Int J Mol Sci. 2019;20(7).

108. Lian JB, Stein GS. Runx2/Cbfa1: a multifunctional regulator of bone formation. Curr Pharm Des. 2003;9(32):2677-85.

109. Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, et al. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. Cell. 1997;89(5):765-71.

110. Yang Z, Zhang B, Liu B, Xie Y, Cao X. Combined Runx2 and Snail overexpression is associated with a poor prognosis in breast cancer. Tumour Biol. 2015;36(6):4565-73.

111. Bernal C, Otalora A, Cañas A, Barreto A, Prieto K, Montecino M, et al. Regulatory Role of the RUNX2 Transcription Factor in Lung Cancer Apoptosis. Int J Cell Biol. 2022;2022:5198203.

112. Inada M, Yasui T, Nomura S, Miyake S, Deguchi K, Himeno M, et al. Maturational disturbance of chondrocytes in Cbfa1-deficient mice. Dev Dyn. 1999;214(4):279-90.

113. Enomoto H, Enomoto-Iwamoto M, Iwamoto M, Nomura S, Himeno M, Kitamura Y, et al. Cbfa1 is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation. J Biol Chem. 2000;275(12):8695-702.

114. Maruyama Z, Yoshida CA, Furuichi T, Amizuka N, Ito M, Fukuyama R, et al. Runx2 determines bone maturity and turnover rate in postnatal bone development and is involved in bone loss in estrogen deficiency. Dev Dyn. 2007;236(7):1876-90.

115. Qin X, Jiang Q, Miyazaki T, Komori T. Runx2 regulates cranial suture closure by inducing hedgehog, Fgf, Wnt and Pthlh signaling pathway gene expressions in suture mesenchymal cells. Hum Mol Genet. 2019;28(6):896-911.

116. Cohen J. A Power Primer. Psychol Bull. 1992;112(1):155-9.

117. Virág L, Szabó É, Gergely P, Szabó C. Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. Toxicology Letters. 2003;140-141:113-24.

118. Zimmermann T, Gebhardt LA, Kreiss L, Schneider C, Arndt S, Karrer S, et al. Acidified Nitrite Contributes to the Antitumor Effect of Cold Atmospheric Plasma on Melanoma Cells. Int J Mol Sci. 2021;22(7).

119. Jones SJ, Boyde A. Morphological changes of osteoblasts in vitro. Cell and Tissue Research. 1976;166(1):101-7.

120. Delgado-Calle J, Bellido T. The osteocyte as a signaling cell. Physiol Rev. 2022;102(1):379-410.

121. Tomescu A. Untersuchungen zur Modulation ausgewählter, wundheilungsrelevanter Parameter am humanen Fibroblasten- und Keratinozyten-Modell durch LED-low level light therapy. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie: Molekularbiologisches Labor; 2021. p. 96.

122. Crowley LC, Scott AP, Marfell BJ, Boughaba JA, Chojnowski G, Waterhouse NJ. Measuring Cell Death by Propidium Iodide Uptake and Flow Cytometry. Cold Spring Harbor Protocols. 2016;2016(7):pdb.prot087163.

123. Crowley LC, Marfell BJ, Waterhouse NJ. Analyzing Cell Death by Nuclear Staining with Hoechst 33342. Cold Spring Harbor Protocols. 2016;2016(9):pdb.prot087205.

124. Adam G, Duncan H. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. Soil Biology and Biochemistry. 2001;33(7):943-51.

125. Sensenig R, Kalghatgi S, Cerchar E, Fridman G, Shereshevsky A, Torabi B, et al. Non-thermal plasma induces apoptosis in melanoma cells via production of intracellular reactive oxygen species. Ann Biomed Eng. 2011;39(2):674-87.

126. Nitsch A, Sieb KF, Qarqash S, Schoon J, Ekkernkamp A, Wassilew GI, et al. Selective Effects of Cold Atmospheric Plasma on Bone Sarcoma Cells and Human Osteoblasts. Biomedicines. 2023;11(2).

127. Tominami K, Kanetaka H, Sasaki S, Mokudai T, Kaneko T, Niwano Y. Cold atmospheric plasma enhances osteoblast differentiation. PLoS One. 2017;12(7):e0180507.

128. Choi BR, Park SR, Kim GC. Effects of Different No-Ozone Cold Plasma Treatment Methods on Mouse Osteoblast Proliferation and Differentiation. Medicina (Kaunas). 2024;60(8).

129. Schöpe SM. Die Effekte der dielektrischen Barriereentladung (DBD) auf die Vitalität von humanen Fibroblasten. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie Molekularbiologisches Labor; 2023. p. 99.

130. Fischer M, Bortel E, Schoon J, Behnke E, Hesse B, Weitkamp T, et al. Cold physical plasma treatment optimization for improved bone allograft processing. Front Bioeng Biotechnol. 2023;11:1264409.

131. Rondanelli M, Gasparri C, Perdoni F, Riva A, Petrangolini G, Peroni G, et al. Bone Mineral Density Reference Values in 18- to 95-Year-Old Population in Lombardy Region, Italy. Am J Mens Health. 2022;16(5):15579883221119363.

132. Tariq S, Tariq S, Lone KP, Khaliq S. Alkaline phosphatase is a predictor of Bone Mineral Density in postmenopausal females. Pak J Med Sci. 2019;35(3):749-53.

133. Eggers B, Marciniak J, Deschner J, Stope MB, Mustea A, Kramer FJ, et al. Cold Atmospheric Plasma Promotes Regeneration-Associated Cell Functions of Murine Cementoblasts In Vitro. Int J Mol Sci. 2021;22(10).

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der vier Aggregatzustände von Materie: Fest, Abbildung 2: Nutzbare Bestandteile eines erzeugten Plasmas (Eigene Darstellung). Abbildung 3: Schematische Darstellung der Behandlung der in dieser Arbeit Abbildung 5: a) Schematische Darstellung einer Plasmajetquelle während der Zündung (Eigene Darstellung); b) Beispiel einer indirekten Plasmaquelle in Form eines Plasma-Jet-Pens, wie er bei dermatologischen Läsionen Anwendung finden kann. Das Gewebe wird nicht als Gegenelektrode benötigt (3). Abbildung 6: Unter dem Einfluss einer Plasma behandelten Laktat-Ringer-Lösung und durch die Einflüsse eines CAP-behandelten Mediums (PAL: Plasma Activated liquid) auf eine Zelle kann sowohl der direkte Zelltod (Apopotosis) durch H₂O₂ als auch der nicht-programmierte Zelltod wie durch andere Spezies des CAP-behandelten Mediums, welche die Glykolyse und die Vorgänge in den Mitochondrien beeinflussen, Abbildung 7: Aufbau des adulten Röhrenknochens am Beispiel des Femurs. a) Adulter Oberschenkelknochen mit anteiligem Längsschnitt, b) Ausschnitt aus dem Hüftkopf mit Darstellung der Spongiosabälkchen, c) Ausschnitt aus der Kompakta des Oberschenkelknochens und Darstellung deren Organisation, d) Struktureller Aufbau eines Osteons mit zentralem Haverskanal, e) Ausschnitt und Aufbau des Periosts (70). Abbildung 8: Schematische Darstellung der Epiphysenfugenregion, Organisation der am Längenwachstum beteiligten Zellen (70). 12 Abbildung 9: a) Schematische Darstellung des Knochenumbaus und die Steuerung der Kaskade durch Parameter wie Hormone oder Immunzellen; b) Aktivierung der Osteoklasten durch die Osteoblasten über den RANK-Liganden (81)...... 14

Abbildung 14: Aktivierungskaskade der alkalischen Phosphatase (ALP) im Rahmen der Knochenbildung durch Osteoblasten (99).
Abbildung 15: Umsetzung von p-Nitrophenylphosphat unter alkalischer Phosphatase

Abbildung 20: Mikroskopaufnahmen von humanen Osteoblasten bei 10facher Vergrößerung. Die anfängliche lockere, vornehmlich länglich konfigurierte Organisation (Tag 1) nach Aussaat im Osteomedium (DMEM/F12) **a**) geht über in eine zunehmend organisierte Zelldichte (Tag 5) **b**). Schließlich erfolgt die Bildung einer dichten Knochenmatrix nach 1 bis 2 Wochen **c**), hier mit Nachweis durch Alizarin-Rot-Färbung.

Abbildung 21: Unbehandelte Kontrolle. Physiologische Zellviabilität der Osteoblasten in vitro, mittels CellTiter-Blue[®] Assay über 21 Tage. Messungen an den Tagen 0, 3, 7

Abbildung 23: Zellviabilität der unbehandelten Kontrollreihe (0 s) im Differenzierungsmedium und mit der DBD bei 13,5 kV und 600 Hz einmalig über 60 und 150 s behandelten Knochenchips (d=8 mm, 1 cm Tiefe) mittels CellTiter-Blue® Assay über 31 Tage. Behandelt wurde in PBS. Anschließend direktes Absaugen des behandelten Mediums. Frisches Medium (DMEM/F12) wurde aufgebracht (n=4; auf d0 (unbehandelte Kontrolle) normiert), * zeigt an, dass die Ergebnisse gegenüber den Abbildung 24: A) 2 Nachweise des osteoblastenspezifischen RUNX2-Transkriptionsfaktors links (grün) unter dem Immunfluoreszenzmikroskop bei 40facher Vergrößerung. (1. AK RUNX2 rabbit, 2. AK FITC (Fluoresceinisothiocyanat) antirabbit); Verdünnungsverhältnis 1. AK 1:500, 2. AK 1:1000. Zellkernspezifische Anfärbung mittels DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) rechts (blau). B) Kontrolle.

Abbildung 25: Darstellung des physiologischen, zeitlichen Verlaufs der Bildung von Knochenmatrix durch Osteoblasten mit dem Alizarin-Rot-Assay. Die Aufnahmen erfolgten an **a**) d0, **b**) d1, **c**) d3, **d**) d7, **e**) d14 und **f**) d21. Die Zellen wurden nicht mit dem DBD-Device behandelt. Medium: DMEM/F12. Vergrößerung 10fach. Spender 3.

Abbildung 29: OD600 nach Rücklösung der Alizarin-Rot-S-Färbung der ausgesäten Osteoblasten (25.000/Well) in Wells einer 24-Well-Platte nach 0 (unbehandelte Kontrolle), 1, 7, 14 und 21 Tagen (nach Behandlung) zur graphischen Darstellung der von den Osteoblasten gebildeten Mengen von Knochengewebe. Die Zellen wurden bei 13,5 kV und 300 Hz 1, 3 und 5 min mit CAP behandelt. Das behandelte PBS wurde direkt von den Zellen abgesaugt. Frisches DMEM/F12 wurde aufgetragen. Die exprimierten Mengen wurden in Relation zur Kontrolle gesetzt (n=5; auf d0 normiert)

600 Hz und 20 min Belassen des behandelten Mediums mit Behandlungszeiten von Abbildung 37: A Färbung von mit CAP behandelten Osteoblasten im Zentrum des Wirkbereichs der DBD-Sonde bei 13,5 kV, 300 Hz und direktem Mediumwechsel mit 1, 5 und 10 min Behandlungsdauer (DMEM/F12) mittels FDA (grün) zur Quantifizierung der lebenden Zellen, mittels Hoechst zur Färbung aller vitalen und avitalen Zellkerne und mittels PI zur Darstellung der toten Zellen. Die Aufnahme erfolgte unmittelbar nach Anfärbung nach der Behandlung. 5fache Vergrößerung, B unbehandelte Kontrolle. 10fache Vergrößerung. Spender 4...... 58 Abbildung 38: Mit FDA angefärbte vitale Osteoblasten in vitro eines mit CAP behandelten Wells durch die DBD bei 13,5 kV, 600 Hz und direktem Absaugen des behandelten Mediums über 5 min. Die Aufnahme erfolgte unmittelbar nach Anfärbung nach der Behandlung. 1,25fache Vergrößerung, Spender 4 59 Abbildung 39: Konzentration von Nitrat nach Behandlung von PBS mit CAP bei 13,5 kV 150, 300 und 600 Hz über 1, 2, 3, 4, 5 und 10 min. (n=3) 60 Abbildung 40: Konzentration von Nitrit nach Behandlung von PBS mit CAP bei Abbildung 41: Konzentration von Nitrit und Nitrat nach Behandlung von Knochenchips in der Franz-Diffusions-Zelle in PBS nach Diffusion bei 13,5 kV 300 Hz über 30 min CAP-Behandlung. Messung alle 10 min, bis 40 min post DBD. (n=1) 61 Abbildung 42: Rohdatenausschnitt mit dargestellten Ausschlägen (Peaks) nach Injektionen von CAP behandeltem PBS zur Messung der Nitrat-Mengen in die CLD-Apparatur. Es erfolgten jeweils Dreifachmessungen zu je 5 µl. 13,5 kV 150, 300 und 600 Hz über 1, 2, 3, 4, 5 und 10 min 87 Abbildung 43: Rohdatenausschnitt mit dargestellten Ausschlägen (Peaks) nach Injektionen von CAP behandeltem PBS zur Messung der Nitrit-Mengen in die CLD-Apparatur. Es erfolgten jeweils Dreifachmessungen zu je 5 µl. 13,5 kV 150, 300 und 600 Hz über 1, 2, 3, 4, 5 und 10 min 87

8 Tabellenverzeichnis

abelle 1: Übersicht der verwendeten Geräte und Instrumente		
Tabelle 2: Übersicht über das verwendete Laborequipment	21	
Tabelle 3: Verwendete primäre Antikörper	23	
Tabelle 4: Verwendete sekundäre Antikörper	23	
Tabelle 5: Verwendete Zellen	23	
Tabelle 6: Verwendete Software	23	
Tabelle 7: Verwendete Substanzen	24	
Tabelle 8: Verdünnungsverhältnis zur immunfluoreszenzmikroskopischen Anal	lyse mit	
RUNX2 Antikörper (AK) rabbit	38	
Tabelle 9: Durchschnittlicher Zuwachs der Viabilität in % nach Tag 7 und 21	1 der A	
unbehandelten Kontrolle und der einmalig mit 1, 3 und 5 min behandelten Ze	llen bei	
13,5 kV und direktem Mediumwechsel bei B 300 Hz bzw. C 600 Hz sowie Be	elassen	
des behandelten PBS für 20 min auf den Osteoblasten bei D 300 Hz bzw. E 6	300 Hz.	
(*/**) zeigt an, dass die Ergebnisse gegenüber den unbehandelten Osteo	blasten	
signifikant sind (α = .05, * = p < .05, ** = p < .01). Die Effektstärke d der signif	ikanten	
Ergebnisse wurde nach Cohen (116) bestimmt	44	
Tabelle 10: Durchschnittlicher Anstieg der AR-Rücklösungen in %	der A	
unbehandelten Kontrolle und bei 13,5 kV und B 300 Hz + MW, C 300 Hz + 20	min im	
BS, D 600 Hz + MW und E 600 Hz + 20 min im BS behandelten hu	ımanen	
Osteoblasten nach 1, 3 und 5 min. Messung nach 7 d und 21 d. (*) zeigt an, d	ass die	
Ergebnisse gegenüber den unbehandelten Osteoblasten signifikant sind (p =.0)5). Die	
Effektstärke d der signifikanten Ergebnisse wurde nach Cohen (116) bestim	ımt. (+)	
zeigt an, dass der Anstieg an Tag 7 größer, (-), dass er niedriger ausfiel im Ve	ergleich	
zu der unbehandelten Kontrolle	54	

9 Anhänge

9.1 Einverständniserklärung

Universitätsklinikum Düsseldorf	HEINRICH HEINE	
^D atienteninformation und Einwilligungserklärung zur Teilnahme an sinem Forschungsvorhaben	Unfall- und Handchirurgie Direktor der Klinik UnivProf. Dr. J. Windolf Tel: (0211) 81 04400 / 04401 Far: (0213 81 04902	
fitel des Forschungsvorhabens	e-mail: windolf@uni-duesseldorf.de	
"Etablierung einer nicht personenbezogenen Sammlung von Körpergeweben zur Erstellung einer Gewebe- und Zellbank für wissenschaftliche Zwecke"	Privataprechatunde Mo. + Da. 09.00 - 11.00 Ukr Tel.: (0211) 81 04401 Fax: (0211) 81 04902	
Sehr gehrte Patientin, sehr geehrter Patient, sei Ihnen soll ein Eingriff vorgenommen werden, bei dem zu Behandlungs- wecken Gewebe entnommen wird. Ein Teil des entnommenen Gewebes, las ansonsten medizinisch entsorgt wirde, wird fur wissenschaftliche Un- ersuchungen zur Etablierung von Zellkulturen mit Keratinozyten, Fibroblas- en, Fetzellen, Muskelzellen, Vorlauferzellen und anderer Zelltypen ver- vendet. Diesse Gewebestück dient ausschließlich der Grundlagenfor- chung. Die gewonnenen wissenschaftlichen Daten dienen einzig den Inte- essen der Forschung zud werden möglicherweise in Zukunt zu verbesser- en Behandlungsmethoden führen. Das entnommene Gewebe wird aus- schließlich für die oben genannte Studie verwendet. Es wird Ihnen kein zusätzliches Gewebe entnommen als es medizinisch indiziert ist. Teilnahme an der Studie hr Einverständnis zur Nutzung eines Teils des bei Ihnen entnommenen Sewebes zu Forschungszuwecken ist selbstverständlich freiwillig. Sie kön- ten Ihre Einwilligung iederzeit ohne Angabe von Gründen widerrufen, ohne lass Ihnen adaruch igendwelche Nachteile für Ihre weitere ärztliche Be- randlung und medizinische Versorgung entstehen. Vertraulichkeit der Daten / Datenschutz Es erfolgt keine Weitergabe von Patientendaten. Die wissenschaftli- the Auswertung erfolgt vollkommen anonymisiert, d.h. ohne Angabe hres Namens sowie ohne Angaben von anderen persönlichen Daten. Die im Rahmen diesses Forschungsvorhabens erhobene Daten und wissenschaftliche Erkenntnisse werden aufgezeichnet und ohne Na- mensnennung weitergegeben bzw. veröffentlicht. Mit den von Ihnen zur Verfügung gestellten Probenmaterial werden keine Genanalysen Ihres Genoms unternommen.	Chirungsick Ambulant: Tel. (2011) 61 714014 Fall (2011) 61 714014 Georgenetics (2011) 714014 Georgenetics (2011) 71401 Fall (2011) 61 71401 Fall (2011) 61 7140 Fall (2011	Enwilligungserklärung Ich willige hiermit ein, dass das oben erwähnte Gewebe zu Forschungszwecken zur Etablie- gewebebank genutzt werden darf, und dass Zellen aus diesem Gewebe zur wissenschaftli- chen Zwecken verwertet werden dürfen. Ich habe die Patienteninformation gelesen und bestätige hiermit, dass ich danach durch der behandelnden Arzt Hermidie behandelnde Arztin Fraumündlich und und habe verstanden, worwer set werden dürfen. Minister und habe verstanden, worwer set werden dürfen. mündlich werde und für meine Entscheidung genügend Bedenkzeit hatte. Ich fühle mich eingehend informiert und habe verstanden, worwer set sett. Mein Arzt hat mit ausreichende Gelegenheit geschen, Fragen zu stellen, die alle beantwortet wurden. Ich willige darin ein, für das o. a. Forschungsvorhaben Körpergewebe zur Verfügung zu stellen. Meine Entscheidung zur Teilnahme an dem Forschungsvorhaben erfolgt freiwillig. Ich wurde derurder kann, ohne dass mir dadurch rigendwelche Nachteile entschen. Ich habe verstanden, dass bei dem wissenschaftlichen Forschungsvorhaben Keine persönli- dauswertung dieser studienbezogenen Daten erfolgt nach den gesetzlichen Bestimmungen us kullige hiermit ein, als Patient an dem Forschungsvorhaben "Etablierung einer nicht perso enbezogenen Samming von Körpergeweben zur Erstellung einer Gewebe- und Zellbank für wissens- schaftliche Zwecke" teilzunehmen. Ich Top Tummer in, als Patient an dem Forschungsvorhaben "Etablierung einer nicht perso enbezogenen Samming von Körpergeweben zur Erstellung einer Gewebe- und Zellbank für wissen schaftliche Zwecke" teilzunehmen. Ich person Ich person Ich person
To serve opprover user use dataus isolenten zenen konnelt än ähdele äh Forschungsprolekt beteiligte Wissenschaftler weitergreicht werden. Dies geschieht anonymisiert. Es werden keine klinische Daten weitergegeben. Ihre Gewebeproben werden nicht an kommerzielle Unternehmen weiterge-	Tel: (UZ11) 81 173/6/1378 Webseiten des Klinikums www.uniklinik-dusseldoff.de	Ich habe den Patienten mündlich über Wesen, Bedeutung und Reichweite des Forschungs vorhabens aufgeklärt. Die mündliche Aufklärung wurde durchgeführt am
Jeben. Weder der Azt, noch die Gewebe- bzw. Zellbank, noch deren Trä- jer werden einen finanziellen Gewinn durch Weiterverwertung Ihres Gewe- jermaterials machen und einen solchen auch nicht anstreben.	im Traumanetz Düsseldorf Notfallhandy: 0172-1099112	durah
		Ort, Datum (Name des Arztes in Druckbuchstaben und Unterschrift des Arz-

Anhang 1: Einverständniserklärung des Patienten zur Verarbeitung seines Knochenmaterials und zur Anlage einer Zelldatenbank (Quelle: Institut, HHU)

9.2 Peak-Diagramme: Nitrit und Nitrat während CLD



Abbildung 42: Rohdatenausschnitt mit dargestellten Ausschlägen (Peaks) nach Injektionen von CAP behandeltem PBS zur Messung der Nitrat-Mengen in die CLD-Apparatur. Es erfolgten jeweils Dreifachmessungen zu je 5 µl. 13,5 kV 150, 300 und 600 Hz über 1, 2, 3, 4, 5 und 10 min



Abbildung 43: Rohdatenausschnitt mit dargestellten Ausschlägen (Peaks) nach Injektionen von CAP behandeltem PBS zur Messung der Nitrit-Mengen in die CLD-Apparatur. Es erfolgten jeweils Dreifachmessungen zu je 5 µl. 13,5 kV 150, 300 und 600 Hz über 1, 2, 3, 4, 5 und 10 min

10 Danksagung

Großer Dank gilt meiner Frau. Du hast mir für die Ausfertigung der Experimente und der Schreibarbeit dieser Dissertation mehr als den Rücken freigehalten.

Herzlichsten Dank an Prof. Dr. rer. nat. Christoph V. Suschek, dem Leiter des molekularbiologischen Labors, und PD Dr. rer. nat. Christian Opländer für die Betreuung, die Korrekturen, die Tipps, die Geduld und vor allem die hilfsbereite nahbare Art, die mir von euch entgegengebracht wurde.

Herzlichen Dank an die immer sehr hilfsbereiten und lieben medizinisch-technischen Assistentinnen in alphabetischer Reihenfolge Jutta Schneider, Samira Seghrouchni und Christa Wilkens. Danke für das Einarbeiten, das geduldige Erklären, das Beantworten meiner Fragen und das ein oder andere persönliche Gespräch abseits des Laboralltags.

Danke an meine Laborpartner Julian Balzer und Alexander Tomescu. Ihr habt mir wirklich sehr geholfen. Mit euch fiel das Arbeiten stets leicht. Eure positive Stimmung und Einstellung haben mir imponiert.

Großer Dank an den Direktor der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf.

Weiter möchte ich PD Dr. rer. nat. Vera Grotheer und Dr. rer. nat. Ceylan Daniela Windolf für den ein oder anderen wertvollen Hinweis und Verbesserungsvorschlag danken.

Außerdem möchte ich allen anderen Menschen im Labor danken, wovon mir jeder als stets hilfsbereit in Erinnerung bleibt.

Natürlich danke ich von Herzen meinen Eltern, ohne die ich nicht dort stehen würde, wo ich heute bin. Danke.

Zuletzt ein großer Dank an meine drei kleinen Mäuse, ihr gebt mir jeden Tag die Kraft, den oft sehr anstrengenden Alltag bewältigen zu können.