

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

Die Effekte von physikalischem Kaltplasma auf die Wundheilung mit besonderem Fokus auf Stickstoffmonoxid

Dissertation

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

vorgelegt von
Kiara Heuer genannt Schletger
2021

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Christoph Suschek

Zweitgutachter: Prof. Dr. Csaba Mahotka

Danksagung und Widmung

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Windolf und Prof. Dr. rer. nat. Suschek für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit im Labor der Klinik für Unfallchirurgie und Orthopädie im Life Science Center zu forschen.

Besonderen Dank gilt Dr. Christian Opländer, der mir so viel beigebracht hat und stets mit Rat, Ideen und Wissen zur Seite stand.

Den Mitarbeitern des Labors am Life Science Center, insbesondere Jutta Schneider, Christa Wilkens und Samira Seghrouchni, gebührt ebenfalls mein Dank für die Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und ihre Geduld beim Einarbeiten in die Methodik.

Als letztes möchte ich mich bei meinen Eltern, meinem Bruder und meinem Mann Stefan für ihre uneingeschränkte und großartige Unterstützung bedanken. Ihr emotionaler Rückhalt, ihre Motivation und Hingabe haben mich nicht nur auf dem Weg zu dieser Dissertation begleitet und geprägt, sondern mich zu dem Menschen werden lassen, der ich bin.

Gewidmet meinen Großeltern Karl und Waltraud Heuer

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht.

The topical use of non-thermal dielectric barrier discharge (DBD): Nitric oxide related effects on human skin

Kiara Heuer 1*, Martin A. Hoffmanns 1*, Erhan Demir 2, Sabrina Baldus 3, Christine M. Volkmar 1, Mirco Röhle 1, Paul C. Fuchs 2, Peter Awackowicz 3, Joachim Windolf 1, Christoph V. Suschek 1 and Christian Opländer 1*

Nitric Oxide, Volume 44, 30 January 2015, Pages 52-60

1 Department of Trauma and Hand Surgery, Medical Faculty of the Heinrich-Heine-University Düsseldorf, Germany, 2 Department of Plastic Surgery, Hand Surgery, Burn Center, Merheim Hospital Cologne, University of Witten/Herdecke, Germany, 3 Institute for Electrical Engineering and Plasma Technology, Ruhr University, Bochum, Germany

** Diese Autoren haben den gleichen Anteil an der Arbeit*

Non-Thermal Dielectric Barrier Discharge (DBD) Effects on Proliferation and Differentiation of Human Fibroblasts are Primary Mediated by Hydrogen Peroxide

Julian Balzer 1*, Kiara Heuer 1*, Erhan Demir 2‡, Martin A. Hoffmanns 1‡, Sabrina Baldus 3, Paul C. Fuchs 2, Peter Awakowicz 3, Christoph V. Suschek 1, Christian Opländer 1*,

PLoS ONE (2015) 10(12): e0144968. doi:10.1371/journal.

1 Department of Trauma and Hand Surgery, Medical Faculty of the Heinrich-Heine-University, Düsseldorf, Germany, 2 Department of Plastic Surgery, Hand Surgery, Burn Center, Merheim Hospital Cologne, University of Witten/Herdecke, Köln, Germany, 3 Institute for Electrical Engineering and Plasma Technology, Ruhr University, Bochum, Germany

** Diese Autoren haben den gleichen Anteil an der Arbeit*

Acidification and nitrite/nitrate accumulation by non-thermal dielectric barrier discharge (DBD) affect human dermal fibroblasts

Martin A. Hoffmanns 1, Erhan Demir 2, Sabrina Baldus 3, Julian Balzer 1, Kiara Heuer 1, Paul C. Fuchs 2, Peter Awakowicz 3, Christoph V. Suschek 1, Christian Opländer 1

Plasma Medicine 5(1):71-85 · January 2015

1 Department of Trauma and Hand Surgery, Medical Faculty of the Heinrich-Heine University, Moorenstraße 5, 40225 Düsseldorf, Germany 2 Department of Plastic Surgery, Hand Surgery, Burn Center, Merheim Hospital Cologne, University of Witten/Herdecke, 51109 Köln, Germany 3 Institute for Electrical Engineering and Plasma Technology, Ruhr University, 44801 Bochum, Germany

Zusammenfassung

Chronische Wunden gehören zu den häufigsten Erkrankungen in Deutschland und entstehen durch Störungen der physiologischen Wundheilung, z.B. durch eine verminderte Durchblutung und bakterielle Besiedlung. Der langwierige Heilungsprozess führt nicht nur zu großem Leid bei den Betroffenen, sondern ist auch eine enorme ökonomische Belastung für das Gesundheitssystem. Physikalisches kaltes Plasma ist Gegenstand aktueller Forschung zur Therapie von chronischen Wunden. Es ist ionisiertes Gas, welches bei Raumtemperatur generiert wird und u.a. reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies beinhaltet. Stickstoffmonoxid und seine Derivate (Nitrit und Nitrat) sind wichtige Mediatoren der Wundheilung. Sie fördern die Durchblutung und sind an der Immunabwehr beteiligt. Diese Arbeit untersucht die Wirkung von Kaltplasma generierten Stickstoffderivaten auf menschliche Haut und Fibroblasten. Es wurde ein direktes Kaltplasma benutzt, welches mittels eines DBD- (*dielectric barrier discharge*)-Gerätes aus der Umgebungsluft direkt an der zu behandelnden Oberfläche generiert wird. Nach Ausschluss einer DNA-Schädigung mittels des TUNEL Assays, werden in dieser Arbeit die plasmainduzierten Stickstoffderivate (NOD) durch Chemilumineszenz-Detektion quantifiziert und qualifiziert. Es wird nachgewiesen, dass diese in Flüssigkeiten und in menschlicher Haut akkumulieren und stabil sind. So konnte eine signifikante Erhöhung der NOD in Plasmabehandelter Haut nach 10minütiger Plasmabehandlung gemessen werden (Nitrat: 5,70 vs 40,31 $\mu\text{M}/\text{mg}$; Nitrit: 0,72 vs. 49,53 $\mu\text{M}/\text{mg}$). Ergänzend zeigen Franzdiffusionszellen, dass plasmaerzeugte Stickstoffderivate die Epidermis durchdringen können. Auf zellulärer Ebene weisen Fibroblasten nach einer Plasmabehandlung ein bis zu 30%ig langsames Wachstum auf und differenzierten vermehrt zu wundheilungsrelevanten Myofibroblasten. Zusammenfassend kann gezeigt werden, dass plasmagenerierte Stickstoffspezies und weitere Komponenten in die Haut eindringen, dort akkumulieren und Einfluss auf zelluläre Prozesse, wie das Wachstumsverhalten und die Differenzierung nehmen können. Diese Ergebnisse geben einen Ausblick auf die Wirkungsmöglichkeiten auf menschliche Haut und Zellen und zeigen, dass Kaltplasma und die entstehenden Stickstoffderivate das Potenzial haben, den Wundheilungsprozess zu beeinflussen. Es wird aber auch deutlich, dass vor der klinischen Anwendung weitere Grundlagenforschung notwendig ist, um das Plasma und seine Komponenten vollends zu verstehen und eine sichere und effektive Anwendung zu gewährleisten.

Abstract

The chronic wound is one of the most common diseases in Germany and is a result of impaired wound healing e.g. by reduced perfusion and bacterial colonisation. The tedious healing process brings not only great suffering to the concerned patients but is also a great economic burden for the health care sector. Physical cold plasma can be generated at room temperature and is subject of current studies of the therapy of chronic wounds. It is ionised gas and contains among other components reactive oxygen and nitrogen species. The sterilizing effect of the so called cold atmospheric plasma is led back to these species. Nitric oxide and its derivatives are important mediators of the wound healing process. The objectives of this work are to obtain an improved understanding of the impact of cold plasma generated nitric oxide and its derivatives (nitrite and nitrate) on humane fibroblasts and skin. The plasma source was a dielectric-barrier-discharge device (DBD), which generates cold atmospheric plasma using ambient air directly on the treated surface. After excluding potential DNA-damage by using this plasma source through the TUNEL Assay, derivatives of nitric oxide are quantified and qualified by chemiluminescent detection and proven that the species are accumulating and stable after treatment in liquids and in human skin. It is shown that there is a significant increase of NODs in human skin after a 10minute treatment with cold atmospheric plasma (nitrate: 5,70 $\mu\text{M}/\text{mg}$ vs. 40,31 $\mu\text{M}/\text{mg}$, nitrite: 72 vs. 49,53 $\mu\text{M}/\text{mg}$). Furthermore it is demonstrated that the reactive nitrogen species can penetrate the epidermis by using Franz diffusion cells. At the cellular level human fibroblasts show a diminished growth of 30 percent and a differentiation into myofibroblasts, a relevant cell line in wound healing. In summary, it can therefor be concluded, that plasma generated nitric oxide derivatives penetrate into humane skin and can influence cellular processes. Cold atmospheric plasma leads to direct cellular reactions in changing the growth habit and provokes a cell differentiation. These results show the potential effects of the cold plasma on human skin and fibroblasts and give an expectation how it could become a tool in treating chronic wounds. But it demonstrates as well, that there is a lot more basic research needed for a deep understanding of the functional principles and the plasma components before a safe and effective clinical application is possible.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
α -SMA	α -smooth muscle actin
BCL 2	B-cell Lymphoma 2 Protein
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Calcium
CaCl	Calciumchlorid
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CLD	Chemoluminescent Detection
cm	Zentimeter
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DBD	Dielectric barrier discharge
DM	Diabetes mellitus
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Zellmedium
DNA	Deoxyribonucleic Acid
ECL	Enhanced Chemoluminescent
EGF	Epidermal Growth Factor
eNOS	endotheliale NO-Synthase
FCS/FBS	Fetales Kälberserum
Fe _(aq) II	Eisenoxid
FGF-2	Fibroblast Growth Factor- 2
FITC	Anti-Fluorescin Antibody
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase
GC	Guanylatzyklase
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GSH	Glutathion
h	Hour (Stunde)
HaCaT-Keratinocyten	Human adult low Calcium high Temperatur Keratinocyten
Hb	Hämoglobin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HCl	Salzsäure

H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IGF	Insulin like Growth Factor
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
j/cm ²	Joule/Quadratcentimeter
KCl	Kaliumchlorid
MAP-Kinase	Mitogen-activated-Protein Kinase
m	Meter
m ²	Quadratmeter
Mg ²⁺	Magnesium
mg	Milligramm
min	Minute
mJ	Millijoule
M	Mol
mm	Millimeter
mM	Millimol
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotid
NaNO ₂	Natriumnitrit
nmol	Nanomol
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO ₃	Nitrat
NOD	NO-Derivate
NOO ⁻	Peroxynitrit
NOS	NO-Synthase
N ₂ O ₃	Distickstofftrioxid
N ₂ O ₄	Distickstofftetroxid
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxid
PAM	Plasma-aktiviertes Medium
PBS	Phosphat buffered Solution

ppb	Parts per billion
ppm	Parts per million
PVM	Primär medizinische Versorgung
RIPA	Radio-Immunpräzipitations-Assay
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RNOS	Reaktive Stickstoffspezies
RT	Raumtemperatur
S1-Leitlinie	Leitlinie nach Handlungsempfehlung einer Expertengruppe (S = Systematik)
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SNAP	S-Nitroso-N-acetylpenicillamin
TBS	Tris-buffered Saline
TBS-T	Tris-bufferd Saline mit Tween 0,1 %
TGF- β_1	Transforming growth factor beta
TNF	Tumornekrosefaktor
TUNEL	Terminal Transferase mediated dUTP Nick End Labeling
UV	Ultraviolett
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
w/o	ohne
z.B.	Zum Beispiel
μm	Mikrometer
μM	Mikromol
3D	Dreidimensional
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius

Inhaltsverzeichnis

Danksagung und Widmung	II
Gewidmet meinen Großeltern Karl und Waltraud Heuer	II
Publikationen	III
Zusammenfassung	IV
Abstract	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
Inhaltsverzeichnis	IX
1. Einleitung	1
1.1 Aufbau der Haut	2
1.2 Die Wundheilung	4
1.2.1 Die Phasen der Wundheilung	4
1.2.2 Die chronische Wunde	6
1.3 Physikalisches Plasma	8
1.3.1 Eigenschaften	8
1.3.2 Plasmaquellen	9
1.3.3 Allgemeine Effekte von Kaltplasma	10
1.3.4 Wirkung von Kaltplasma auf die Wunde	13
1.4 Stickstoffmonoxid	15
1.4.1 Eigenschaften	16
1.4.2 Wirkung in der Haut	18
1.4.3 Wirkung in der Wunde	21
2. Fragestellung	24
3. Material und Methoden	25
3.1 Material	25
3.1.1 Chemikalien	25
3.1.2 Geräte	27
3.1.3 Kits	27
3.1.4 Lösungen und Puffer	27
3.1.5 Antikörper	29
3.1.6 Verbrauchsmaterialien	29
3.1.7 Zellen und biologisches Material	30
3.1.8 Software	30

3.2 Methoden	30
3.2.1 Plasmaquelle	30
3.2.2 Behandlungsschemata	31
3.2.3 DBD-Behandlung von PBS und Blutplasma	34
Gewinnung der Blutplasmaproben	34
Messung der NO- und Nitrit-Konzentration	34
Messung der S-Nitrosokonzentration	34
3.2.4 DBD-Behandlung der Haut	34
Spendercharakteristika	34
Vorbereitung und Behandlung der Haut	35
3.2.5 Zellisolierung aus der Haut	35
Isolierung ohne Behandlung	35
Isolierung nach der Behandlung	35
3.2.6 Zellkultur	36
3.2.7 Vitalitätsmessung	36
3.2.8 Migration-Assay	36
3.2.9 Fluoreszenzmikroskopie	37
Alpha-SMA-Nachweis	37
3.2.10 Toxizitätsnachweis	37
Aufbereitung der Hautproben	37
TUNEL-Assay	38
3.2.11 Proteinbiochemische Methoden	39
Proteinbestimmung	39
Western Blot	39
SDS Gelelektrophorese	39
Transfer von Proteinen	39
Antikörpermarkierung	40
3.2.12 Reduktive Gasphasen-Chemilumineszenz	40
3.2.13 NOD- Penetration der behandelten Haut	41
3.2.14 NOD-Akkumulation in der Haut	42
4. Ergebnisse	42
4.1 Toxizitätsnachweis	42
4.2 NOD-Konzentration in plasmabehandelten Flüssigkeiten	44
4.2.1 Kaltplasmabehandlung von PBS	44
4.2.2 Kaltplasmabehandlung von humanem Blutplasma	46
4.3 Kaltplasmabehandlung von Hautexplantaten	48
4.3.1 NOD-Penetration der Epidermis	48
4.3.2 NOD-Nachweis in Hauthomogenisaten	51

4.4 Einfluss von Kaltplasma auf Fibroblasten	54
4.4.1 Einfluss von Kaltplasma auf die Zellviabilität	54
4.4.2 Einfluss von Kaltplasma auf die Zellmigration	56
4.4.3 Einfluss von Kaltplasma auf die Differenzierung von Fibroblasten	57
Immunfluoreszenzmessung von Alpha-SMA in Fibroblasten	57
Alpha-SMA Nachweis mittels Western Blot	59
5. Diskussion	61
5.1 Toxizität des Kaltplasma	61
5.2 Anwendung in Flüssigkeiten und auf der Haut	62
5.3 Anwendung auf Zellen und Beeinflussung des Wachstums- und Differenzierungsverhaltens	68
6. Kritik	71
7. Schlussfolgerung	73
Literaturverzeichnis	76

1. Einleitung

Die Wundheilung ist ein komplexer Prozess, der essentiell für die körperliche Unversehrtheit ist. Damit eine Wunde heilt und die wichtige Barrierefunktion der Haut wieder unseren Körper vor äußeren Einflüssen schützt, müssen komplexe Prozesse auf molekularer und zellulärer Ebene stattfinden. Kommt es durch Störung dieser Prozesse zur Ausbildung eines chronischen Geschehens, erhöht sich nicht nur der Leidensdruck des Patienten massiv, sondern droht auch eine Gefahr für das komplette Organsystem. Eine chronische Wunde kann zu Immobilisation, stärksten Schmerzen, systemischen Infektionen und zur Amputation von Extremitäten führen [1]. Warum eine Wunde chronifiziert und welche Faktoren einen pathologischen Einfluss auf den Wundheilungsprozess haben ist Gegenstand aktueller Forschung. Dabei spielen vor allem Grunderkrankungen wie der Diabetes mellitus und die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK), sowie Umgebungsfaktoren wie eine Besiedlung mit multiresistenten Keimen eine wesentliche Rolle [2, 3].

Ein essentieller Faktor ist das 1987 entdeckte Molekül Stickstoffmonoxid (NO). Dieses Molekül und seine Derivate spielen eine wichtige Rolle als Mediatoren in allen Phasen der physiologischen Wundheilung. Ausschlaggebend für die Wirkung der Moleküle ist ihre Konzentration. Fehlt NO im physiologischen Wundheilungsprozess, kommt es zu einer Verzögerung der Wundheilung, ist die Konzentration zu hoch, wirkt es zytotoxisch [4, 5]. Den positiven Effekt des NO in der Behandlung von chronischen Wunden identifizieren und nutzen zu können, wäre ein großer Fortschritt.

Eine der Quellen, welche NO exogen liefern könnte, wäre physikalisches Plasma. Diese vierte Form der Materie, neben Feststoffen, Flüssigkeiten und Gasen, ist definiert als ionisiertes Gas und ist sehr energiereich. Abhängig von seiner Beschaffenheit kann es neben den Stickstoffspezies wie NO₂ weitere verschiedene Ionen und reaktive Sauerstoffspezies enthalten und UV/VIS-Strahlung emittieren [6]. Der limitierende Faktor der Anwendung war bisher die Wärme (>80 °C), die auf Grund der physikalischen Prozesse entsteht. Dieses sogenannte heiße physikalische Plasma wird bereits seit mehreren Jahrzehnten in der Medizin erforscht und angewendet und ist z.B. in der Chirurgie zur intraoperativen Blutstillung (Kauterisieren) und zur Sterilisierung von chirurgischen Instrumenten gut etabliert [7]. Mit der Möglichkeit der Generierung von kaltem Plasma, eröffneten sich viele neue Anwendungsmöglichkeiten. Nun könnte physikalisches Plasma direkt auf vulnerablen Geweben, wie z.B. der menschlichen Haut angewendet werden. Die Applikationsmethodik, die Steuerbarkeit, die genaue Zusammensetzung und die verschiedenen Einflussgrößen sind

bisher nur in Teilen erforscht und eröffnen ein komplett neues Forschungsgebiet der Medizin. Die Zielsetzung dieser Arbeit war die Erprobung eines DBD-Geräts (*dielectric barrier discharge*), einer direkten Quelle des kalten Plasmas. Diese wurde auf Flüssigkeiten, Zellen und menschlicher Haut angewendet. Gemessen wurden, vor dem Hintergrund der möglichen Anwendung zur Therapie von chronischen Wunden, die erzeugten Konzentrationen von Nitrat und Nitrit (Stabile und bioaktive Derivate des Stickstoffmonoxid). Des Weiteren wurden die direkten Effekte auf Fibroblasten untersucht, insbesondere das Wachstumsverhalten und die Differenzierung. Hintergrund ist die bereits in der klinischen Erprobung befindliche Anwendung von indirekten und direkten Kaltplasmaquellen, welche einige positive Ergebnisse in Bezug auf eine antimikrobielle Wirkung und eine verbesserte Wundheilung zeigen [8]. Trotz der positiven Wirkung ist bisher noch immer nicht klar, wie genau das Plasma zusammengesetzt ist, wie es auf den Wundstoffwechsel wirkt, welche Komponenten eine Rolle spielen und welche toxischen Wirkung eventuell als Spätfolgen auftreten könnten. Diese Arbeit möchte mit Grundlagenforschung einen Beitrag zum besseren Verständnis der Wirkung des kalten Plasmas leisten.

1.1 Aufbau der Haut

Das größte Organ des Menschen ist mit 1,4 bis 2 m² die Haut. Ihre Dicke liegt zwischen 1,4 und 4 mm. Sie übernimmt verschiedenste Funktionen, wichtig sind der Schutz gegen schädliche Einflüsse wie UV-Strahlen und Bakterien, die Wahrnehmung von Umgebungsreizen und die Thermoregulation. Die bis zu 0,1 mm dicke Epidermis als oberste Deckschicht setzt sich aus mehreren Schichten verhornenden Plattenepithels zusammen. Vorherrschend in dieser Schicht sind die Keratinoblasten und Keratinozyten, die sich von basal bis zur Oberfläche von initial unreifen Blasten zu Hornzellen in einem streng regulierten Prozess differenzieren. Dadurch lässt sich die Epidermis von oberflächlich nach basal in verschiedene Schichten unterteilen: *Stratum corneum* (Hornschicht), *Stratum granulosum* (Körnerschicht), *Stratum spinosum* (Stachelzellschicht) und *Stratum basale* (Basalzellschicht) (siehe Abb.1). Jede Schicht markiert einen Differenzierungsschritt.

In der Epidermis liegen auch die Melanozyten, die primär dem UV-Schutz dienen und die Langerhanszellen, welche die periphersten Zellen des Immunsystems sind.

Unter dem *Stratum basale* liegt eine Basalmembran, die die Epidermis von der Dermis trennt und als Barriere für größere Moleküle dient. Die unter dem *Stratum basale* gelegene gefäßreiche Dermis misst ca. 6 mm. Sie wird in ein *Stratum papillare* und ein *Stratum reticulare* aufgeteilt (siehe Abb.1). Das *Stratum papillare* besteht aus lockerem kollagenem

Bindegewebe und den verschiedenen Sinneskörperchen. Die Papillen ragen in die basalen Schichten der Epidermis hinein, verzahnen die beiden Gewebsschichten miteinander und beinhalten die Kapillaren und Venolen, die zur Versorgung der Epidermis wichtig sind. Darunter liegt das derbere *Stratum reticulare*, das der Haut ihre Dehnbarkeit, aber auch ihre Festigkeit gibt. Die Stützfunktion übernehmen hier starke Kollagenfaserbündel aus Kollagen Typ I und Typ II, für die Dehnbarkeit sind die Elastinfasern verantwortlich. Die Hauptkomponenten der Bindegewebsmatrix sind neben Kollagen, Proteoglykane und Hyaluronsäure. Diese dienen als Wasserspeicher und sind wichtig für die Zellkommunikation. In diese Matrix eingebettet liegen die Fibroblasten, welche die Komponenten der Matrix produzieren. Der stärkste Promoter zur Bildung von Kollagen ist das TGF- β (*Transforming growth factor beta*). Die ebenfalls in der Dermis liegenden Mastzellen sind ubiquitär vorkommende Effektorzellen und vermitteln Entzündungsreaktionen, z.B. während der Wundheilung. Weitere Zellen sind Elastoblasten/Elastozyten, und Histiozyten (sesshafte Makrophagen). Mobile Makrophagen und Lymphozyten können auch in der Dermis vorliegen, wandern aber vermehrt erst bei einer Verletzung in das Gewebe ein.

Die Subkutis stellt die Verbindung zwischen der Haut und der Körperfaszie her. Sie besteht vor allem aus Fettzellen und straffen Bindegewebszügen (*Retinacula cutis*) und ist je nach Geschlecht, Körpergewicht und Hormonstatus unterschiedlich ausgeprägt. In der Subkutis liegen die makroskopisch sichtbaren Gefäße und Nerven [9-11].

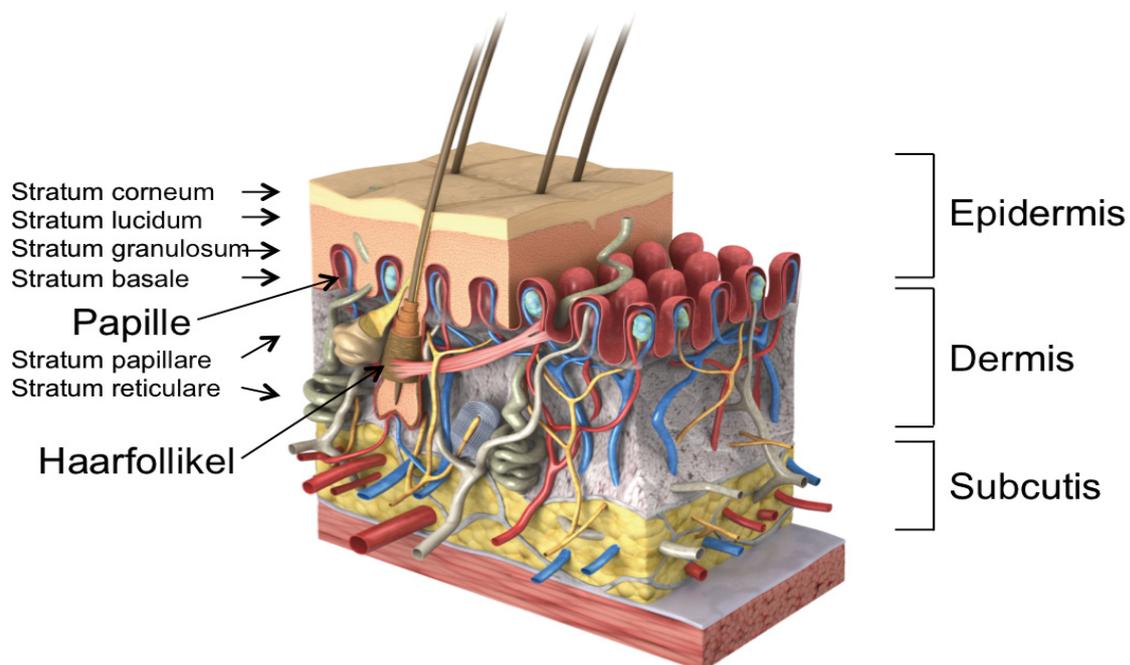


Abb. 1: Schematischer Aufbau der Haut (entnommen aus www.carecreations.basf.com
BASF Personal Care and Nutrition GmbH, Illustration: Julius Ecke, München. Modifiziert)[12].

1.2 Die Wundheilung

Die kutane Wundheilung ist ein dynamisch ablaufender Prozess, der auf molekularer und zellulärer Ebene abläuft. Die Wiederherstellung der dermalen Barriere ist essentiell, um den Körper vor Infektionen und Dehydratation zu schützen und muss schnell und effektiv ablaufen. Ein komplexes System aus Botenstoffen orchestriert die Einwanderung von Zellen des Immunsystems und sorgt dafür, dass Gewebsschäden repariert werden. Dieser Prozess ist allerdings sehr sensibel und abhängig von vielen Faktoren.

Chronische Wundheilungsstörungen entstehen sehr oft durch Durchblutungsstörungen und Infektionen. Diese können zu starken Schmerzen, systemischen Infektionen und einer dauerhaften Behinderung führen. Neben dem extremen Leid der Betroffenen und der Einschränkung der Lebensqualität, stellen chronisch Wunden auch eine erhebliche Kostenbelastung für das Gesundheitssystem dar. In den Vereinigten Staaten sind 6,5 Millionen Menschen betroffen, was zu Kosten von mehreren Millionen US-Dollar führt [13, 14]. Am häufigsten tritt ein Ulcus cruris bei Patienten mit chronisch venöser Insuffizienz und peripherer arterieller Verschlusskrankheit (pAVK) auf. Auch Patienten mit Diabetes mellitus haben ein erhöhtes Risiko an einer Wundheilungsstörung zu erkranken. Diese drei Krankheitsbilder sind die Erkrankungen mit den höchsten Inzidenzen in der modernen Gesellschaft [14, 15]. Dies macht deutlich, welche große Relevanz das Verständnis der Wundheilung und die Erforschung ihrer Grundlagen und Störfaktoren sowie die Entwicklung von neuen Behandlungsmethoden hat.

1.2.1 Die Phasen der Wundheilung

Kommt es zu einer Verletzung der Haut, wird der komplexe Vorgang der Wundheilung in Gang gesetzt. Dabei werden verschiedene Phasen mit individuellen Prozessen und Milieubedingungen durchlaufen.

- **Exsudative Phase**
- **Proliferative Phase**
- **Reparative Phase**

Die **exsudative Phase** beginnt mit der Vasokonstriktion und Blutgerinnung (in einigen Veröffentlichungen wird hier noch zwischen der Hämostase und der exsudativen Phase unterschieden). Nach Sistierung der Blutung durch Aktivierung der Gerinnungskaskaden und

Ausbildung eines Fibrinnetzes in der Wunde, schütten Thrombozyten und Leukozyten Wachstumsfaktoren (z. B. *epidermal growth factor*, EGF und *insulin like growth factor*, IGF) und Zytokine (z. B. *transforming growth factor beta*, TGF- β) aus. Neben diesen Faktoren orchestrieren auch die Komponenten der Gerinnungskaskade und des Komplementsystems die folgenden Phasen der Wundheilung. Im Folgenden kommt es zu einer zunehmenden Permeabilität der Gefäße, wodurch Blutplasma austritt und die Wundoberfläche bedeckt. Schon nach 6 Stunden immigrieren neutrophile Granulozyten, angelockt durch die zuvor ausgeschütteten Zytokine, in das geschädigte Gewebe um Bakterien zu phagozytieren und abgestorbene Zellen zu entfernen. Zusätzlich können sie durch die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies Bakterien auch direkt abtöten. Makrophagen, als wichtige Koordinatoren der Immunabwehr, werden von der freiliegenden extrazellulären Matrix aktiviert und beginnen Zelldetritus aufzunehmen, zu proteolysieren und weitere Botenstoffe auszuschütten [3]. Dabei spielen vor allem die Interleukine 1, 6, 8 und 10 eine große Rolle. Diese initiieren die weitere Einwanderung und Aktivierung von Leukozyten und Lymphozyten und wirken damit lokal inflammatorisch. Die Makrophagen phagozytieren auch die nun apoptotischen Neutrophilen, die die Bakterien aufgenommen und zerstört haben. Im weiteren Verlauf transformieren sie und stimulieren nun Fibroblasten, Keratinozyten und die Angiogenese um die proliferative Phase der Wundheilung einzuleiten [16, 17].

Am 3-10. Tag, während der **proliferativen Phase**, kommt es zur Ausbildung eines stark vaskularisierten Granulationsgewebes, bestehend aus einwandernden Fibroblasten und Endothelzellen. Die Neovaskularisation wird durch Hypoxie und einen erniedrigten pH-Wert ausgelöst und durch den VEGF (*vascular endothelial growth factor*) gesteuert. Die Zellen wachsen vom Wundrand her in die Gewebelücke ein und verringern damit nach und nach die Wundgröße und Wundtiefe. Parallel dazu laufen weiterhin die Aufräumprozesse der ersten Wundheilungsphase ab und schaffen Platz für das neue Gewebe. Im Verlauf bilden die Fibroblasten die neue extrazelluläre Matrix durch Produktion von Kollagen und Proteoglykanen, welche dem Gewebe die Stabilität wieder zurückgeben. Durch einsproßende Keratinozyten kommt es zur Reepithelisierung.

In der letzten Phase der Wundheilung (**Reparative Phase**) kommt es zum endgültigen Verschluss der Wunde durch Wundkontraktion und Auflockerung der Matrix. Die Kontraktion wird primär durch die Myofibroblasten bewirkt. Diese differenzieren sich aus Fibroblasten, stimuliert u.a. durch TGF- β , welches zuvor von Makrophagen ausgeschüttet wurde. Myofibroblasten haben kontraktile Elemente in ihrem Zytoskelett und können somit

sich selber und das mit ihnen konnektierte umgebende Gewebe zusammenziehen [18, 19]. Durch Kollagenasen und Elastasen, freigesetzt von Leukozyten, kommt es zu Lockerungen der sehr straffen interzellulären Verbindungen. Die Keratinozyten wachsen vom Wundrand ein und bilden Integrin-Rezeptoren aus, mit denen sie mit Fibrin und Fibronectin in der Extrazellulären Matrix in Kontakt treten können und sich somit im Gewebe bewegen können. Die Verbindung zum Fibrin ermöglicht den Keratinozyten auch eine feste Verbindung zur darunter liegenden Dermis [20]. Diese letzte Phase kann mehrere Jahre dauern. Die Myofibroblasten, die den Hauptteil des Granulationsgewebes ausmachen treten nach und nach in die Apoptose ein. Dadurch wird das Gewebe zellärmer, die Gewebsspannung nimmt ab und die nun vorherrschenden Fibroblasten bilden die typische extrazelluläre Matrix [21, 22]. Bezüglich der Art der Wundheilung wird die epitheliale von der primären und sekundären Wundheilung unterschieden. Die epitheliale Wundheilung zeichnet sich durch eine narbenlose Regeneration von oberflächlichen Schürfwunden aus. Primäre Wunden werden komplikationslos chirurgisch verschlossen und heilen durch die direkte Adaption der Wundränder mit vorwiegend geringer Narbenbildung aus. Demgegenüber steht die sekundäre Wundheilung bei Wunden, die nicht primär verschließbar sind und durch Granulation aus der Tiefe zuheilen und eine Narbe hinterlassen [23-25].

1.2.2 Die chronische Wunde

Die Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaft e.V. (AWMF) definiert in ihrer S3-Leitlinie von 2015 zur Lokalthherapie chronischer Wunden die chronische Wunde als einen „Integritätsverlust der Haut und einer oder mehrerer darunter liegender Strukturen mit einer fehlenden Abheilung innerhalb von acht Wochen.“ [1].

Wunden chronifizieren, weil sie nur einen Teil der oben beschriebenen Phasen der Wundheilung durchlaufen und häufig in der exsudativen Phase stagnieren [26]. Die häufigsten Krankheitsbilder, die durch eine prolongierte Wundheilung definiert sind, sind das Ulcus cruris, der Dekubitus und das diabetische Fußsyndrom [3]. All diesen Erkrankungen liegt eine gestörte Blutzirkulation und die damit einhergehenden Gewebshypoxie zugrunde [27]. Insbesondere bei Diabetikern kommt es durch die Stoffwechselstörungen mit andauernder Hyperglykämie und Glykosylierung von Proteinen zu einer gestörten Autoregulation der kleinsten Blutgefäße, was zu einer Kombination aus Mikroangiopathie und Neuropathie führt. Sie verlieren unter anderem die Fähigkeit der adäquaten Gefäßdilatation, was zu einer verminderten Durchblutung der peripheren Stromgebiete führt

[28-30]. Kleine, zunächst unbedeutende Verletzungen z.B. durch Stöße oder Schnitte bei der Fußpflege, können so zu sehr schmerzhaften und schlecht heilenden Wunden werden.

Zusätzlich ist durch die Hypoxie des Gewebes die Immunantwort und die Zellkommunikation gestört sind. So konnte gezeigt werden, dass Fibroblasten, welche aus an Diabetes mellitus erkrankten Mäusen isoliert wurden, weniger VEGF produzieren, welches essentiell für die Proliferation von Blutgefäßen ist [31]. Eine eher überschießende Immunantwort zeigt sich durch die gesteigerte Einwanderung von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten und einer vermehrten Aktivierung von Proteasen, welche zu einer Zerstörung der extrazellulären Matrix führen [32]. Erschwerend kommt hinzu, dass das feuchte Milieu einer offenen Wunde optimale Bedingungen für eine bakterielle Besiedlung mit Bildung eines Biofilms schafft. Dieser bietet den Bakterien den perfekten Lebensraum, geschützt vor der körpereigenen Immunabwehr und vor lokaler und systemischer Antibiotikatherapie [33, 34].

Im klinischen Alltag sind eine Vielzahl von Therapieoptionen verfügbar, um chronische Wunden zu behandeln. Diese reichen von speziellen Wundverbänden über chirurgisches Debridement bis hin zur elektrischen Vakuumpumpe. Ein zufriedenstellendes Therapiekonzept ist bisher noch nicht gefunden worden, so dass sich immer noch eine Vielzahl der Patienten am Ende doch einer Akren-Amputation unterziehen muss [35].

Auch der wirtschaftliche Faktor von chronischen Wunden ist nicht zu unterschätzen. Insgesamt sind in den USA mehr als 6,5 Millionen Menschen durch gestörte Wundheilungsprozesse betroffen [13, 14]. In Deutschland leiden laut einer Studie aus dem Jahr 2015 der Forschungsgruppe der Primärmedizinischen Versorgung (PVM) allein 2,7 Millionen Menschen an einer komplizierten oder chronischen Wunde [36]. Ähnlich wie in den USA ist die Behandlung dieser Patienten auch in Deutschland sehr teuer und aufwendig und kostet mehr als 5 Milliarden Euro/Jahr. In den nächsten 30 Jahren wird eine Verdopplung der Anzahl der Behandlungsbedürftigen chronischen Wunden erwartet, ausgelöst durch den demografischen Wandel [37]. Insbesondere eine gesteigerte Prävalenz des Diabetes mellitus Typ II durch eine längere Lebenserwartung, Bewegungsmangel und Fettleibigkeit wird zu einem gehäuften Auftreten des diabetischen Fußsyndroms führen. In Deutschland waren 2018 bereits 6,5 Millionen Menschen an Diabetes mellitus erkrankt, 95 % davon an Typ II [38]. Ungefähr 15 % dieser Patienten entwickeln ein diabetisches Fußsyndrom (ca. 900.000 Patienten). Neben der Epidemiologie und den wirtschaftlichen Faktoren der Versorgung, müssen aber auch die körperlichen und psychischen Auswirkungen der Erkrankung beachtet werden. Die betroffenen Menschen leiden sehr unter dauerhaften Schmerzen,

Mobilitätseinschränkungen und sozialer Ausgrenzung, z.B. auf Grund von Arbeitsunfähigkeit [39, 40].

1.3 Physikalisches Plasma

Physikalisches Plasma wird neben fest, flüssig und gasförmig als der vierte Materiezustand bezeichnet und hat in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung in der medizinischen Forschung gewonnen. Seitdem Plasma bei Raumtemperatur generiert werden kann, ist es auch auf empfindlichem Gewebe anwendbar. Das, was Plasma so außergewöhnlich und gleichzeitig so kompliziert macht, sind seine verschiedenen, vielfältigen Bestandteile und deren Effekte auf Zellen, Gewebe und Lebewesen.

1.3.1 Eigenschaften

Plasma wurde erstmals 1928 von Irving Langmuir beschrieben. Er bezeichnete es damals als „strongly ionized gas at low pressure“ [6]. Durch Zufuhr von Energie werden Ionen, Atome und vor allem Elektronen eines Gases in Bewegung versetzt. Durch Stoßionisation werden die Elektronen beschleunigt und aus ihren Umlaufbahnen katapultiert. Diese freien Elektronen reagieren mit anderen Teilchen und es entstehen unter anderem radikale Stickstoff- und Sauerstoffspezies. Weitere Bestandteile wie UV-Strahlen (UVA, UVB, UVC), Ionen, neutrale Atome und Wärme werden innerhalb des elektrischen Feldes generiert. Diese Komponenten bestimmen die Wirkung des Plasmas.

Komplex wird das Plasma durch die verschiedenen Faktoren, die Einfluss auf seine Zusammensetzung und damit auf seine Wirkung nehmen. Charakterisiert wird es unter anderem durch seine Teilchenzusammensetzung, Temperatur, Art der Erzeugung, räumliche Verteilung und Stärke des elektrischen Feldes. Diese Faktoren können individuell „designed“ und so passend zum Anwendungsgebiet optimiert werden [41]. Vor allem der Faktor Temperatur war bislang limitierend für den Einsatz von Plasma an lebendem Gewebe. Bei heißem Plasma ($> 80\text{ °C}$) haben alle Bestandteile die gleiche relative Temperatur und geben diese an ihre Umgebung ab. Diese Plasmaform wird schon seit vielen Jahren in der Sterilisation [7] und chirurgischen Kauterisation [42] benutzt. Bei kaltem Plasma wird nur so viel Energie hinzugefügt, dass die kleinsten Bestandteile des Gases, nämlich die Elektronen, in Bewegung gebracht werden, während die sehr viel größeren Ionen sich nicht bewegen. Der Größenunterschied zwischen Ionen und Elektronen ist so groß, dass die thermische Energie der Elektronenbewegung keinen Einfluss auf die Gesamttemperatur des Plasmas hat. So

entstehen maximal Temperaturen von 40 °C [43]. In dieser Arbeit wurde ausschließlich Kaltplasma verwendet.

1.3.2 Plasmaquellen

Kaltes Plasma wird immer durch einen Energiefluss zwischen zwei Elektroden erzeugt. Der Begriff direktes bzw. indirektes Plasma bezieht sich auf die Art, wie das Plasma auf die Oberfläche geleitet wird und ob ein neutrales Trägergas oder die Umgebungsluft benutzt wird. Hieraus ergeben sich die Unterschiede in der Zusammensetzung und der Anwendungsmöglichkeiten des Kaltplasma.

1. Direktes Plasma

Bei dieser Methode ist die zu behandelnde Oberfläche die Gegenelektrode und die aktiven Teilchen werden direkt an dieser Oberfläche erzeugt [44]. Die energieverzeugende erste Elektrode ist mit Keramik überzogen, so dass es zu einer abgeschwächten Entladung kommt, die sich homogen, in Form von vielen kleinen Blitzschlägen an einer ungleichmäßigen Oberfläche entlädt (siehe Abb. 2). Wichtig ist, dass der Abstand zwischen Elektrode und Oberfläche gleichmäßig ist und nicht mehr als 1-2 mm beträgt. Als Gas wird die Umgebungsluft benutzt. Das hierfür benutzte Gerät wird als „dielectric barrier discharge“, kurz DBD bezeichnet. Durch die direkte Entladung trifft die gesamte Bandbreite der erzeugten Teilchen auf die Oberfläche, auch die geladenen Teilchen. [43]. Bei der Anwendung am Patienten kann es nachteilig sein, dass die Elektrode so nah an der Haut eingesetzt werden muss. Hautfalten oder Haare können die homogene Entladung des Plasmas stören.

2. Indirektes Plasma

Indirekte Plasmen werden an zwei gleich aufgebauten Elektroden erzeugt und dann mit einem Gasstrom (z.B. Helium, Argon oder Umgebungsluft) auf die zu behandelnde Oberfläche transportiert. Das Plasma wird dabei als schmaler Gas-Strahl sichtbar [45]. Die behandelte Oberfläche ist hierbei nicht Teil eines elektrischen Feldes, wodurch vor allem ungeladene Teilchen transportiert werden. Ein bereits in der klinischen Anwendung etabliertes Gerät ist der Plasmajet (skINPen® MED, neoplas tools GmbH, Greifswald). Anhand dieses Geräts wurde eine DIN-Spezifikation festgelegt, um das diese Art der Plasmaerzeugung vergleichbar zu machen und einen Standard festzulegen [46]. Aufgrund der homogenen Verteilung durch das Trägergas kann der Abstand der Elektroden individuell angepasst werden und auch unebene Oberflächen werden gut erreicht. Zusätzlich wird eine individuelle Anpassung an die

Größe der zu behandelnden Oberfläche ermöglicht. Nachteilig ist, dass durch das Fehlen von geladenen Molekülen weniger Möglichkeiten zum Verändern der Plasmazusammensetzung bestehen [43] und es scheint dadurch ineffektiver bei der Abtötung von Bakterien zu sein [47].

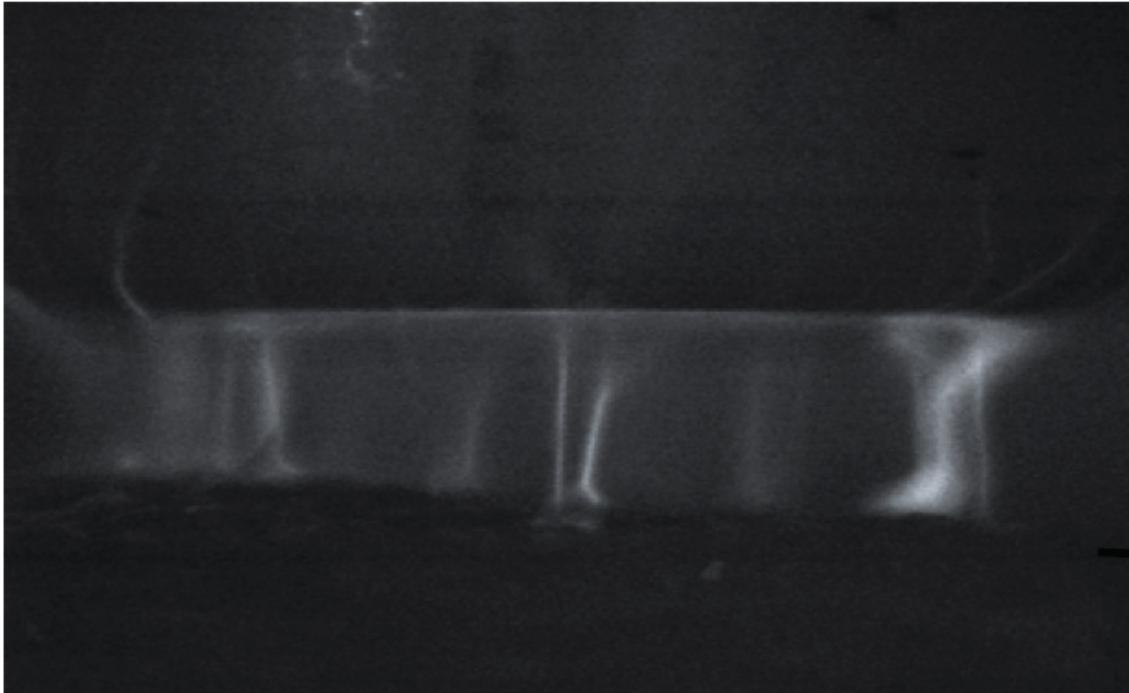


Abb. 2: Blitzförmige Entladung an der Keramikelektrode eines DBD-Plasmasticks

(aus Heuer *et al.*, The topical use of non-thermal dielectric barrier discharge (DBD): Nitric oxide related effects on human skin, Nitric Oxide 44 (2015) 52–60 2014)[48]

1.3.3 Allgemeine Effekte von Kaltplasma

Das am grundlegendsten erforschte Gebiet in der Plasmamedizin ist die Sterilisation. Schon eine kurze Plasmaanwendung von einigen Sekunden führt zu einer signifikanten Reduktion der Bakteriendichte [45, 49-51]. Dabei wird angenommen, dass die Zerstörung der bakteriellen DNA durch UV-Strahlen und die Aufnahme von reaktiven Spezies und die damit einhergehende Modifizierung und Destruktion von Proteinen die toxischen Effekte bedingen [7, 52, 53]. Auch bisher schwer zu behandelnde Biofilm-bildende und multiresistente Keime konnten durch eine Plasmabehandlung signifikant reduziert werden [54-57]. Es konnte zwar noch keine wirksame Bekämpfung von Prionen mittels Plasma nachgewiesen werden, allerdings wurde die Reduzierung eines Prionen-Protein-Modells durch Plasma beschrieben [58, 59]. Der Vorteil des Kaltplasmas im Gegensatz zu bisherigen Sterilisationsmethoden ist die kontaktlose, normotherme, schmerzlose und einfache Anwendung. Bereits kurze

Behandlungszeiten sind ausreichend. Außerdem können selbst inhomogene und poröse Oberflächen gut erreicht und dekontaminiert werden.

Viele Studien beschäftigten sich auch mit den Effekten von Plasma auf gesunde Säugetierzellen wie Endothelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten, um die zellulären Effekte zu erklären und die potenzielle Toxizität zu bestimmen.

Es wurde nachgewiesen, dass die Plasmaeffekte zeit- und dosisabhängig sind (siehe Abb. 3) [47, 60-63]. Studien zeigten, dass längere Behandlungszeiten bzw. höhere Dosen zu einem Absterben der behandelten Zellen führen können, kürzere Behandlungszeiten können hingegen eine gesteigerte Proliferation auslösen. In diesem Fall führt die Plasmabehandlung zu einer erhöhten Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus den Fibroblasten, führend ist hierbei der Fibroblastenwachstumsfaktor 2 (FGF-2). Initiiert wird die vermehrte Freisetzung von FGF-2 durch reaktive Sauerstoffspezies [47, 64-66].

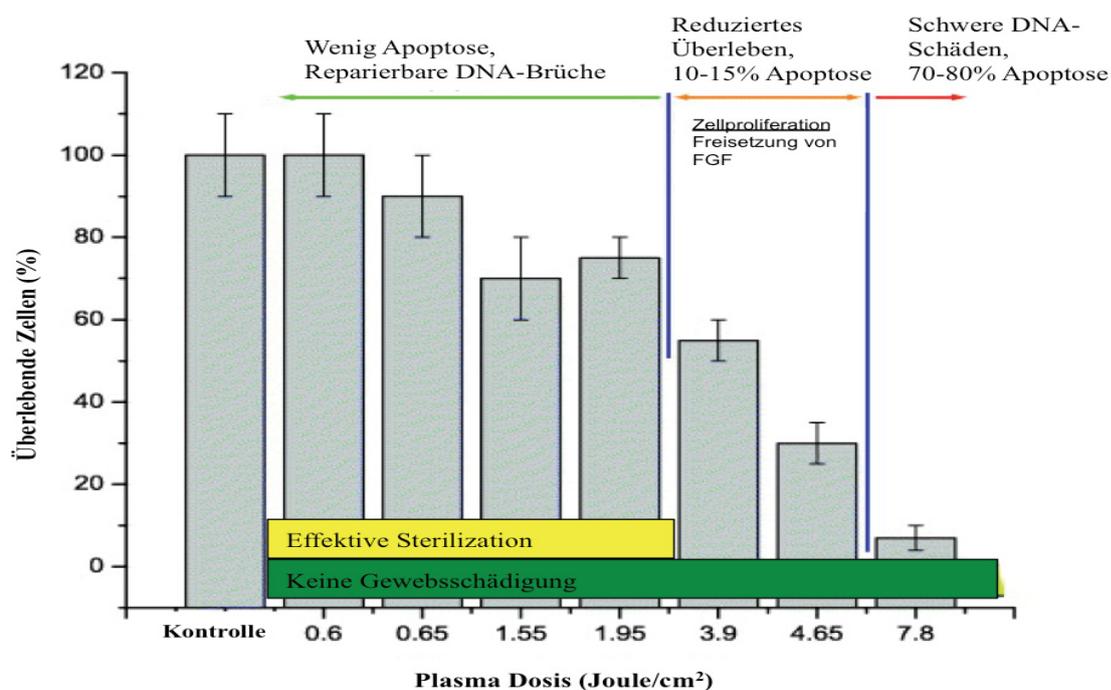


Abb. 3: Zusammenfassung der Effekte verschiedener Plasma-Dosen auf menschliche Zellen (entnommen aus Dobrynin *et al.* 2009 [47], modifiziert) Die Grafik zeigt, dass es im Bereich der Energie (bis 1,95 J/cm²) die zur effektiven Sterilisation nötig ist, lediglich zu einer geringen Apoptoserate kommt und DNA-Brüche reparabel sind. Höhere Dosen führen zur Steigerung der Apoptoseraten und verringern das Überleben der Zellen.

Diese können allerdings auch bei humanen Zellen DNA-Schäden auslösen, wie Blackert *et al.* mit einem DBD-Plasmastick in HaCaT Keratinozyten (permanente epitheliale humane Zelllinie) festgestellt haben. Durch Austausch des Zellkulturmediums direkt nach der Behandlung, kam es zu viel geringeren Effekten auf die Zellen, als wenn die Zellen in ihrem

Medium belassen wurden. Daraus lässt sich schließen, dass einige langlebige ROS in flüssigem Medium akkumulieren und so zu einer weiteren Steigerung der Plasmaeffekte führen. Ergänzend konnten Blackert *et al.* zeigen, dass sich die behandelten Zellen nach 24 Stunden vor allem in Phase G1 und G2/M befanden, also in dem Teil des Zellzyklus in dem es zu DNA- Kontrollen und Reparaturen kommt. Dabei scheinen die DNA-Schäden bei moderaten Behandlungszeiten reversibel zu sein, siehe Abb. 3 [62, 63]. Trotzdem sind die Behandlungsmodi, die bakterizid sind, zu mindestens in der aktuellen Studienlage bisher nicht schädlich für Säugetierzellen [47, 67].

Auch in der Tumorforschung wird Plasma als Therapiealternative untersucht. Dabei scheint Plasma ebenfalls selektiv auf die Tumorzellen zu wirken, ohne gesunde Zellen zu beschädigen. So konnte gezeigt werden, dass Lungenkrebszellen (SW900-Zelllinie) nach der Plasmabehandlung vermehrt apoptotisch werden, während gesunde Bronchialzellen kohärent und vital blieben [68]. Weitere Studien unterstützen diese Ergebnisse und haben gezeigt, dass es über spezifische Gen-Aktivierung zu einer Phosphorylierung von MAP-Kinasen (*mitogen-activated-protein-Kinasen*) kommt und dadurch eine Kaskade ausgelöst wird, die zur Apoptose von Melanomzellen führt [69]. Ursächlich für die Toxizität scheinen wiederum auch hier die reaktive Sauerstoffspezies zu sein, unterstützt durch die Tatsache, dass Tumorzellen als schnellproliferierende Zellen sensibler auf oxidativen Stress reagieren [68, 70, 71].

Als Ursache für die selektive Wirkung von Kaltplasma auf Tumorzellen und Bakterien scheinen mehrere Faktoren wichtig zu sein:

- 1) Bakterien haben ein kleineres Volumen bei einer größeren Oberfläche, so dass schon geringe Dosen zu einer schnelleren intrazellulärer Akkumulation von reaktiven Spezies führen.
- 2) Bakterien und auch Tumorzellen haben einen schnelleren Metabolismus und nehmen toxische Stoffe eher und schneller auf.
- 3) Bakterielle DNA und Tumorzell-DNA sind nicht kondensiert und dadurch anfälliger für die oben beschriebenen DNA-schädigenden Substanzen [47, 72].

Diese Effekte auf menschliche Zellen, Tumorzellen und Bakterien wurden sowohl bei der Behandlung mit einem DBD-Plasmastick [43, 47, 60-62], als auch bei der Behandlung mit Helium- oder Argon-Plasmajets [63, 72, 73] beobachtet.

Zusätzlich kann Kaltplasma das Migrationsverhalten von Fibroblasten und Endothelzellen fördern [66, 73, 74]. Dabei führt schon eine 30-sekündige Behandlung zu einem 2-fach schnelleren Verschließen eines 500 µm breiten Spalts innerhalb einer Fibroblastenkultur [74]. Endothelzellen wuchsen im selben Assay 40-fach schneller aufeinander zu und erreichten auch in einer 3D-Gel-Matrix schneller den Boden nach einer DBD-Plasmabehandlung als die unbehandelten Zellen [66].

Einen weiteren essentiellen Effekt konnten Leduc *et al.* nachweisen, indem sie zeigten, dass kaltes Plasma Zellen permeabilisieren kann. Über einen noch unklaren Mechanismus entstand nach der Plasmabehandlung eine 6,5 nm große Pore in der Zellmembran. Durch diese Pore war eine Plasmid-Transfektion möglich [75]. Dadurch ergibt sich ein Erklärungsansatz, wie auch größere, potenziell toxische Stoffe in die Zelle gelangen können.

Insgesamt wird deutlich, dass es eine Vielzahl von Kaltplasmaeffekten auf Zellen und Gewebe gibt und ein Großteil dieser Effekte bisher nur in Ansätzen erklärt werden konnte. Zu beachten sind, neben den durch die reaktiven Spezies ausgelösten Effekten, auch die direkten Auswirkungen einer Plasmaanwendung. Eine Behandlung mit einem Plasmajet kann aufgrund des Luftstroms zu einer Austrocknung der Zellen in der Zellkultur und damit zu einem Absterben der Zellen führen [76]. Diesem Effekt wurde durch eine Benetzung der Zellkultur mit flüssigem Medium entgegen gewirkt. Allerdings kann dieses Medium, je nach Zusammensetzung die Plasmaeffekte verstärken oder inhibieren [77]. Dieser Punkt macht auch die Übertragung der Ergebnisse auf *in vivo* Studien schwieriger und zeigt, dass die Steuerbarkeit von kaltem Plasma nicht nur von der Plasmaquelle, sondern auch von umgebenden Faktoren abhängig ist.

1.3.4 Wirkung von Kaltplasma auf die Wunde

Neben der in Kapitel 1.2.3 beschriebenen Dekontamination der Wunde durch Kaltplasma, spielt auch die Beeinflussung von zellulären Prozessen eine große Rolle. Wundheilung ist ein komplexer dynamischer Prozess, bei dem viele Faktoren wie Zellkommunikation, Zellaktivierung, pH und Durchblutung zusammen wirken. Plasma kann auf viele dieser Faktoren einen regulierenden Einfluss haben, welcher bislang noch kaum verstanden ist.

In einigen Studien konnte bereits nachgewiesen werden, dass Kaltplasma neben der Reduktion der Bakterienlast in der Wunde, auch zu einer schnelleren Reduktion der

Wundgröße führt [8, 56, 78, 79]. Xu *et al.* konnten an 50 Mäusen nachweisen, dass eine Behandlung von 30 s mit einem Argon Plasmajet zu einem signifikant schnelleren Wundverschluss als bei einer natürlich heilende Wunden führt. Dabei zeigte sich zusätzlich, dass eine verlängerte Behandlungszeit von 50 s zu einer langsameren Wundheilung führt [80]. Andere Studien stützen die dort gestellte These, dass eine höhere Plasma-Dosis zu einer Verschlechterung der Wundheilung führen kann. Es wurde auch gezeigt, dass verschiedene Bakterienspezies unterschiedlich sensibel auf die Plasmabehandlung reagieren [56]. Verantwortlich für einen eher schnelleren Wundverschluss scheinen die schon in Kapitel 1.2.3. beschriebene erhöhte Proliferation und stimulierte Migration von Fibroblasten und Keratinozyten zu sein, die beide eine wichtige Rolle im Wundverschluss spielen [81]. Welche genauen molekularen Signalwege zu diesen Effekten führen ist noch nicht vollständig geklärt [64, 74, 82]. Allerdings basieren die Studien mit signifikanten Ergebnissen bisher nur auf Mausmodelle. Die Anwendung von Plasmageräten an menschlicher Haut und Wunden wurde bis dato nur an sehr kleinen Patientenkollektiven durchgeführt und zeigte zwar einen teilweise schnelleren Wundverschluss und eine antiseptische Wirkung, allerdings waren diese Ergebnisse nicht signifikant [83].

Immer wieder wird auf die bedeutende Rolle der reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS und RNOS) hingewiesen, die Einfluss auf den Zellstoffwechsel nehmen. In vielen der hier zitierten Studien wurde nachgewiesen, dass die Plasmaeffekte durch eine artifizielle Hemmung der reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies geringer sind bzw. nicht mehr nachweisbar sind. Die reaktiven Spezies können z.B. über direkte Interaktion mit der DNA die beschriebenen Effekte auslösen. Arndt *et al.* konnten zeigen, dass nach einer Kaltplasmabehandlung von Fibroblasten mit einer indirekten Plasmaquelle eine erhöhte Genexpression von Schlüsselgenen der Wundheilung vorliegt. Dazu zählen sowohl Gene, die die Ausschüttung von Zytokinen als auch die Produktion von Wachstumsfaktoren steuern.

Neben IL-6 und IL-8, als Zytokine der inflammatorischen Phase der Wundheilung, wurde auch α -SMA vermehrt gebildet. Es induziert die Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten. Sie sind essentiell für die Bildung der extrazellulären Matrix und für die Wundkontraktion. Dies unterstützend wurde eine erhöhte Bildung von Kollagen Typ I nach Plasmabehandlung nachgewiesen [74]. Ähnliche Effekte wurden auch bei Osteoblasten nach einer Behandlung mit einer DBD-Elektrode gesehen [84]. Eine Regulierung, welche Gene verändert werden und ob die Veränderungen wieder reversibel sind, wurde bisher nicht beschrieben. Der Mechanismus der Gen-Manipulierung scheint über die Oxidation und

dadurch bedingte Modulierung von Proteinen und durch direkte Oxidation der DNA gesteuert zu werden [85].

Die Neoangiogenese, ein wichtiger physiologischer Prozess in der Wundheilung, wird durch Sauerstoffmangel und verschiedenste Faktoren, wie Zytokine und Wachstumsfaktoren aber auch durch ROS und RNOS gefördert [82]. Arjunan *et al.* konnten zeigen, dass die Plasmabehandlung mit einer DBD-Elektrode zu einer erhöhten Proliferation und Formation von *in vitro* Endothelzellen aus der Schweineaorta führt. Ursächlich dafür scheint erneut das FGF-2 zu sein, welches durch plasmagenerierte ROS freigesetzt wird [66]. Es zeigte sich, dass für die Angiogenese relevante Zytokine durch die Plasma-Behandlung vermehrt von Fibroblasten und Keratinozyten ausgeschüttet werden und die Neoangiogenese in plasmabehandelten Wunden von Mäusen erhöht ist [8]. Zusätzlich führt Kaltplasma im Gegensatz zu Heißplasma über einen nicht-thermischen Weg zu einer schnelleren Blutgerinnung. Hierfür scheint eine Änderung der Proteinzusammensetzung und eine Aktivierung von Gerinnungsfaktoren verantwortlich zu sein, unabhängig davon, ob das Blut zuvor antikoaguliert wurde oder nicht [43, 47]. Dies ist ein wichtiger Mechanismus, um eine Wunde frühzeitig zu verschließen und den Wundheilungsprozess zu beschleunigen.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass NO-Derivate die Wundheilung durch direkten Einfluss auf verschiedenste zelluläre Mechanismen, wie z.B. die Kollagenproduktion, Zellproliferation, -aktivierung und -migration fördern [5, 86-88]. Als wichtiges Bestandteil von Kaltplasma konnte nachgewiesen werden, dass plasmageneriertes NO, im Fall der zitierten Studie generiert aus heißem Plasma mit einer anschließenden Abkühlung auf Raumtemperatur, zu einem signifikant schnelleren Wundverschluss bei septischen und aseptischen Wunden von Ratten führte (800-1000 ppm NO). Zusätzlich konnten die Verfasser nachweisen, dass sich im behandelten Gewebe mit einigen Minuten Verzögerung Nitroso-Eisen-Komplexe bilden und so die Bioverfügbarkeit von NO im Gewebe auch mehrere Minuten nach der Behandlung erhöht bleibt [89]. Doch alle beschriebenen Studien sehen die Effekte bedingt durch ein Zusammenspiel von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies, die regulatorisch auf die zellulären Prozesse der Wundheilung Einfluss nehmen.

1.4 Stickstoffmonoxid

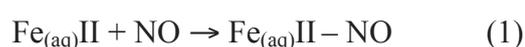
Die Entdeckung, dass Stickstoffmonoxid (NO) ein wichtiges Signalmolekül im Körper ist, bescherte 1998 Robert Furchgott, Louis Ignarro und Ferid Murad den Nobelpreis der Medizin. Über 18 Jahre zuvor entdeckten Furchgott und Zawadzki ein Molekül, welches nach Acetylcholin-Gabe Einfluss auf die Kontraktilität von Blutgefäßen nahm [90]. Es wurde

zunächst *endothelium-derived relaxing factor* (EDRF) genannt. Ignarro *et al.* identifizierten es dann 1987 als NO, in dem sie die Eigenschaften des EDRF mit denen von NO verglichen [91]. Seitdem wurden immer mehr Funktionen und Wirkungen von NO in der Säugetierphysiologie erforscht.

1.4.1 Eigenschaften

Stickstoffmonoxid ist ein anorganisches farbloses Gas, das, trotz seiner radikalen Eigenschaften, nur eine Halbwertszeit von 2-3 s in biologischen Systemen hat. Im Körper liegt es in Konzentrationen im μM -Bereich vor. Dort kann es durch seine geringe Masse und seine hydrophoben Eigenschaften gut durch Zellmembranen diffundieren. In der Zelle fungiert es als multifunktionelles Signalmolekül und nimmt Einfluss auf viele Stoffwechselwege [92, 93]. *In vivo* wird NO durch die NO-Synthasen (NOS) produziert, wobei man die konstitutiven endothelialen NO-Synthasen (eNOS) und neuronalen NO-Synthasen (nNOS) von den induzierbaren NO-Synthasen (iNOS) unterscheiden muss. Sie katalysieren alle die Freisetzung von NO aus L-Arginin unter Verbrauch von Sauerstoff und NADPH. Der NO-Metabolismus über die NO-Synthasen ist abhängig von der Arginin-Konzentration, denn die Aminosäure ist das einzige Substrat zur endogenen NO-Produktion. Die neuronalen und endothelialen NOS liegen in verschiedenen Zelltypen vor, wie z. B. Muskelzellen, Fibroblasten und Myokardzellen [94-97], sind aber nach den Zellen benannt, aus denen sie zuerst isoliert wurden. Sie werden durch Kalziumionen aktiviert. Die induzierbare NOS wird ebenfalls aus einer Vielzahl von Zellen freigesetzt, unter anderem auch aus Makrophagen. Sie wird durch Zytokine (z.B. $\text{TNF}\alpha$) oder bakterielle Endotoxine während einer Inflammation stimuliert und benötigt keine Aktivierung durch Kalzium [92]. Die aktivierte iNOS produziert NO im mikromolaren Bereich während die konstitutiven NO-Synthasen nanomolare Konzentration erzeugen [98].

NO besitzt ein freies Elektron und reagiert dadurch schnell mit anderen Molekülen. Die direkten Effekte beruhen auf der Bindung von NO an Metallkomplexen. Dabei kommt es zu einer Reduktion des Metallkomplexes (1). Diese Reaktion wird Nitrosylierung genannt. Ein Großteil der Eisenverbindungen existiert in Form von Hämproteinen. Im Wesentlichen befinden sich Hämproteine in Guanylatzyklasen, Cytochrome P450-Komplexen und im Hämoglobin (2). Durch die Bindung von NO an diese Komplexe kommt es zu einer Aktivierung dieser Komplexe, was verschiedene Effekte auslöst. Im Falle der Guanylatzyklase kommt es zu einer Vasodilatation, andere Effekte sind die Aktivierung der Thrombozytenaggregation und weitere Signalinduktionen [99, 100].





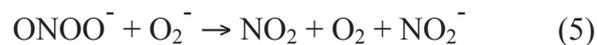
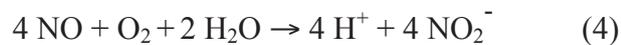
Neben der direkten Reaktion von NO mit Metallkomplexen, gibt es ebenso schnell ablaufende Reaktionen mit freien Radikalen. Erwähnenswert ist hier die Reaktion von NO mit einem Superoxid (O_2^-). Superoxide entstehen im oxidativen Stoffwechsel oder als Substrat der Superoxide-Dismutase. Als Produkt der Reaktion von NO und O_2^- entsteht Peroxynitrit (ONOO^-), (3). Als starkes Oxidans wirkt Peroxynitrit über die Oxidation von verschiedenen Molekülen zytotoxisch, unter anderem durch die Hemmung der Atmungskette in den Mitochondrien [98, 101]. In physiologischen Verhältnissen kommt Peroxynitrit nur in geringen Konzentrationen vor und es besteht ein Gleichgewicht zwischen dem Oxidator und dem Antioxidans, in diesem Fall Gluthation (GSH) [102]. Kommt es allerdings zu einer Inflammation und Einwanderung von Bakterien, wird mehr Peroxynitrit gebildet. In den Phagosomen von aktivierten Makrophagen konnte ein erhöhter Verbrauch von NO und O_2^- gemessen werden und gezeigt werden, dass dadurch generierte Peroxynitrit phagozytierte Bakterien abtötete [103, 104].



Die Synthese von Peroxynitrit wird als *indirekte* Reaktion bezeichnet, da die Anwesenheit von Sauerstoff nötig ist. Dabei werden neben dem Peroxynitrit auch Stickoxide wie Distickstofftrioxid (N_2O_3) oder Distickstofftetroxid (N_2O_4) unter Verbrauch von Sauerstoff gebildet. Über diesen etwas langsameren und ebenfalls sauerstoffabhängigen Weg, nimmt NO Einfluss auf verschiedene Stoffwechselwege in der Zelle [105]. Diese Prozesse werden im Wesentlichen durch die Bildung von S-Nitrosothiolen (SNO) gesteuert. S-Nitrosothiole entstehen durch die Nitrosilierung von Thiolgruppen der Aminosäure Cystein. Durch die Nitrosilierung kommt es zu posttranslationalen Proteinmodifikationen [106, 107]. Dabei werden sowohl Kinasen (z.B. GAPDH) als auch ATPasen (Na/Ka-ATPase) und Ionenkanäle nitrosiliert [108]. Insgesamt haben nitrosilierte Verbindungen eine viel längere Halbwertszeit (Nitrosothiole: ca. 40 min) als freies NO und wirken über Inhibierung, Aktivierung und Modulation [101]. Gleichzeitig dienen sie als NO-Donatoren und erhöhen so die biologische Verfügbarkeit von NO, unabhängig von der enzymatischen Synthese [109]. Die reversible Modifizierung von Enzymen durch NO scheint im Zellstoffwechsel einen ähnlichen Stellenwert wie die Phosphorylierung und Acetylierung zu haben [110]. Aber auch die Denitrosylierung erfüllt eine wichtige Regulatorfunktion und kann z.B. Apoptose induzieren

aber auch vor nitrosativem Stress schützen [111].

Weitere Produkte der Oxidation von NO sind neben Peroxynitrit und Distickstofftrioxid auch die stabileren Verbindungen Nitrit (NO_2^-) und Nitrat (NO_3^-) (4-6). Nitrat entsteht durch die Oxidation von Oxyhämoglobin mit NO (2). Sie sind beide relativ stabile Moleküle und können sowohl endogen produziert, als auch exogen aufgenommen werden. Interessant ist ihre Funktion als NO-Donatoren: in hypoxischen Zuständen wird aus Nitrit und Nitrat über eine Reduktions-Reaktion NO generiert und kann damit gefährliche NO-Defizienzen ausgleichen und den Sauerstoffmangel beheben, z.B. durch eine NO-induzierte Vasodilatation [112].



Geringere Konzentrationen von NO führen eher zu *direkten* Reaktionen mit Häm-Molekülen [98]. Höhere Konzentrationen führen zu einem erhöhten Aufkommen von reaktiven Molekülen im Zuge der *indirekten* Reaktionen, welche langfristig zu extremeren und toxischeren Effekten auf den Zellstoffwechsel führen. Die spezifische Wirkung von NO wird also im Wesentlichen von seiner Konzentration und dem Vorkommen von Sauerstoff bestimmt [100, 105].

1.4.2 Wirkung in der Haut

In der Haut wird NO hauptsächlich in den Fibroblasten und Endothelzellen gebildet. In den Fibroblasten wird die eNOS exprimiert, die sich vor allem perinukleär nachweisen lässt und im Vergleich zu Endothelzellen eher wenig NO freisetzt. Durch Inflammation stimuliert, wird auch die iNOS aktiviert und setzt NO frei [94]. In den Endothelzellen der kleinen Hautgefäße wurden die beiden NO-Synthasen ebenfalls nachgewiesen [113, 114]. Bemerkenswert ist, dass bei chronischen Hauterkrankungen wie z. B. Psoriasis die normalerweise nur zeitweise nachweisbare iNOS, auch langfristig exprimiert wird [115, 116]. Dies ist nur einer von vielen Indikatoren, die auf eine essentielle Funktion von NO im Stoffwechsel der Haut schließen lassen [117].

Die vasodilatatorische Funktion des NO wird primär durch erhöhte, blutflussinduzierte Scherkräfte am Endothel vermittelt [118]. Zusätzlich führen auch andere chemische, humorale und physikalische Reize zu einer NO-Freisetzung im Endothel [119]. Die NOS wird durch einströmendes Ca^{2+} angeregt. Das daraufhin freigesetzte NO aktiviert die lösliche Guanylatzyklase (sGC), was zur Bildung von cGMP führt und die senkt die zelluläre Ca^{2+} -Konzentration. Das führt zu einer Entspannung der Gefäßmuskulatur. Aber auch unabhängig von der cGMP-Aktivierung kommt es zu einer Relaxation der Gefäßmuskulatur über die direkte Regulierung von Ca^{2+} -abhängigen K^{+} -Kanälen, orchestriert über die in Kapitel 1.3.1 beschriebene S-Nitrosylierung von Thiolgruppen [120, 121].

In der Haut kommt es durch UV-Strahlung zur Irritationen, sichtbar durch Rötung und Überwärmung an den betroffenen Stellen. Ursächlich dafür ist die Hochregulierung der eNOS und der damit verbundenen und oben schon beschriebenen Vasodilatation durch die Bildung von cGMP. Dieses Phänomen beschrieben erstmals Deliconstantinos und Kollegen 1992, nachdem sie die NO- und cGMP-Konzentrationen sowie die Aktivität der eNOS in humanen Endothelzellen nach der Bestrahlung mit UV-B-Licht (60 mJ/cm^2) bestimmt hatten [122]. Durch weitere Studien konnte festgestellt werden, dass nicht nur der gesteigerte Blutfluss [123], sondern auch die, auf eine UV-B-Bestrahlung folgende Inflammation in der Haut durch NO vermittelt wird, spezifischer durch das schon in Kapitel 1.3.1 beschriebene Peroxynitrit [124]. Durch UV-B-Bestrahlung wurde ebenfalls eine gesteigerte Aktivierung der iNOS in Maus- und humanen Keratinozyten nachgewiesen. Das vermehrt synthetisierte NO wirkt nach UV-Bestrahlung durch Hemmung der Apoptose schützend auf die Keratinozyten. Dabei muss betont werden, dass dieser Effekt vor allem bei einer längeren und nur gering erhöhten NO-Konzentration auftritt [125]. Paradoxerweise zeigt sich, dass bei UV-B-Bestrahlungen in geringerer Intensität ($2,5\text{-}25 \text{ mJ/cm}^2$) eine Inhibierung der Zytokin-induzierten Aktivierung der iNOS in murinen Keratinozyten und Makrophagen nachzuweisen ist, wobei die direkte Aktivierung der konstitutiven NOS nicht inhibiert wird [126, 127]. Ergänzend konnte nachgewiesen werden, dass die endogene NO-Produktion auch Einfluss auf die gesteigerte Melanogenese hat, welche ebenfalls durch die Bestrahlung mit UV-Licht induziert wird. Dabei wurde neben der erhöhten Produktion von Melanin auch eine gesteigerte Aktivität der iNOS in Keratinozyten nach UV-B-Bestrahlung festgestellt, was auf eine Verbindung dieser beiden Prozesse schließen lässt [128]. Insgesamt scheint NO eine wichtige Rolle in der physiologischen Schutzreaktion der Haut auf UV-Strahlung zu spielen.

Allerdings zeigen Beispiele von überschießender Aktivierung der NO-Synthasen, dass das Gleichgewicht zwischen Protektion und toxischer Wirkung sehr sensibel ist. Ein Beispiel

dafür sind das Steven-Johnson-Syndroms (SJS) und die toxische epidermale Nekrose (TEN), beides Symptomkomplexe deren Hauptmerkmal die am ehesten medikamenteninduzierte Ablösung der Epidermis ist und sehr schwere und komplizierte Verläufe zeigen [129]. Es zeigte sich, dass in Hautbiopsien von Patienten mit diesen Erkrankungen die Expression der iNOS extrem hochreguliert war [130]. Unterstützend konnte nachgewiesen werden, dass NO in hohen Konzentrationen auf die Haut aufgetragen, zu einer Erhöhung der Apoptoserate und einer Akkumulierung des p53-Proteins, ein Transkriptionsfaktor zur Apoptoseregulation, führt [131]. Weitergehend führt eine Akkumulation von NO in der Zelle nach Aktivierung der iNOS zur Hemmung der antiapoptotischen Bcl-2-Proteine und Aktivierung der Apoptose-assoziierten Caspasen [132, 133].

Wie in allen physiologischen Systemen gibt es auch im NO-Stoffwechsel Feedbackmechanismen, die eine zu hohe Akkumulation verhindern sollen. Einer davon führt über den Transkriptionsfaktor NF- κ B. Dieser wird durch eine S-Nitrosilierung inhibiert, was zu einer Hemmung der Transkription der iNOS führt [134]. Unabhängig davon zeigt es aber auch, dass NO in der Lage ist, Einfluss auf die Transkription zu nehmen und die Expression von Proteinen gezielt zu beeinflussen. Hemish *et al.* haben 2003 die Funktion einer Vielzahl von Genen nach Einsatz des NO-Donors S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) bestimmt und konnten darstellen, dass NO im Prinzip auf alle wesentlichen Prozess des Zellstoffwechsels Einfluss nimmt (siehe Abb. 5) [135]. Nach Aktivierung der iNOS konnten ähnliche Ergebnisse gesehen werden. NO reguliert unter anderem auch die Proliferation von Zellen. Diese Effekte sind allerdings stark dosisabhängig. Mit Hilfe des Vasodilatators und NO-Donors SNAP konnten Garg *et al.* nachweisen, dass die Proliferation und Zellteilung von Fibroblasten bei hohen NO-Konzentrationen gehemmt ist [136]

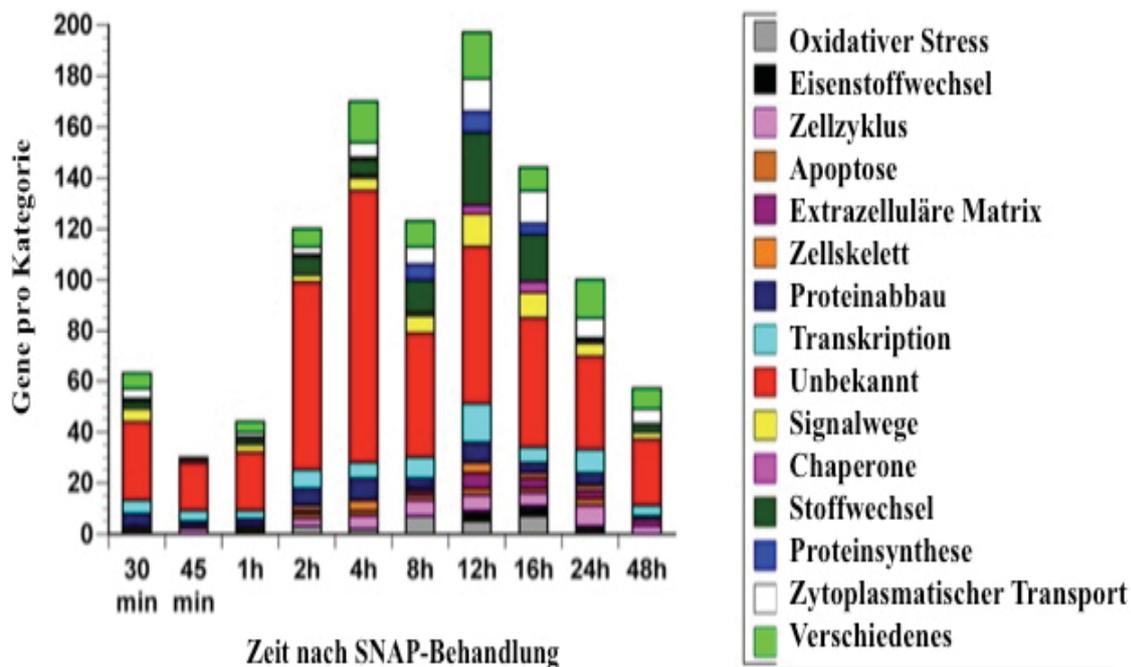


Abb. 6: Verteilung der funktionell aktiven Gruppen von Genen über die Zeit nach Stimulierung mit einem NO-Donor (Hemish, J., *et al.*, *Nitric oxide activates diverse signaling pathways to regulate gene expression*. *J Biol Chem*, 2003. 278(43): p. 42321-9.)

Die unterschiedlichen Farben repräsentieren verschieden funktionelle Gruppen von Genen, die nach der Stimulation durch NO aktiviert werden [135].

An der gleichen Zelllinie konnten Du *et al.* zeigen, dass bei geringeren SNAP-Konzentrationen die Fibroblasten tendenziell schneller wachsen [137].

Das Molekül NO nimmt also auf vielfältige Weise Einfluss auf die zellulären Prozesse und ist damit essentiell für die physiologischen Funktionen in der Haut.

1.4.3 Wirkung in der Wunde

In der Wundheilung spielt NO eine wesentliche Rolle, was an folgender Studie deutlich wird: Yamasaki *et al.* zeigten, dass die Wundheilung bei iNOS-Knock-out-Mäusen verzögert und insuffizient abläuft. Als sie die iNOS aber mittels eines Vektors transfizierten und damit das Defizit beseitigten wurde, kam es zu einem verbesserten und schnelleren Wundverschluss [138]. Im klinischen Alltag sind speziell Diabetiker von schlecht heilenden Wunden betroffen. In dieser Art von Wunde wurde ein Mangel an NO-Derivaten und eine verminderte Aktivität der iNOS nachgewiesen, was auf einen gestörten NO-Metabolismus schließen lässt [139]. Es konnte sowohl am Mausmodell, als auch in klinischen Studien gezeigt werden, dass eine Ernährung mit vermehrter Arginin-Aufnahme über den dadurch angeregte NO-Metabolismus zu einer Verbesserung der Wundheilung führt [140-143].

Schon in den ersten 24 h nach der Verletzung kommt es zu einem signifikanten Aktivitätsanstieg der iNOS und auch im Wundsekret werden vermehrt NO, Nitrit und Nitrat nachgewiesen, wobei das Maximum der NOS-Derivate erst an Tag 10 erreicht wird [4, 144]. In dieser ersten Phase der Wundheilung sind NO und seine Derivate für die in Kapitel 1.3.1 beschriebene Vasodilatation, Erhöhung der vaskulären Permeabilität [145] sowie die antibakteriellen Effekte relevant [146]. Als Produktionsort werden die Makrophagen diskutiert, die im Zuge einer Inflammation in das Wundgebiet einwandern. Eine NO-Synthese in Fibroblasten konnte bisher nur in *in vitro* nachgewiesen werden [4]. Die Chemotaxis der an der Wundheilung beteiligten Zellen wird ebenfalls von NO über die Ausschüttung von IL-8 aus Endothelzellen und wahrscheinlich auch direkt gesteuert [147, 148]. Dass die gesteigerte NO-Synthese nur direkt im Wundgewebe eine Rolle spielt, zeigen die parallel gemessenen unveränderten NO-Blutplasma-Spiegel [4].

Schäffer *et al.* konnten darstellen, dass in Wunden spezialisierte Wundfibroblasten induziert werden, die vermehrt die iNOS exprimieren, mehr Kollagen synthetisieren, geringere Proliferationsraten zeigen aber dafür kontraktile Eigenschaften entwickeln [144]. Diese spezialisierten Zellen sind am ehesten Myofibroblasten [149, 150], allerdings wurde bisher noch keine Verknüpfung zwischen den Funktionen der Myofibroblasten und der Induktion der iNOS nachgewiesen. Es zeigte sich allerdings, dass nach Transfektion von iNOS-DNA in Mäusewunden eine gesteigerte Induktion der Kollagensynthese gemessen werden konnte [151]. Es muss aber auch hier das Dosis-Wirkungsprinzip kritisch betrachtet werden, denn eine zu hohe NO-Konzentration (im Mausmodell ca. 60 μM NO) bedingt wiederum eine verringerte Kollagensynthese [152].

Die Angiogenese ist ein weiterer wichtiger Schritt in der Wundheilung und wird maßgeblich durch den *vascular endothelial growth factor* (VEGF) reguliert. Eine ausreichende Ausschüttung von VEGF während der Wundheilung scheint nur durch eine intakte iNOS und die damit verbundene Produktion von NO möglich zu sein [153, 154]. Xiong *et al.* nehmen an, dass NO zusätzlich als Trigger für die Konversion von einer inaktiven Form des VEGF in eine aktive Form dient [155].

Die Proliferation der Zellen ist in Wunden ebenfalls, wie bereits oben beschrieben, von der NO-Konzentration abhängig. In Fibroblasten, die aus hypertrophem Narbengewebe gewonnen wurden, konnte weniger NO und eine geringere Aktivität der NOS nachgewiesen werden. Dies bestätigen auch die Ergebnisse von Schäffer *et al.* und Krischel *et al.*, die zeigen, dass die physiologisch generierte NO-Konzentration in der Wunde einen hemmenden Einfluss auf überschießendes Zellwachstum hat und damit einer extremen Narbenbildung vorbeugt [144,

156, 157]. An diesem Beispiel wird erneut klar, wie fein der NO-Metabolismus in der Wunde reguliert werden muss, um nachteilige Effekte zu verhindern.

Aber nicht nur Zytokine der Inflammation und der Proliferation, sondern auch für die folgende Phase der Reepithelisierung werden durch NO gesteuert: ein Beispiel dafür ist Interleukin 1 (IL-1), welches unter anderem bei der Rekrutierung von Keratinozyten eine wichtige Rolle spielt. Keratinozyten sind für den endgültigen Wundverschluss verantwortlich und bilden die schützende, verhornende letzte Epithelschicht. Die Ausschüttung von IL-1 wird maßgeblich durch die Aktivität der iNOS in Makrophagen gesteuert [158]. Auch das Wachstum der Keratinozyten ist von der Aktivität der iNOS abhängig, darüber hinaus konnten auch hier Änderungen des Phänotyps der Zellen festgestellt werden. Induziert durch NO entwickeln Keratinozyten demnach in Wundgeweben zusätzlich eine höhere Bewegungsfähigkeit [154, 159]. Aber auch hier spielt die NO-Konzentration eine regulierende Rolle, denn bei höheren Konzentrationen neigen die Keratinozyten eher dazu, sich zu differenzieren und stellen das Wachstum und die Migration ein, was zu einem langsameren und unvollständigem Wundverschluss führt [157].

All diese verschiedenen Wege auf denen NO in die Wundheilung involviert ist, zeigen die vielfältigen Angriffspunkte auf, wie dieses Molekül therapeutisch genutzt werden kann.

2. Fragestellung

In dieser Arbeit erfolgte die Erforschung von Grundlagen des kalten physikalischen Plasmas, welches durch eine DBD-Plasmaquelle erzeugt wird. Hintergrund dieser Arbeit ist die Möglichkeit der Anwendung von kaltem Plasma auf chronischen Wunden. Es wird vermutet, dass ein individuell designtes kaltes Plasma eine Verbesserung der Wundheilung erreicht. In vielen Studien konnte bereits *in vitro* eine sterilisierende Wirkung bewiesen werden [49, 160]. In Tierexperimenten wurden ein schnellerer Wundverschluss und am Menschen eine erhöhte Hautdurchblutung gesehen [161, 162]. Allerdings ist die genaue Wirkungsweise des kalten Plasmas noch nicht grundlegend erforscht und verstanden. Bisher sind nur wenige Komponenten quantifiziert und näher untersucht worden. Welche Stoffe die oben genannten Effekte auslösen und welche Nebenwirkungen und Langzeiteffekte eine Plasmabehandlung hat, ist nur in Ansätzen erklärt. Die genauen Mechanismen und Einflussgrößen, sowie die Frage der Toxizität sind allerdings noch nicht entschlüsselt [163]. Diese Arbeit fokussiert sich auf die Plasmainduzierten NO-Derivate Nitrat und Nitrit, welche wichtige Funktionen in der physiologischen Wundheilung haben und potenzielle Hauptregulatoren der Plasmaeffekte sein könnten.

Die Fragestellungen und Zielsetzungen dieser Arbeit waren:

- Identifizierung einer möglichen Schädigung der Zell-DNA durch die DBD-Plasmabehandlung
- Quantifizierung und Qualifizierung der Anreicherung von NO-Derivaten in Flüssigkeiten als eine mögliche klinische Applikationsform
- Quantifizierung und Qualifizierung der Anreicherung von NO-Derivaten in menschlicher Haut zur Erklärung der beschriebenen Effekte auf die Wundheilung
- Beobachtung des Wachstums- und Differenzierungsverhalten von plasmabehandelten Fibroblasten

3. Material und Methoden

3.1 Material

Alle Geräte, allgemeine Chemikalien und Verbrauchsmaterialien sind mit den Herstellern unten aufgelistet.

3.1.1 Chemikalien

<u>Chemikalien</u>	<u>Hersteller</u>
Acrylamid 30 %	Roth
Adenosinphosphosulfat	Sigma-Aldrich
Sodium-L-Ascorbat	Sigma-Aldrich
bisBenzimide H 33342 trihydrochloride	Sigma-Aldrich
Bromphenol	Roth
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich
CellTiter Blue	Promega
Collagenase I	Biochrom
Complete Mini	Roche
Cupfer-II-Chlorid	Merck
DAPI	Dako
Dispase II	Roche
DMEM 4,5g/L Glucose	PAN Biotech,
ECL Western Blot Substrate	Thermo Fisher
Essigsäure (96 %)	Merck
FCS	PAN Biotech
Formaldehyd (4 %, Methanol-frei)	Aplichem
Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase	Sigma-Aldrich
Glucose	Sigma-Aldrich
Glycerol	Roth
Glycin	Roth
Hydrogenchlorid 1M	Reagecon
HEPES Buffer Solution 1M	PAN
Hoechst 3342	Hoechst
Iodid (>99,5 %)	Sigma-Aldrich
Jod (99,8 %)	Sigma-Aldrich

Kaliumchlorid	Roth
Magnesiumchlorid	Roth
Mercaptoethanol	Roth
Methanol	Merck
Milchpulver	Roth
Mounting Zellmedium	Vectashield
Natriumchlorid	Braun
Natriumdodecylsulfat	VWR
Na-deoxycholat-P40	Roth
N-Ethymaleimid	Sigma-Aldrich
Nonidet-P40	Biomol
Paraformaldehyd 4 %	Sigma Aldrich
Phosphatgepufferte Salzlösung w/o CA^{2+} , Mg^{2+}	PAN Biotech
Penicillin, Streptomycin	BioChemica
Polysorbat 20	Sigma-Aldrich
PonceauS	Serva
SDS	Roth
Sodium Nitrit	VWR
Sulfalinamid	Sigma-Aldrich
Tween 0,1 %	Sigma-Aldrich
Tetramethylethylendiamin	Roth
TritonX 100	Sigma-Aldrich
Tromethamin	Roth
Polysorbat 20	Sigma-Aldrich
Trypanblau	Promega
Trypsin/EDTA 0,05 %/0,02 % in PBS w/o CA^{2+} , Mg^{2+}	Biochrom
Vanadiumchlorid	Sigma-Aldrich
Western Blot Entwicklersubstanzen	Thermo Fisher

3.1.2 Geräte

<u>Geräte</u>	<u>Hersteller</u>
Allegra 6kr Zentrifuge	Beckmann Coulter
Axioskop 40	Zeiss
Axiovert	Zeiss
Brutschrank NU-4750	Nuaire
CLD 88 und 88e	Ecophysics
DBD Plasmastick	Cinogy
Dispergiermaschine Ultra-Turrax	Welabo
Einbettssystem TPS- 1 EVO II	Pathisto
Elektrophoresekammer	Bio Rad
Franz-Diffusionszellen	PermeGear
Infrarotthermometer IR 260-8S	Voltcraft
Mikrotom Cut 6062	SLEE
Neubauerzählkammer	Karl Hecht
Transferkammer für Western Blot	Bio Rad
Shandon Citadell 1000 (Fixierapparat)	Fisher Scientific
Spektrometer QE 65000	Ocean Optics,
Ultraschallprozessor UP50H	Welabo
Victor 3 Photometer +Fluoreszenzmessgerät	Perkin Elmer

3.1.3 Kits

<u>Kits</u>	<u>Hersteller</u>
CellTiter Blue Assay Kit	Promega
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific
Pierce S-Nitrosylation Western Blot Kit	Thermo Scientific
Deadend TUNEL Fluometric Assay Kit	Promega

3.1.4 Lösungen und Puffer

<u>Dispase II- Lösung</u>	0,1 % Dispase Typ II 5 % HEPES Buffer Solution 1M
<u>Kollagenase –Lösung</u>	0,001 M CaCl

	0,005 M Glucose
	0,1 M HEPES Buffer Solution
	0,12 M NaCl
	0,05 M KCl
	0,2 % Collagenase I
	1,5 % BSA
<u>Laufpuffer 10x</u>	25 mM Tris, pH 8,3-8,8
	192 mM Glycin
	0,1 % SDS
<u>Lämmli-puffer 4x</u>	250 mM Tris, pH 6,8
	8 % SDS
	40 % Glycerol
	0,1 % Bromphenolblau
<u>RIPA-Puffer</u>	50 mM Tris, pH 8
	150 mM NaCl
	1 % NP-40
	0,5 % Na-desoxycholat
	0,1 % SDS
	1 Tablette Complete, Mini (Proteaseinhibitor)
<u>TBS 10x</u>	7,7 mM Tris, pH 6,8
	150 mM NaCl
<u>TBS-T</u>	1x TBS
	0,01 % Tween 20
<u>Transferpuffer 10x</u>	25 mM Tris, pH 8,0-8,15
	192 mM Glycin
<u>Trenngel-puffer 4x</u>	1,5 mM Tris
	0,4 % SDS

Sammelgelpuffer 4x 0,5 mM Tris, pH 6,8
0,4 % SDS

Zellmedium DMEM
10 % FCS
5 % Penicillin/Streptomycin
1 % Pyruvat/Glutamat

3.1.5 Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Hersteller</u>
1. Alexa Fluor 488-conjugated Donkey monoclonal to mouse IgG	Abcam
2. Anti-alpha SMA Antibody	Abcam
3. Anti-Fluorescein Antibody	Abcam
4. Anti-S-nitrosocysteine Mouse monoclonal Antibody	Abcam
5. Goat Anti-Mouse Immunoglobulin	Dako
6. Goat Anti-Rabbit Immunoglobulin	Dako

3.1.6 Verbrauchsmaterialien

<u>Material</u>	<u>Hersteller</u>
Biospiestanze (8 mm)	pfm medical
Hamiltonpipette	Hamilton
Mikroreaktionsgefäß	Eppendorf Research
Nitrocellulosemembran (0,2 mm)	Bio Rad
Stripetten	Costar
Spritzen	Luer
Pipette	Eppendorf Research
Pipettenspitze	Starlab
Whatman-Paper, Filterpapier (2,5 mm)	Sigma-Aldrich
Zellsiebe	Corning
Zentrifugenröhrchen, Wellplatten,	Greiner Bio
Petrischalen, Zellkulturflaschen	

3.1.7 Zellen und biologisches Material

Fibroblasten

Primärkultur aus Hautexplantaten

Hautexplantate

Bauchhaut- und Brusthautexplantate

(Genehmigung der Ethik-Kommission der Universität Düsseldorf, Antrag Nr. 3634)

3.1.8 Software

Software

Hersteller

Axio Vision, Mikroskopsoftware

Zeiss

Excel, Tabellenkalkulationsprogramm

Microsoft

Graph Pad Prism, Statistikprogramm

Graph Pad

ImageJ, Bildbearbeitungsprogramm

National Institutes of Health, USA

Image Studio Lite

Licor Bioscience

Origin, Datenanalyse- und Grafiksoftware

Additive

3.2 Methoden

3.2.1 Plasmaquelle

Die 10 mm messende Elektrode des DBD-Plasmasticks besteht aus einem Kupferzylinder, welcher mit Aluminium Oxid beschichtet ist. Die Spannung beträgt 14 kV, bei einer Frequenz von 120 Hz. Mit Hilfe eines Spektrometers wurde die durchschnittliche Wellenlänge bestimmt (1,3 nm bei einer Wellenlänge zwischen 200-800 nm). Die UV-Strahlung betrug für UV-A $7.6 \pm 2.3 \times 10^{-3} \text{ mW/cm}^2$ und UV-B $1.3 \pm 0.4 \times 10^{-3} \text{ mW/cm}^2$, die Elektronendichte war $2.6 \pm 0.9 \times 10^{14} \text{ cm}^{-3}$ und die Ozonkonzentration $210 \pm 10 \text{ ppm}$. Der Abstand zur behandelten Oberfläche betrug immer 1 mm. Die Gastemperatur betrug ca. 390 Kelvin (entspricht 116°C), die behandelten Flüssigkeiten, Haut und Zellen zeigten allerdings konstante Umgebungstemperaturen auch nach längerer Plasmabehandlung. Dies liegt an dem Aufbau der Elektrode, welche durch ihre Beschichtung die Spannung und die Entladung verringert, und zusätzlich pulsatil arbeitet, als auch an dem behandelten Gewebe und Untergrund mit einer eher geringen Wärmeleitfähigkeit. Diese Effekte wurden auch in anderen Arbeiten mit dieser Plasmaquelle beschrieben [164, 165].



Abb. 7: DBD-Plasmastick, fixiert in einer linear verstellbaren Aufhängung über einer Wellplatte in der Sterilwerkbank mit Erdung (Gelb-Grüne Elektrode im Hintergrund). Typischer Versuchsaufbau zur Behandlung von Zellkulturen. Fotografiert während der Forschungen für diese Arbeit im LifeScienceCenter,, Merowingerstr. 1a Düsseldorf.

3.2.2 Behandlungsschemata

1. DBD-Behandlung von Blutplasma und PBS

Material	Behandlung	Kontrollen
- Blutplasma: 200 μ l, 500 μ l, 3 ml	30 s; 60 s;	<u>Negativkontrolle:</u> keine
- PBS: 500 μ l und 3 ml	180 s;	DBD-Behandlung
- 24- Wellplatten/ Franzdiffusionskammer	360 s; 600 s	

2. Toxizitätsnachweis

Material	Behandlung	Kontrollen
- Hautexplantate	30 s; 60 s;	<u>Positivkontrolle:</u> Zugabe
- 12- Wellplatten	180 s;	des DNase Puffer (1:100)

- 3 ml Zellkulturmedium	360 s; 600 s	<u>Negativkontrolle:</u> Keine Zugabe von rTdT-Enzym
-------------------------	--------------	---

3. Vitalitätsmessung

Material	Behandlung	Kontrollen
- Fibroblasten - 24- Wellplatten - 500/270 µl Blutplasma	30 s; 60 s; 180 s	<u>Negativkontrolle:</u> keine DBD-Behandlung <u>Positivkontrolle:</u> Zugabe von 1,2 mM Nitrat, 300 µM Nitrit, 200 µM H ₂ O ₂

4. Migrationsassay

Material	Behandlung	Kontrollen
- Fibroblasten - 24- Wellplatten - 270 µl Blutplasma	30 s; 60 s; 180 s	<u>Negativkontrolle:</u> keine DBD-Behandlung, aber Kultivierung in Blutplasma <u>Positivkontrolle:</u> Zugabe von 1,2 mM Nitrat, 300 µM Nitrit, 200 µM H ₂ O ₂

5. Fluoreszenzmikroskopie

Material	Behandlung	Kontrollen
- <u>1. AK.:</u> α-SMA-Mouse-AK, 1:200 in TBS-T mit 3 % BSA - <u>2. AK.:</u> Alexa Fluor 488-conjugated Donkey monoclonal to mouse IgG, 1:500 in TBS-T mit 3 % BSA - Aus DBD-behandelter und unbehandelter Haut isolierte	30 s; 60 s; 180 s	<u>Negativkontrolle:</u> keine DBD-Behandlung, aber Kultivierung in Zellkulturmedium/ Blutplasma <u>Positivkontrollen:</u> Zugabe von TGF-β (10

Fibroblasten		ng/ml) und
- 12- Wellplatten/ 24- Wellplatten		1,2 mM Nitrat, 300 μ M
- Zellkulturmedium/ Blutplasma		Nitrit, 200 μ M H ₂ O ₂

6. Proteinbiochemische Methoden

Material	Behandlung	Kontrollen
- 1. AK.: α -SMA-Mouse-AK, 1:200 in TBS-T mit 3 % BSA	30 s; 60 s;	<u>Negativkontrolle</u> : keine DBD-Behandlung
- 2. AK.: Alexa Fluor 488-conjugated Donkey monoclonal to mouse IgG, 1:500 in TBS-T mit 3 % BSA	180 s;	<u>Positivkontrollen</u> : Zugabe von TGF- β (10ng/ml) und
- GAPDH		1,2 mM Nitrat, 300 μ M
- Aus DBD-behandelter und unbehandelter Haut isolierte Fibroblasten		Nitrit, 200 μ M H ₂ O ₂
- 12- Wellplatten/ 24- Wellplatten/ 8- Well Chamber Slides		
- Zellkulturmedium/ Blutplasma		

7. NO-Penetration der Haut

Material	Behandlung	Kontrollen
- Spalthaut (0,3 und 0,7 mm dick)	2,5 min; 5	<u>Negativkontrolle</u> : keine
- Franzdiffusionskammer	min; 10 min s	DBD-Behandlung

8. NO-Akkumulation in der Haut

Material	Behandlung	Kontrollen
- DBD-behandelte Epidermis- und Dermisproben	60 s; 180 s;	<u>Negativkontrolle</u> : keine
	360 s	DBD-Behandlung

3.2.3 DBD-Behandlung von PBS und Blutplasma

Gewinnung der Blutplasmaproben

Die Blutproben wurden den freiwilligen und gesunden Probanden (aus der Arbeitsgruppe) aus einer Kubitalvene entnommen. Die Probanden haben zuvor schriftlich in die Blutentnahme und die anonyme Verwendung eingewilligt. Es wurde Blut von 2 Männlichen und 2 Weiblichen Spendern verwendet, das Durchschnittsalter betrug 27,3 J. Die Blutentnahme wurden mit Vacutainer®-Safety-Lok™-Sicherheits-Blutentnahmeset 21 G (Kanüle 0,8x19 mm) durchgeführt. Es wurden pro Blutentnahme 5 - 6 Heparinröhrchen mit jeweils 6 ml Blut abgenommen. Das Hämatokrit wurde abzentrifugiert und das Blutplasma gepoolt, direkt verwendet oder bei -20 °C eingefroren. Für alle Versuche wurde gepooltes Blutplasma benutzt.

Messung der NO- und Nitrit-Konzentration

Zur Bestimmung der entstehenden NO-, Nitrit- und Nitratkonzentrationen in DBD-behandeltem PBS und Blutplasma wurden 50 µl je behandelter Probe (Behandlungsschema siehe 3.2.2, Punkt 1) in die vorbereiteten CLDs injiziert und die NO-, Nitrit- und Nitratkonzentration im Blutplasma gemessen. Im Abstand von 5 und 10 min wurden erneut Proben der behandelten Flüssigkeit entnommen und in der CLD gemessen.

Messung der S-Nitrosokonzentration

Zur Bestimmung der S-Nitrosoverbindungen in DBD-behandeltem Blutplasma wurde das frei vorliegende Nitrit mit Sulfanilamid reduziert und dadurch nicht mehr in der CLD detektierbar. So wurden ausschließlich die S-Nitrosoverbindungen gemessen.

Von dem behandelten Blutplasma (Behandlungsschema siehe 3.2.2, Punkt 1) wurden je Well 200 µl in eine 5 % Sulfanilamid/HCL-Lösung im Verhältnis 1:1 gegeben, 10 min auf Eis inkubiert und dann in die CLD injiziert. Zuvor war eine Eichkurve für Nitrit erstellt worden.

3.2.4 DBD-Behandlung der Haut

Spendercharakteristika

Die Hautexplantate wurden während Hautstraffungsoperationen den aufgeklärten Patienten entnommen (Genehmigung der Ethikkommission der Universität Düsseldorf, Antrag Nr. 3634). Es wurde Haut von einem männlichen und 8 weiblichen Spendern entnommen. Die Spender

der Hautexplantate waren im Mittel 49,83 Jahre alt (SD = 13,87).

Vorbereitung und Behandlung der Haut

Es wurden Bauch- und Brusthautexplantate verwendet, bei einigen Hautstücken wurde mit einem Dermatome in 0,3 und 0,7 mm Tiefe die Epidermis entfernt. Die dabei gewonnene Spalthaut wurde ebenfalls weiterverwendet.

Die Haut wurde unter sterilen Bedingungen vom Unterhautfett befreit, auf einer Metallplatte aufgespannt und mit dem DBD-Plasmastick behandelt. Dabei wurde der Plasmastick ca. 1 mm über der Haut positioniert. Nach der Behandlung wurden die behandelten Hautareale mit einer Biopsiestanze (Durchmesser 8 mm) ausgestanzt und in vorbereiteten 12-Wellplatten für 24 h im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

3.2.5 Zellisolierung aus der Haut

Isolierung ohne Behandlung

Die kleingeschnittene Haut wurde in 5 ml Dispase II-Lösung über Nacht bei 4°C auf dem Taumelrollenmischer inkubiert. Am Tag 2 der Isolation wurde die Dispase-Lösung abzentrifugiert und die Hautstücke in 5 ml Kollagenase I-Puffer für 1 h im Wasserbad unter Schütteln inkubiert. Das Gewebe wurde in einem Sieb gestempelt, mit 1 ml PBS gespült und erneut gestempelt. Das Filtrat wurde zentrifugiert und das Zellpellet mit Zellmedium resuspendiert und dann auf Petrischalen ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumswechsel.

Isolierung nach der Behandlung

Die Haut wurde wie in Punkt 3.2.2 beschrieben behandelt, ausgestanzt und für 24 h in Zellkulturmedium im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Hautstanzen in 50 ml Falcons mit 1%-iger Dispase II/Kollagenase I-Lösung gegeben, sortiert nach Behandlungszeit, und für 2 h im Wasserbad geschüttelt. Pro Hautprobe wurden 1,5 ml der Dispase/Kollagenase-Lösung angesetzt. Dann wurden die Hautstücke gesiebt, gestempelt, mit 2 ml PBS gespült und erneut gestempelt. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 4.000 G zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Nach Resuspension in Zellmedium wurde die Zellzahl mittels Neubauer-Kammer bestimmt und 7.692 Zellen/cm² auf eine 12-Well-Platte ausgesät.

3.2.6 Zellkultur

Die Fibroblasten wurden im Zellkulturmedium kultiviert. Alle 3 Tage erfolgte ein Wechsel des Zellmediums. Zum Trypsinieren der Zellen wurden sie zunächst mit PBS gewaschen und kurzzeitig mit 0,5 %iger Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert. Die Reaktion wurde mit der doppelten Menge FCS gestoppt und das Trypsin/FCS-Gemisch abzentrifugiert. Nach Resuspension des Zellpellets mit frischem Zellmedium wurden die Zellen auf neue T-175-Zellkulturflaschen bzw. nach Bestimmung der Zellzahl auf 24-Well-Platten aufgesplittet. Zum Bestimmen der Zellzahl wurde eine Neubauerzählkammer benutzt. Die Zellkulturen wurden bei 37 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit und einem CO₂ von 5 % im Brutschrank inkubiert.

3.2.7 Vitalitätsmessung

Das CellTiter Blue System kann die Vitalität von Zellen fluorometrisch darstellen und wurde zur Erstellung einer Wachstumskinetik benutzt. Es beruht auf der Umsetzung des Indikatorfarbstoffes Resazurin, der in den Mitochondrien metabolisch aktiver Zellen zu Resofurin umgewandelt wird. Im Fluorometer (Extinktion 560 nm/Emission 590 nm) wird dann ein Farbumschlag von blau zu rosa gemessen. Tote Zellen setzten dagegen keinen Farbstoff mehr um. Die Menge an produziertem Resofurin ist laut Hersteller proportional zu der Zellzahl.

Pro Well wurden 15.789 Zellen/cm² auf 24-Wellplatten ausgesät und 24 h im Zellkulturmedium inkubiert. Das Zellkulturmedium wurde abgesaugt und nach einem Waschschrift mit PBS, wurden pro Well 500 µl/270 µl Blutplasma hinzugegeben. Nach 24 h Inkubation im Brutschrank wurde das Blutplasma entfernt und durch 250 µl CellTiterblue-Lösung/Zellmedium (1:20) ersetzt. Die Zellen wurden 2 h im Brutschrank inkubiert und anschließend wurden pro Well 100 µl der Celltiterbluelösung auf einem 96-Well im Fluorometer gemessen. Die Vitalitätsmessung wurde alle 3 Tage durchgeführt über max. 20 Tage.

3.2.8 Migration-Assay

Um das Migrationsverhalten der Fibroblasten nach der DBD-Plasmabehandlung nachzuvollziehen, wurden die Zellen in spezielle 24-Wellplatten mit einem mittigen Plastikeinsatz definierter Größe ausgesät. Innerhalb des Plastikeinsatzes befanden sich 2 gleich große Kammern. Nach Entfernung des Einsatzes an Tag 2 nach der Aussaat, befand sich zwischen den angewachsenen Zellen ein 500 µm breiter Spalt. Pro Einsatz wurden 5 x

10^4 Fibroblasten ausgesät. Die DBD-Behandlung erfolgte unter den in 3.2.2, Punkt 4 angegebenen Parametern. Nach 1 h Inkubation wurde das Blutplasma durch Zellkulturmedium ersetzt. Pro Well wurden ein Foto mit dem Programm Axio Vision in 10facher Vergrößerung unter dem Mikroskop gemacht. Dies geschah nach 1, 8, 24 und 48 h. Bevor die Wellplatten fotografiert wurden, wurde das Zellmedium jedes Mal durch PBS ausgetauscht. Die Fotos wurden mit dem Programm ImageJ ausgewertet.

3.2.9 Fluoreszenzmikroskopie

Alpha-SMA-Nachweis

Myofibroblasten sind gekennzeichnet durch das Protein *alpha-smooth muscle actin* in ihrem Zytosol [166]. Sie sind wichtige Zellen in der Wundheilung und können aus Fibroblasten durch bestimmte Stimuli differenziert werden.

Die Fibroblasten wurden nach der DBD-Behandlung (siehe 3.2.2, Punkt 5) und 24 h im Blutplasma kultiviert. Dann erfolgte ein Vitalitätsassay (siehe 3.2.4).

Nach 10, 14 und 19 Tagen wurden die Zellen zunächst dreimal mit PBS gewaschen und dann für 15 min in Paraformaldehyd fixiert. Nach einem weiteren Waschschriff mit PBS wurden die Zellen (mit PBS bedeckt) bei 4°C gelagert oder direkt weiter bearbeitet. Die Zellen wurden zunächst mit TBS-T und 3 % BSA für 1 h bei RT geblockt. Der erste Antikörper (α -SMA-Mouse-AK, 1:200 in TBS-T mit 3 % BSA) wurde dann auf die Zellen gegeben und für 2 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Nach einem Waschschriff wurde der zweite AK (Alexa Fluor 488-conjugated Donkey monoclonal to mouse IgG, 1:500 in TBS-T mit 3 % BSA) auf die Zellen gegeben und für 1 h lichtgeschützt auf dem Schüttler inkubiert. Nach nochmaligem Waschen folgte eine 30 minütige Inkubation mit 1 ng/ml bisBenzimide-H 33342-trihydrochloride in PBS, einem DNA-Fluoreszenzfarbstoff zur Darstellung der Zellkerne durch Interkalierung. Abschließend wurden die Zellen bei einer 10fachen Vergrößerung unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet, dabei wurden pro Well je zwei Bilder mit dem Programm Axio Vision aufgenommen und mit ImageJ ausgewertet.

3.2.10 Toxizitätsnachweis

Aufbereitung der Hautproben

Die DBD-behandelten Hautproben (siehe 3.2.1) wurden für weitere 24 h in je 3 ml

Formaldehyd (4%, Methanol-frei) bei Raumtemperatur und lichtgeschützt fixiert. Die fixierten Hautproben wurden dann innerhalb von 12 h in einer aufsteigenden Alkoholreihe paraffiniert. Danach wurden die Proben in Paraffin gegossen und mit einem Mikrotom in 4 µm dicke Schnitte geschnitten. Die Schnitte wurden auf Objektträger gelegt und 24 h im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ inkubiert.

Die Deparaffinierung erfolgte durch mehrere Waschschriffe in Xylol und Alkohol in absteigender Konzentration für 10 bzw. 5 min. Zur abschließenden Fixierung wurden die Schnitte 15 min mit Formaldehyd (4 %, Methanol-frei) behandelt und abschließend zweimal mit PBS gewaschen.

TUNEL-Assay

Zur Darstellung einer Schädigung der DBD-behandelten Fibroblasten durch Einzel- und Doppelstrangbrüchen der DNA wurde das Deadend Fluorometric TUNEL System von der Firma Promega benutzt. Der TUNEL-Assay stellt DNA-Schäden dar, indem die rekombinante terminale Desoxynucleotidyltransferase (rTdT) die 3'OH- Enden von Einzel- oder Doppelstrangbrüchen mit markierten Nukleotiden (dUTP-Digoxein) koppelt und dadurch unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar macht. Der komplette Assay wird bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Schnitte wurden mit je 100 µl Proteinase-K-Lösung (Proteinase K gelöst in Puffer, 1:500 mit PBS verdünnt) für 8-10 min bedeckt. Nach einem Waschschriff mit PBS folgte eine Nachfixierung mit Formaldehyd (4 %, Methanol-frei) für 5 min und ein weiterer Waschschriff. Die Positivkontrolle wurde nach Vorinkubation mit dem DNAase-Puffer mit DNAase I (1:100 in DNAase-Puffer) behandelt. Dann wurden die Schnitte für 10 min mit dem Equilibrierungspuffer vorbehandelt und anschließend mit der Nukleotid-Mischung und dem rTdT-Enzym (insgesamt 50 µl) bedeckt. Bei der Negativkontrolle wurde kein rTdT-Enzym hinzugegeben. Die Schnitte wurden in der Feuchten Kammer für 1 h bei 37 °C inkubiert. Zuletzt wurden die Schnitte mit 2 x SSC-Puffer behandelt und dreimal mit PBS gewaschen. Nach der Eindeckelung mit Mounting Zellmedium und DAPI wurden die Schnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop mikroskopiert. Pro Schnitt wurden dabei mit Axio Vision zwei Bilder aufgenommen (10x Vergrößerung) und die Fluoreszenzdichte mittels ImageJ ausgewertet.

3.2.11 Proteinbiochemische Methoden

Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration vor Durchführung eines Western Blots wurde das Bicinchoninsäure-Assay benutzt. Dabei reagieren zweiwertige Kupferionen quantitativ mit Proteinen zu einwertigen Kupferionen. In einem zweiten Reaktionsschritt reagieren die einwertigen Kupferionen mit der Bicinchoninsäure zu einem Komplex mit violetter Farbe. Dessen Absorption kann bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch gemessen werden. Die Proteinmenge wird proportional zu einer BSA-Standardkurve ermittelt. Vor Durchführung der Proteinbestimmung wurden die DBD-behandelten Fibroblasten trypsinisiert und in RIPA-Puffer sonifiziert. Je 10 µl vorverdünnte Probe wurde in einer 96-Well-Platte vorgelegt und mit 200 µl einer Reaktionslösung aus BCA Reagent A und B (Verhältnis 50:1) gemischt. Die Auswertung erfolgte nach 30 min Inkubation bei 37 °C im Mikroplattenphotometer.

Western Blot

Zur Vorbereitung eines Western Blots werden zunächst die Proteine per Elektrophorese in einem Gel nach ihrer Größe aufgetrennt. Nach dem eigentlichen Blotten der Proteinbanden auf eine Membran, können bestimmte Proteine mit Hilfe von Antikörpern markiert und nachgewiesen werden.

SDS Gelelektrophorese

Die Proben wurden 4:1 mit Laemmlipuffer/ 20 % Mercaptoethanol versetzt und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Nach Installation des SDS-Gels in der Laufkammer, wurde diese mit Laufpuffer aufgefüllt und die Taschen des Gels mit den Proben beladen. Zur Bestimmung des Molekulargewichts der Proteine wurde zusätzlich ein Proteinmarker eingesetzt. Für 15 min wurde eine Spannung von 60 mV angelegt, dann wurde mit 110 mV weiter gearbeitet.

Transfer von Proteinen

Nach Abschluss der Gelelektrophorese wurden zwei *Whatmanpaper*, die Membran und das Gel zunächst in Transferpuffer äquilibriert und dann im Blottingapparat übereinander geschichtet. Es wurde mit 25 mV, 30 min geblottet. Zur Kontrolle der Proteinübertragung wurde die Ponceau-S-Färbung benutzt, bei der Ponceau S reversibel an die positiv geladenen Aminosäuren der Proteine bindet. Die Membran wurde sorgfältig mit TBS-T gewaschen und anschließend in TBS-T mit 3 % BSA für 1 h bei Raumtemperatur geblockt.

Antikörpermarkierung

Die Antikörpermarkierung wurde wie in 3.2.2, Punkt 6 beschrieben durchgeführt und mit dem Auswertungsprogramm Image Studio Lite ausgewertet.

3.2.12 Reduktive Gasphasen-Chemilumineszenz

Zur Detektion der Nitrat- und Nitritkonzentration der DBD-behandelten Gewebe und Flüssigkeiten wurde ein NO-Analysator verwendet, dessen Messprinzip auf der Detektion von Lichtquanten im roten bis infraroten Bereich durch die Reaktion von NO mit Ozon (O₃) beruht [167].

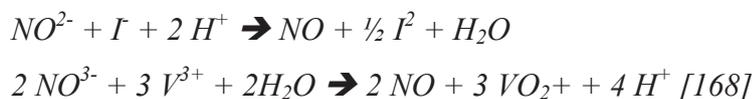


Die Detektion liegt im Bereich von 1 nM und ist damit eine der sensitivsten Methoden zur Bestimmung von NO-Derivaten.

Durch Zusetzen einer geeigneten Reaktionslösung kann aus Nitrit und Nitrosothiolen, sowie Nitrat stöchiometrisch NO freigesetzt werden.

Die Reaktionslösung zur Bestimmung des Nitritgehalts besteht aus Kaliumjodid (45 mM), Jodine (10 mM) und Essigsäure (96 %ig).

Eine zweite verwendete Reaktionslösung zur Bestimmung von Nitrat setzte sich aus 1 % Vanadiumchlorid in 1 M HCL zusammen. Es wurden jeweils 25 ml Lösung verwendet. Durch ein Heizaggregat wurde der untere Teil des Kolbens mit der Reaktionslösung auf eine Temperatur von 65 °C (Nitrit-Bestimmung) bzw. 95 °C (NO-Bestimmung) erhitzt. Die Lösungen setzten nach folgender Reaktionsgleichung NO aus der injizierten Probe frei:



Ein inertes Gas (hier Stickstoff, N₂) durchströmte die Reaktionslösung und transportierte das gasförmige NO durch den gekühlten oberen Teil des Kolbens [169]. Nachgeschaltet in einem Behälter befand sich eine 1 M NaOH-Lösung auf Eis. Das Kühlaggregat und die gekühlte NaOH-Lösung verhinderten ein Eindringen von Chemikalien und Wasserpartikeln in den Analysator. Die Proben wurden mit einer gasdichten Glasspritze durch eine Kunststoffmembran in die Reaktionslösung injiziert. Das Probenvolumen betrug 50 µl bzw.

200 μl (S-Nitrosomessung). Vor jeder Messung wurde eine Eichkurve mit definierten Konzentrationen NaNO^2 erstellt.

3.2.13 NOD- Penetration der behandelten Haut

Um nachzuweisen, dass die Stickstoffspezies, die bei der DBD-Plasmabehandlung entstehen auch in tiefere Hautschichten vordringen, wurden Franzdiffusionszellversuche durchgeführt [170].

Hierbei wurde die Spalthaut (0,3 und 0,7 mm dick) kreisförmig ausgeschnitten (Durchmesser ca. 3 cm) und auf die oberen Öffnungen der Franzdiffusionszelle aufgespannt, siehe Abb. 8.

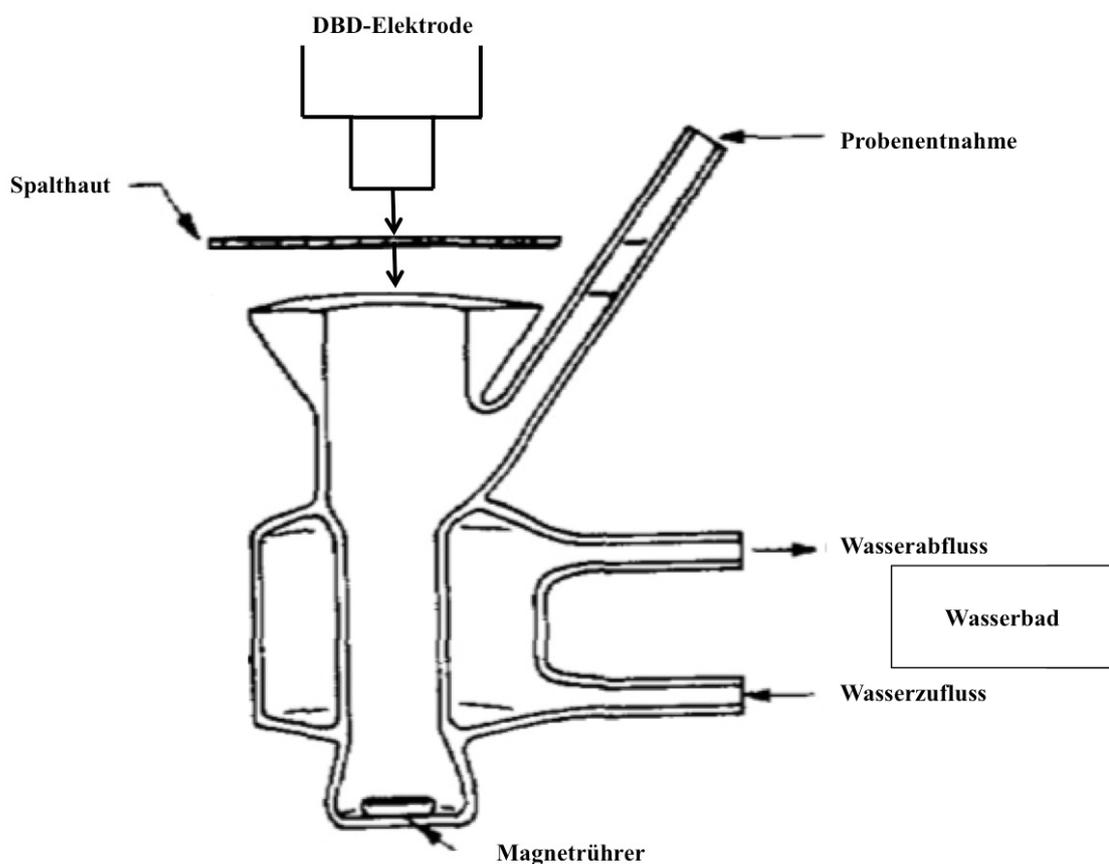


Abb. 8: Schematische Darstellung einer Diffusionszelle, auch Franzkammer genannt (Modifizierung der ursprünglichen Darstellung in Thomas J. Franz, Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. *J Invest Dermatol* 64, 190-195 (1975)) [170]

Es stellt eine Glaskammer mit einer gläsernen Außenhülle, in der Wasser einer definierten Temperatur zirkuliert, dar. In die Glaskammer wurde PBS gefüllt und über die obere Öffnung die Spalthaut gelegt und mit der DBD-Elektrode behandelt. Nach Beendigung der Behandlung konnte aus der seitlichen Öffnung eine Probe des PBS zur Messung in der CLD entnommen werden.

In der Franzdiffusionszelle befanden sich 3 ml PBS. Die Diffusionszellen waren in einem Wasserbad (37,6°C) mit Magnetrührern installiert. Zur Ableitung der Ladung wurde ein metallener 5 cm langer Spatel in der vorderen Öffnung der Diffusionszelle positioniert und mit der Ableitungselektrode des DBD-Plasmasticks verbunden. Der Plasmastick wurde 1-2 mm über der Haut positioniert und es wurde, wie in 3.2.2., Punkt 7 beschrieben, behandelt. Direkt nach der Behandlung und dann alle 10 Minuten wurde aus der vorderen Öffnung der Franzdiffusionszelle mit der Hamiltonpipette 50 µl PBS entnommen und in die vorbereitete CLD gegeben. So wurde die Konzentration von Nitrit und Nitrat nach Penetration der Spalthaut bestimmt.

3.2.14 NOD-Akkumulation in der Haut

Um die Konzentration von NO und seinen Derivaten in der Haut nach der DBD-Behandlung nachzuweisen, wurden die Haut, wie in 3.2.3 beschrieben, vorbereitet und mit dem DBD-Plasmastick behandelt (Behandlungsschema siehe 3.2.2., Punkt 8). Die Epidermis- und Dermisstanzen wurden in Stickstoff tiefgefroren und mit dem Kryostat in 4 µm dünne Schnitte geschnitten. Es wurden je Probe 6 mm abgetragen. Die Schnitte wurden gewogen und in PBS sonifiziert. Anschließend wurden die Nitrit-, Nitrat-, und S-Nitroso-Konzentrationen des Hauthomogenisats in der CLD bestimmt.

4. Ergebnisse

4.1 Toxizitätsnachweis

Die Anwendung des DBD-Plasmasticks am Menschen setzt voraus, dass die Zellen der Haut nicht geschädigt werden. Dies wurde mit dem TUNEL-Assay untersucht. Mit dieser Methode werden Doppelstrangbrüche der DNA durch Immunfluoreszenzmarkierung nachgewiesen. Die Behandlungszeit der Hautstücke betrug maximal 6 min und zeigte keine signifikanten Doppelstrangbrüche der DNA.

Die unbehandelten Hautstücke zeigten eine zu der Kernfärbung relative Zahl positiver TUNEL-Zellen von 0,17 %. Die Hautproben, die 360 s, also 6 min mit dem Kaltplasma behandelt wurden, hatten 0,21 % positive TUNEL-Zellen. Die Positivkontrolle, die mit einer DNAase behandelt wurde, zeigte 59,86 % TUNEL-positive Zellen, siehe Abb. 9 und 10.

Damit konnte nachgewiesen werden, dass die Behandlungszeiten, die in dieser Arbeit benutzt werden, keinen toxischen Effekt auf die DNA der Zellen in der Haut hat.

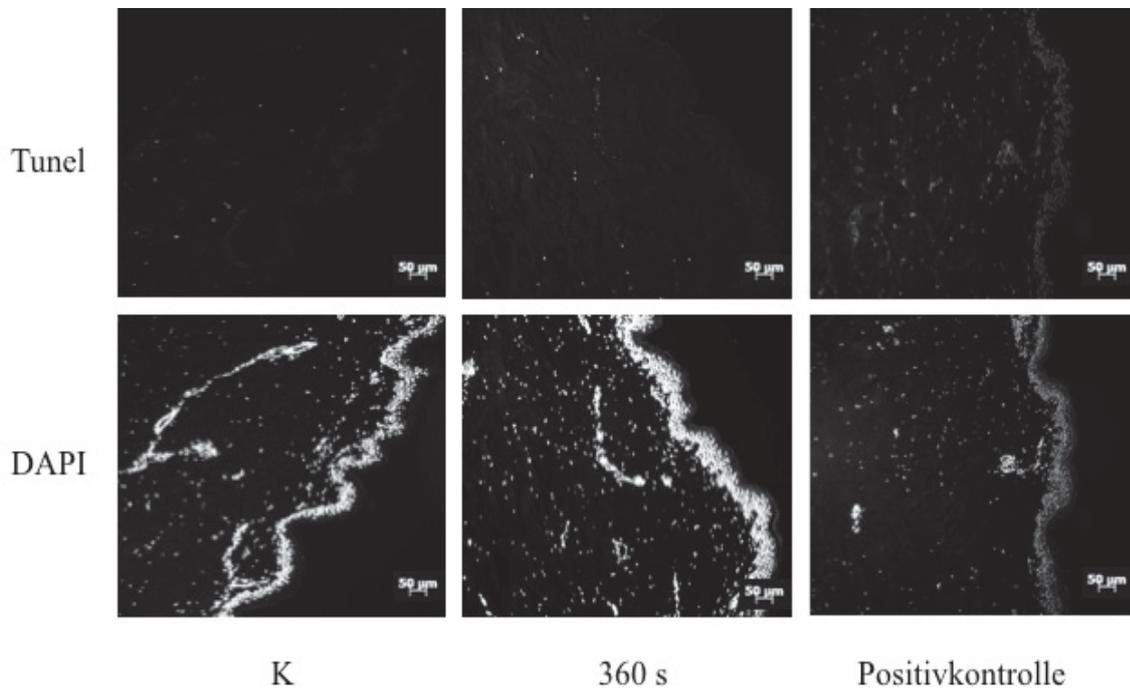


Abb. 9 Fluoreszenzfärbung des TUNEL-Assays

Zur Untersuchung einer potenziellen Toxizität des kalten Plasmas für menschliche Zellen wurden Hautproben 360 s lang mit dem DBD-Plasmastick behandelt und anschließend mit Hilfe des TUNEL-Assays auf DNA-Doppelstrangbrüche untersucht. K bedeutet unbehandelte Kontrolle, die Positivkontrolle wurde mit einer DNAase behandelt. Die Zellkerne wurden mit der DAPI-Färbung sichtbar gemacht. Eine signifikante Toxizität bis 360s wurde nicht nachgewiesen.

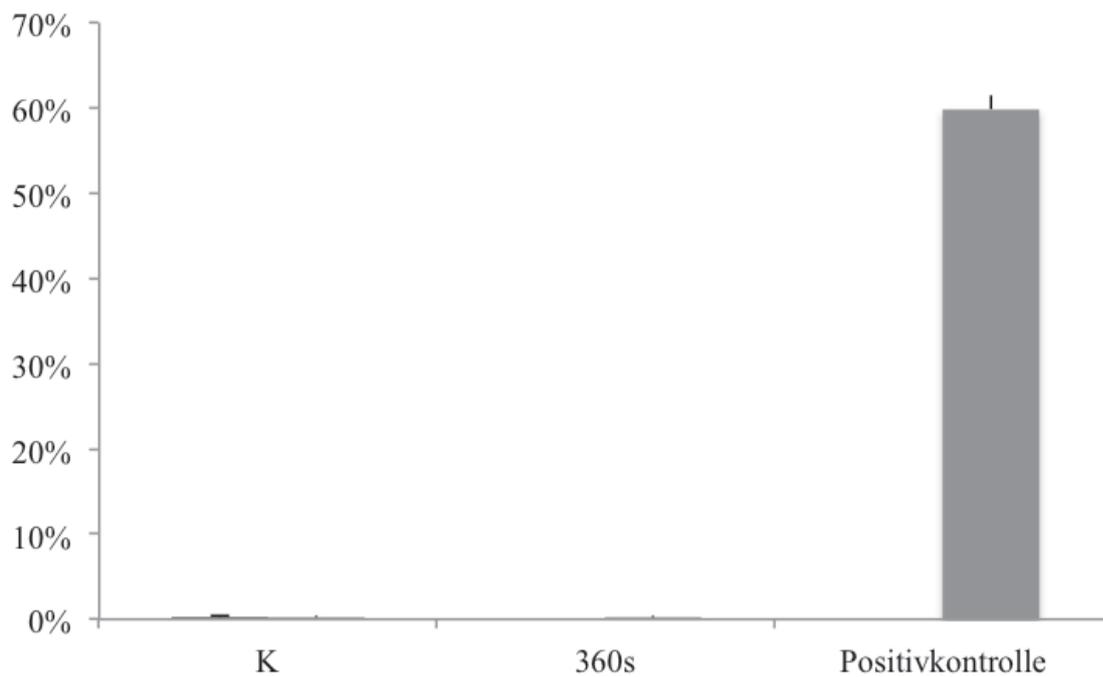


Abb. 10: Darstellung der relativen Zellzahl mit Doppelstrangbrüchen in mit Kaltplasma behandelte Haut

Mit dem TUNEL Assay wurden DNA-Doppelstrangbrüche in mit dem DBD-Plasmastick behandelte Haut untersucht. Die im folgenden als TUNEL-positive Zellen bezeichneten Zellen mit nachgewiesenen DNA-Doppelstrangbrüchen wurden in Relation zu allen, per DAPI-Kernfärbung sichtbar gemachten Zellkernen gesetzt. K bedeutet unbehandelte Kontrolle, die Positivkontrolle wurde mit einer DNAase behandelt, um Doppelstrangbrüche zu erzeugen. Es zeigte sich keine signifikante Toxizität. N = 5.

4.2 NOD-Konzentration in plasmabehandelten Flüssigkeiten

4.2.1 Kaltplasmabehandlung von PBS

Die ersten Anwendungen des DBD-Plasmastick fanden mit PBS statt, um zu evaluieren, wie viel NO-Derivate sich in Flüssigkeiten bilden können, welche proteinfrei und pH neutral sind. Dabei konnte festgestellt werden, dass es stets eine positive Korrelation zwischen der Behandlungszeit und der Konzentration von NO-Derivaten in der Flüssigkeit gibt. Die Messung in der CLD ergab, dass bereits in unbehandeltem PBS eine geringe Menge NOD gelöst sind, ($31,69 \pm 23,19 \mu\text{M}$). Eine Behandlung von 3 ml PBS über 2,5 min zeigte einen Anstieg auf $356,79 \pm 65,19 \mu\text{M}$ NOD, dieser Wert blieb in den Folgemessungen nach 5 und 10 min nahezu stabil (5 min nach Behandlung: $358,54 \pm 50,68 \mu\text{M}$, 10 min nach Behandlung: $359,19 \pm 50,14 \mu\text{M}$). Eine Verdopplung der Behandlungszeit zeigt auch eine Verdopplung der NOD-Werte im PBS (5 min Behandlung insgesamt: $774,99 \pm 133,29 \mu\text{M}$, 10 min Behandlung insgesamt: $1654,55 \pm 213,31 \mu\text{M}$). Auch bei hohen Konzentrationen von NO im PBS nach der Kaltplasmabehandlung bleiben die Konzentrationen auch nach erneuter Messung nach 5 und 10 min weiter nachweisbar und zeigen noch keine signifikanten Veränderungen, siehe Abb. 11.

Im folgenden wurden 500 μl PBS mit kürzeren Behandlungszeiten mit dem DBD-Plasmastick behandelt. Es zeigen sich aber bereits nach 10 Sekunden Behandlung eine signifikante Erhöhung der Nitrit und Nitrat-Konzentration (Nitrit: $19,22 \pm 7,0 \mu\text{M}$; Nitrat $14,49 \pm 7,72 \mu\text{M}$) zur unbehandelten Kontrolle (Nitrit: $0,01 \pm 0,01 \mu\text{M}$, Nitrat: $5,27 \pm 2,18 \mu\text{M}$). Wird für 60 Sekunden behandelt, steigen sowohl die Nitrit, als auch die Nitrat-Konzentration weiter an (Nitrit: $52,5 \pm 12,18 \mu\text{M}$, Nitrat: $80,1 \pm 50,4 \mu\text{M}$). Nach einer Behandlung von 360 Sekunden haben sich die Konzentrationen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle vervielfachert (Nitrit: $378,68 \pm 57,65 \mu\text{M}$, Nitrat: $476,18 \pm 295,9 \mu\text{M}$), siehe Abb. 12.

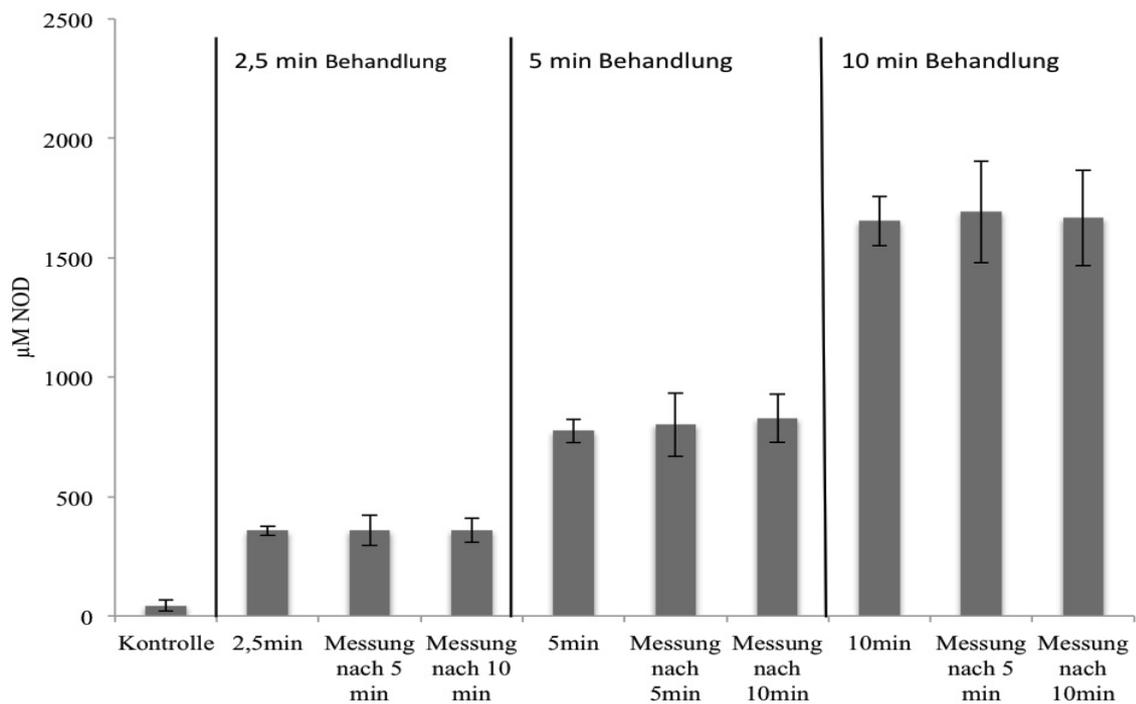


Abb. 11: Behandlung von 3 ml PBS und Messung der NOD-Konzentration im Verlauf

Die Konzentration der NO-Derivate in 3 ml PBS nach Behandlung mit Kaltplasma bleibt auch nach 10 min noch stabil. Zusätzlich zeigt sich, dass eine längere Behandlungszeit zu einer erhöhten Akkumulation von NO-Derivaten im PBS führt. N = 3

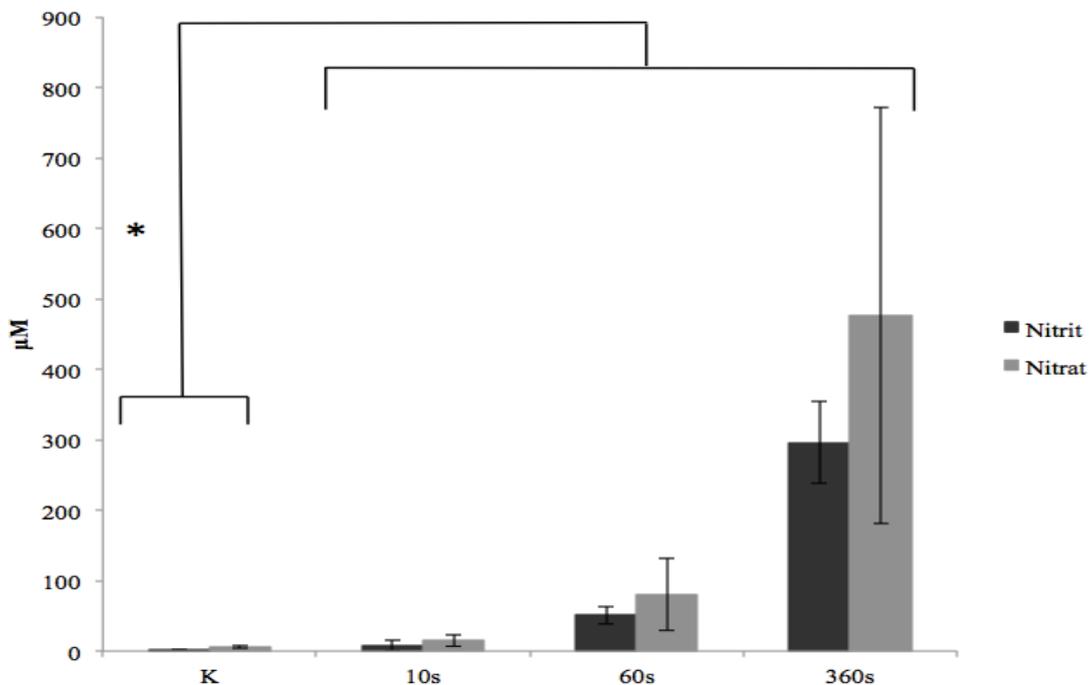


Abb. 12: Behandlung von 500µl PBS und Messung der Nitrit und Nitrat-Konzentration

Plasmabehandlung von 500µl PBS führt zu einer signifikanten Erhöhung der Nitrit- und Nitrat-Konzentrationen abhängig von der Behandlungsdauer. K = unbehandelte Kontrolle. N = 5, * Signifikanzniveau $p < 0,05$

4.2.2 Kaltplasmabehandlung von humanem Blutplasma

Im nächsten Schritt wurde das Blutplasma gesunder Probanden mit Kaltplasma behandelt und in der CLD gemessen. Da das Blutplasma natürlicherweise ein wichtiges Medium des feuchten Milieus einer Wunde ist, wurde es hier und in den folgenden Untersuchungen für den Versuchsaufbau genutzt. Im folgenden Kapitel wurden die Nitrit-, Nitrat- und S-Nitroso-Konzentrationen gemessen. Zusammenfassend wurde im Vergleich zu den Messungen im PBS weniger NO-Derivate nachgewiesen. Es zeigte sich jedoch eine ähnliche Korrelation zwischen Behandlungszeit und Konzentration der Derivate im Blutplasma.

Die initiale Konzentration der NO-Derivate im humanen Blutplasma liegt im niedrigen μM -Bereich (Nitrit: $0,07 \pm 0,17 \mu\text{M}$, Nitrat: $34,73 \pm 19,08 \mu\text{M}$), ähnlich wie beim neutralen PBS (siehe Abb.12). Bereits nach einer kurzen Behandlungszeit von 10 s steigen die Werte der NO-Derivate signifikant an (Nitrit: $8,65 \pm 8,72 \mu\text{M}$, Nitrat: $47,22 \pm 23,95 \mu\text{M}$). Da das Nitrit zunächst nur in geringsten μM -Konzentrationen vorliegt, sind bei dieser geringen Behandlungszeit die Standardabweichungen noch sehr hoch. Nach einer Behandlungszeit von 60 Sekunden zeigt sich eine Verdreifachung der Nitrat- Werte ($121,53 \pm 90,45 \mu\text{M}$) und sogar eine Vervierzigfachung der Nitrit-Werte ($45,91 \pm 2,38 \mu\text{M}$).

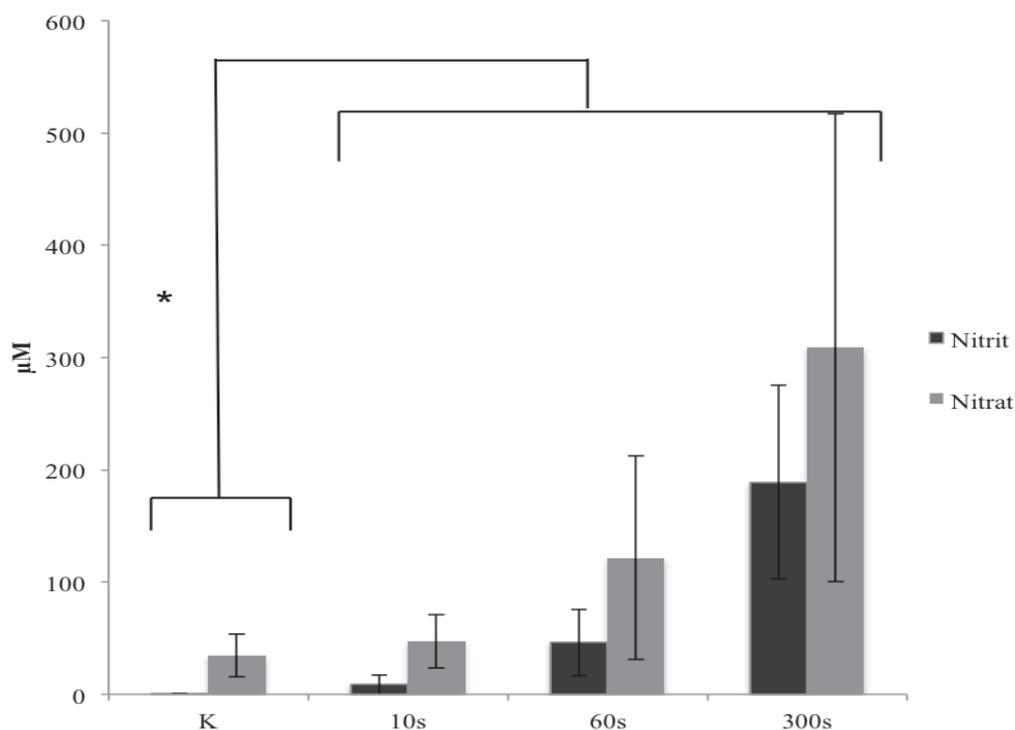


Abb. 13: Messung der NOD-Konzentrationen in DBD-Behandeltem humanem Blutplasma

Eine Kaltplasmabehandlung von humanem Blutplasma führt dosisabhängig zu einer signifikanten Erhöhung von Nitrit und Nitrat. K bedeutet unbehandelte Blutplasmaprobe. N = 9, * Signifikanzniveau $p < 0,05$

Die Nitrit-Werte sind ähnlich wie die zuvor gemessenen Werte in 60 Sekunden behandeltem PBS, die Nitrat-Werte sind etwas höher als im PBS, siehe Abb.12. Die maximale Behandlungszeit in dieser Versuchsreihe war 300 Sekunden, nach dieser Zeit steigen Nitrit und Nitrat weiter signifikant an (Nitrit: $188,89 \pm 86,42 \mu\text{M}$, Nitrat: $308,72 \pm 208,26 \mu\text{M}$), siehe Abb. 13.

Zur Detektion von S-Nitrosoverbindungen wurde der Sulfalinamid-Assay benutzt und zeigte, dass es im Blutplasma nach DBD-Behandlung zu einer Anreicherung von proteingebundenem NO kommt. Abhängig von der Länge der Behandlungsdauer wurde eine höhere Konzentration in der CLD detektiert. Im Gegensatz zu den NOD-Konzentrationen im hohen dreistelligen Bereich, waren nun nur geringere RXNO-Konzentrationen bis $2,63 \mu\text{M}$ messbar. Im Vergleich zur unbehandelten Blutplasmaprobe ($0,04 \pm 0,009 \mu\text{M}$) zeigte sich nach DBD-Behandlung eine signifikante Erhöhung der RXNO-Konzentration, sowohl bei 30sekündiger Behandlung ($0,077 \pm 0,022 \mu\text{M}$), als auch nach 60 s ($0,36 \pm 0,13 \mu\text{M}$) und 300 s ($1,78 \pm 0,53 \mu\text{M}$), Signifikanzniveau jeweils $p < 0,05$, siehe Abb. 14.

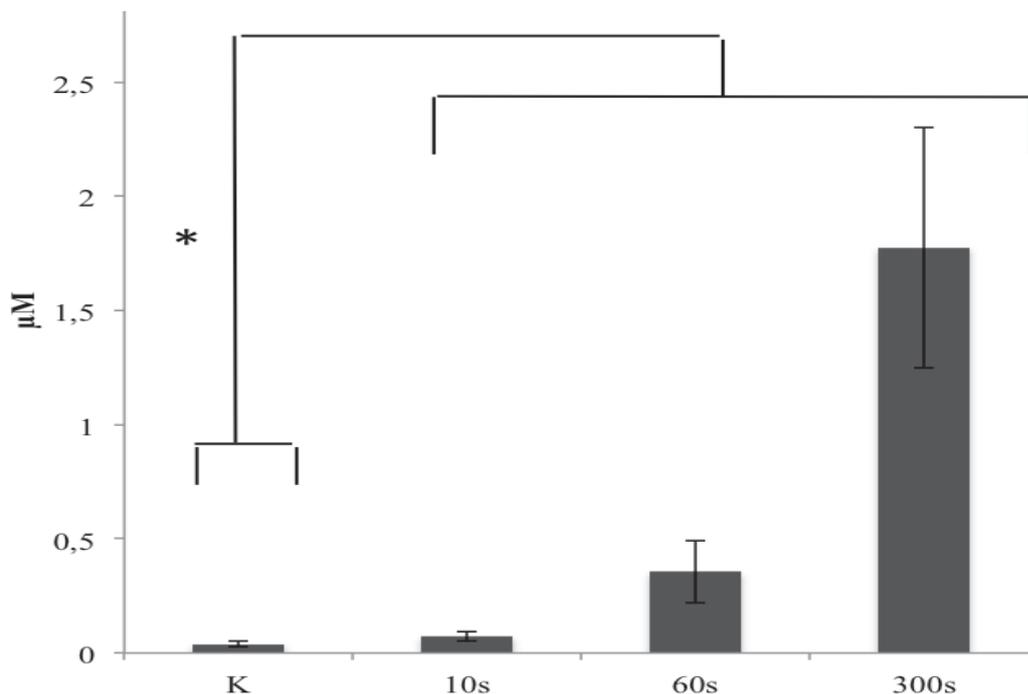


Abb. 14: Messung der RXNO-Konzentrationen in DBD-behandeltem humanen Blutplasma

Eine Kaltplasmabehandlung von humanem Blutplasma zeigt eine signifikante, dosisabhängige Steigerung von proteingebundenem NO in Form von S-Nitroso-Verbindungen. K bedeutet unbehandelte Blutplasmaprobe.

N = 6, * Signifikanzniveau $p < 0,05$.

4.3 Kaltplasmabehandlung von Hautexplantaten

4.3.1 NOD-Penetration der Epidermis

Um nachzuweisen, ob durch eine Kaltplasmabehandlung eine ausreichend hohe NOD-Konzentration generiert werden kann, damit diese auch die Epidermis der Haut überwinden und in tieferen Hautschichten eindringen kann, wurde Spalthaut definierter Dicke (0,7 mm und 0,3 mm) über einer Franzkammer mit Kaltplasma behandelt. Es wurde direkt nach der Behandlung und dann im Abstand von 10 Minuten die NOD-Konzentration im PBS der Franzkammer gemessen. Es zeigte sich, dass bei einer Hautdicke von 0,7 mm direkt nach der Behandlung über 10 Minuten noch kein Nitrit oder Nitrat im PBS nachweisbar ist. 10 Minuten nach der Behandlung steigen die Nitrit- und Nitratkonzentrationen langsam an (Nitrit $0,69 \pm 0,77$ nmol, Nitrat $5,61 \pm 5,52$), nach weiteren 10 Minuten steigen die Werte weiter an. Sie sind nun nahezu verdreifacht (Nitrit $3,26 \pm 2,12$ nmol, Nitrat $25,89 \pm 16,43$ nmol). Nach insgesamt 50 min ist der maximale Wert erreicht: Nitrit $11,72 \pm 2,87$ nmol und Nitrat $29,69 \pm 8,72$ nmol). Nach einer Behandlung von 5 Minuten kommt es ebenfalls zu einer langsam steigenden Penetration durch die Epidermis in das PBS (nach 10 Minuten: Nitrit $0,44 \pm 0,51$ nmol, Nitrat $2,33 \pm 2,42$). Die maximale Nitrat-Konzentration im PBS wurde 30 Minuten nach der 5 minütigen Behandlung gemessen. Die Werte steigen auf $11,37 \pm 8,0$ nmol, im weiteren Verlauf fallen sie etwas ab auf $6,97 \pm 4,95$ nmol. Die Nitritwerte hingegen steigen kontinuierlich an auf maximal $3,21 \pm 1,71$ nmol 50 Minuten nach einer 5minütigen Behandlungszeit, siehe Abb. 15.

Bei einer Behandlung von 2,5 Minuten zeigt nur einen geringen Anstieg im PBS unter der behandelten Spalthaut. Die Nitrit-Konzentration erreicht 40 Minuten nach der Plasmabehandlung maximal $1,2 \pm 0,41$ nmol. Die Konzentration des Nitrats hat ihren Höhepunkt nach 30 Minuten, ähnlich wie nach einer 5 minütigen Behandlung, bei einem Wert von $4,58 \pm 1,58$ nmol, in den weiteren Messungen fällt der Wert wieder ab (siehe ebenfalls Abb. 15). In den Messungen an einer dünneren Spalthaut (0,3 mm) wurden erwartungsgemäß deutlich höhere Werte im PBS gemessen. Nach einer 10minütigen Behandlung wurden nach 20 Minuten bereits $9,90 \pm 2,81$ nmol gemessen und der Maximalwert nach 40 Minuten erreicht ($10,87 \pm 2,75$ nmol), in der Messung nach 50 Minuten blieb die Nitrit-Konzentration nahezu stabil bei $10,3 \pm 3,39$ nmol. Der Nitratwert nach 10 Minuten Plasmabehandlung ist 20 Minuten nach der Behandlung mit $34,41 \pm 4,41$ nmol deutlich höher, genau wie bei der 0,7mm messenden Spalthaut. Nach 30 und 40 Minuten bleibt auch die Nitrat-Konzentration stabil bei $52,08 \pm 41,4$ nmol bzw. $54,05 \pm 47,37$ nmol.

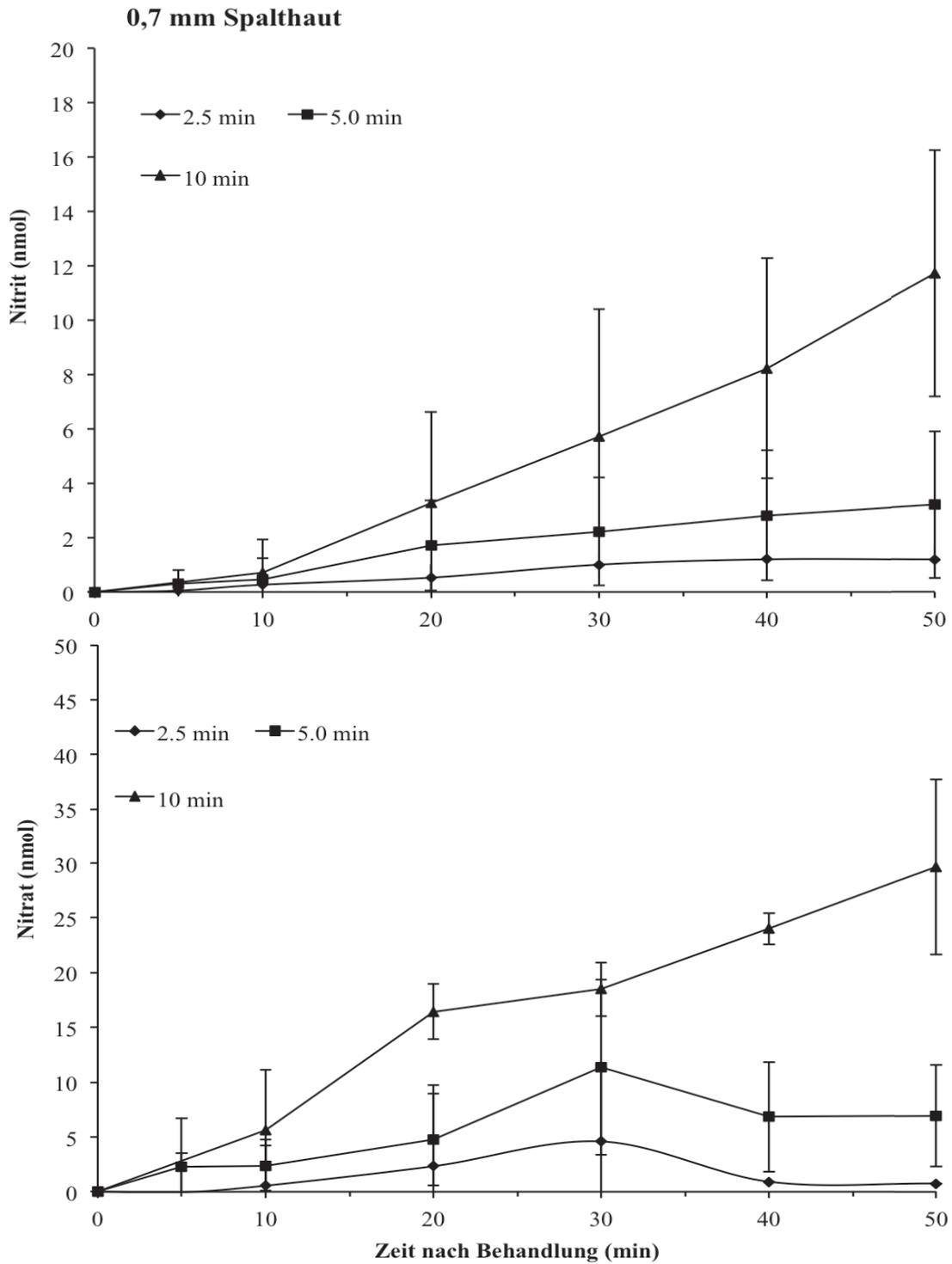


Abb. 15: NOD-Penetration durch 0,7 mm dicke Spalthaut

Mit einem Dermatome abgetrennte humane Haut mit einer Dicke von 0,7 mm wurde über eine Franzkammer gespannt und 10, 5 und 2,5 Minuten mit Kaltplasma behandelt. In der Franzkammer befand sich 3 ml PBS in dem direkt nach der Behandlung und dann alle 10 Minuten die NOD-Konzentration gemessen wurde. N = 5

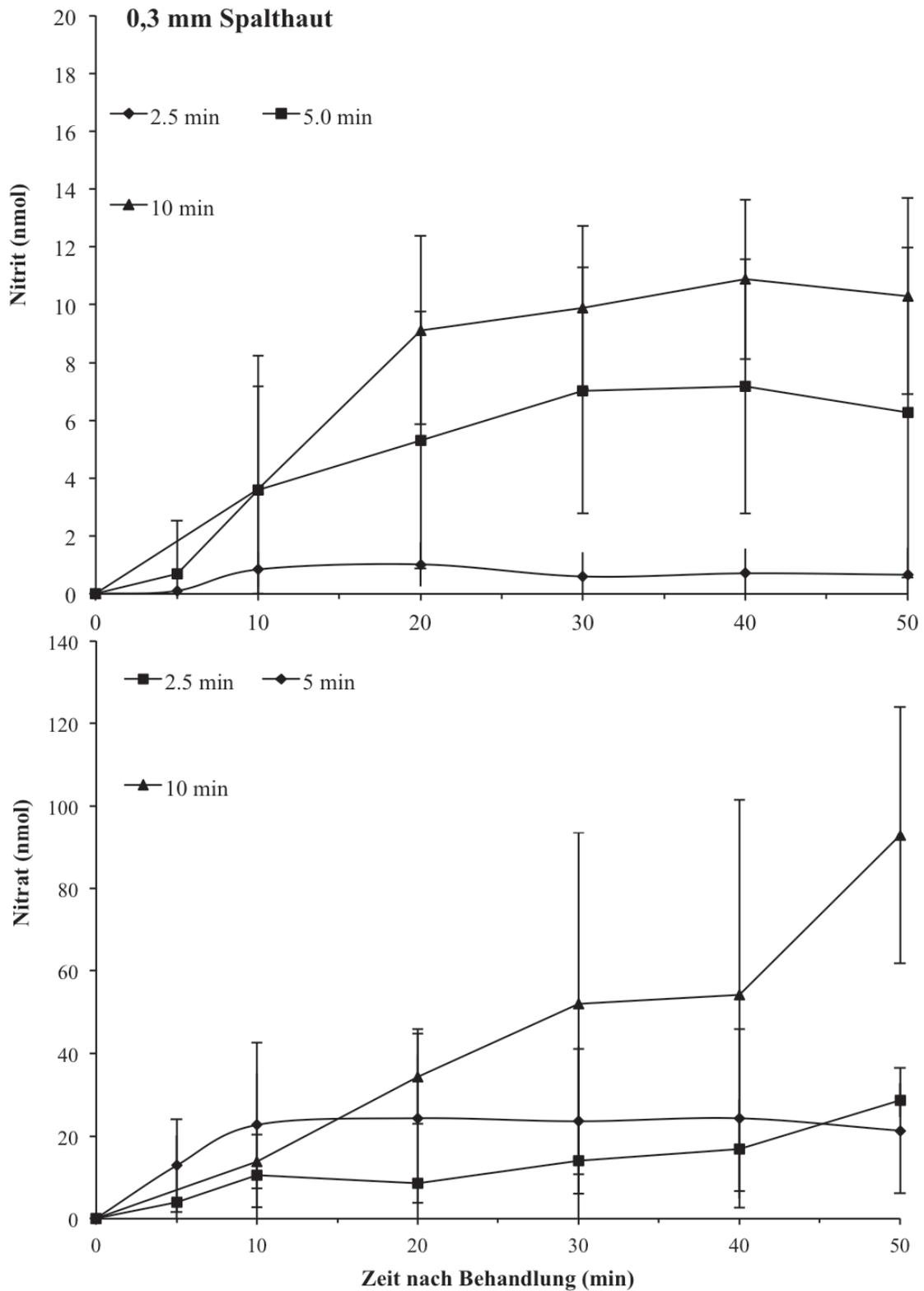


Abb. 16: NOD-Penetration durch 0,3 mm dicke Spalthaut

Mit einem Dermatome abgetrennte humane Haut mit einer Dicke von 0,3 mm wurde über eine Franzkammer gespannt und 10, 5 und 2,5 Minuten mit Kaltplasma behandelt. In der Franzkammer befand sich 3 ml PBS in dem direkt nach der Behandlung und dann alle 10 Minuten die NOD-Konzentration gemessen wurde. N = 5

Weitere 10 Minuten später, bei Minute 50 nach Behandlung kommt es zu einer Verdoppelung der Nitrat-Konzentration auf $92,87 \pm 31,12$ nmol. Eine 5minütige Behandlungszeit zeigt einen ähnlichen Kurvenverlauf der Nitrit-Konzentration wie nach einer 10minütigen Behandlung mit einem Anstieg bis auf $7,41 \pm 4,4$ nmol nach 30 Minuten und dann einen langsamen Abfall auf $6,26 \pm 5,7$ nmol 50 Minuten nach der Plasmabehandlung. Der Verlauf der Nitrat-Konzentration nach 5minütiger Behandlung stellt sich folgendermaßen dar: nach 20 Minuten wird die höchste Konzentration von $24,03 \pm 8,34$ nmol gemessen, dieser Wert bleibt in den weiteren Messungen stabil. Einen erneuten Anstieg wie nach 10 Minuten Plasmabehandlung wird nicht gemessen. Nach einer 2,5 minütigen Behandlung kommt es nur zu geringen Nitrit- und Nitratkonzentrationen. Der Peak der maximalen Nitrit-Konzentration wird nach 40 Minuten bei $1,11 \pm 1,35$ nmol erreicht. Die Nitratkonzentration steigt ebenfalls zunächst langsam an auf $13,93 \pm 27,8$ nmol nach 30 Minuten. Nach 50 Minuten kommt es zu einer Verdoppelung des Wertes auf $28,71 \pm 4,15$ nmol (siehe Abb. 16). Die Daten sind nicht signifikant, zeigen aber das Nitrit und Nitrat in die Epidermis aufgenommen werden und von dort nach einer bestimmten Latenzzeit freigesetzt werden. Nitrat kommt in höheren Konzentrationen vor als Nitrit.

4.3.2 NOD-Nachweis in Hauthomogenisaten

Weitergehend wurden vollständige Hautexplantate, bestehend aus Epidermis und Dermis behandelt. Diese behandelten Explantate wurden anschließend für die NOD-Messung homogenisiert. Das Homogenisat entsprach einer Hauttiefe von 6 mm und einem Durchmesser von 8mm. Behandelt wurden sowohl Hautexplantate mit intakter Epidermis als auch Hautexplantate, bei der zuvor mit einem Dermatome die Epidermis entfernt wurde (im Weiteren als Dermis-Proben bezeichnet). Da die Daten nicht normalverteilt waren, wurde nach Wilcoxon getestet. Die Nitritkonzentration in intakter Haut ohne Behandlung beträgt $0,72 \mu\text{M}/\text{mg}$ Haut ($\pm 0,94$, $p < 0,05$) und steigt nach 10minütiger Behandlung auf $49,53 \mu\text{M}/\text{mg}$ Haut ($\pm 72,59$, $p < 0,05$). Vor der Plasma-Behandlung wurde eine Nitratkonzentration von $5,06 \mu\text{M}/\text{mg}$ Haut ($\pm 3,86$) gemessen, die Konzentration stieg in Abhängigkeit der Behandlungszeit nach einer 10minütigen Behandlungszeit auf $40,31 \mu\text{M}/\text{mg}$ Haut ($\pm 25,39$, $p < 0,05$), ähnlich wie bei dem zuvor beschriebenen Nitrit, siehe Abb. 17.

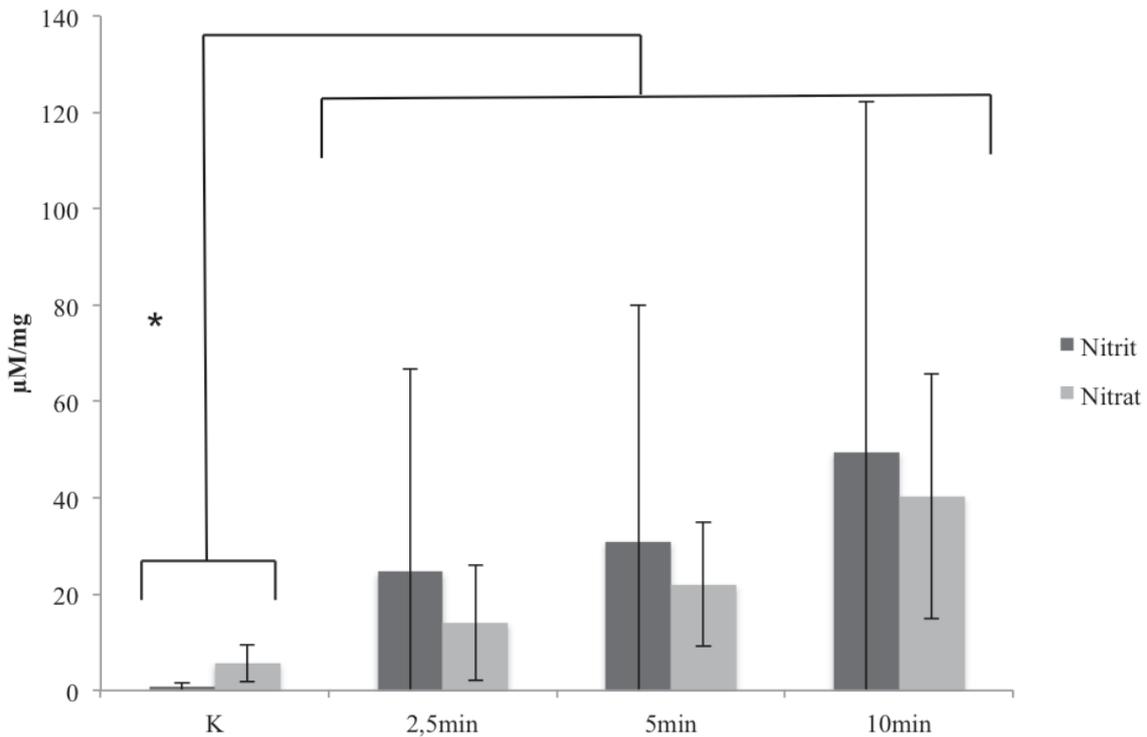


Abb. 17: Messung der NOD-Konzentrationen in DBD-behandelter Haut

Hautexplantate wurden mit dem DBD-Plasmastick behandelt und anschließend homogenisiert. In der CLD wurden die NOD-Konzentrationen der Homogenisate gemessen. Die Behandlungszeiten waren 2,5 min, 5 min und 10 min. K bedeutet unbehandelte Kontrolle. Es zeigte sich eine dosisabhängige Zunahme der NO-Derivate in der Haut. N = 5, * Signifikanzniveau $p < 0,05$.

Die Behandlung der Dermis-Proben ergaben Basiswerte von $1,22 \mu\text{M Nitrit/mg Haut}$ ($\pm 1,36$) und $10,03 \mu\text{M Nitrat/mg Haut}$ ($\pm 4,33$). Wie auch bei der intakten Haut beschrieben, stiegen die NO-Derivatkonzentration in der Dermis in Abhängigkeit von der Behandlungszeit an. Im Vergleich zur Kontrolle konnten nach 2,5-minütiger Behandlung Konzentrationen von $3,76 \mu\text{M Nitrit/mg Haut}$ ($\pm 3,60$) und $16,39 \mu\text{M Nitrat/mg Haut}$ ($\pm 8,47$) gemessen werden. Eine längere Behandlung von 5 min führt zu einer Verdopplung der Nitrit-Konzentrationen (Nitrit: $M = 6,85 \pm 4,76 \mu\text{M/mg}$). Die Nitrat-Konzentration verdreifachte sich nahezu ($M = 42,01 \pm 22,81 \mu\text{M/mg}$). Die maximale Behandlungszeit von 10 min führte zu einer Erhöhung der Nitrit-Konzentration auf $4,33 \mu\text{M/mg Haut}$ ($\pm 1,95$) und der Nitrat-Konzentration auf $72,88 \mu\text{M/mg Haut}$ ($\pm 27,90$), siehe Abb. 18.

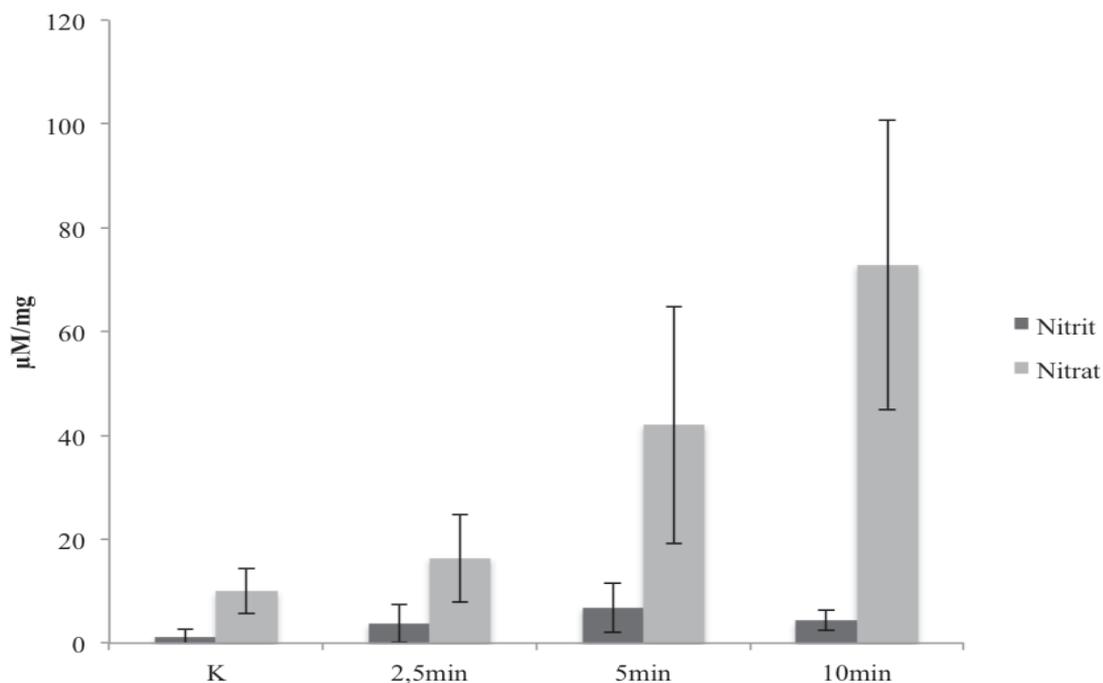


Abb. 18: Messung der NOD-Konzentrationen in DBD-behandelter Dermis

Plasmabehandelte Dermispräparate wurden homogenisiert und die NOD-Konzentrationen gemessen. Die Behandlungszeiten waren 2,5 min, 5 min und 10 min, K bedeutet unbehandelte Kontrolle. Es zeigte sich eine dosisabhängige Zunahme der NO-Derivate. N = 3.

Um die NO-Bindungen an Proteinen nachzuweisen, wurde das Sulfalinamid-Assay benutzt. Dabei wird das freie Nitrit gebunden und in der CLD nur noch die Proteingebundenen NO-Verbindungen nachgewiesen. In der Haut zeigten sich Basiswerte von RXNO-Konzentrationen von $0,07 \mu\text{M}/\text{mg}$ Haut ($\pm 0,11$), welche sich nach 2,5minütiger Behandlung auf $0,11 \mu\text{M}/\text{mg}$ Haut ($\pm 0,05$) und nach 5 min auf $0,24 \mu\text{M}/\text{mg}$ Haut erhöhten. Bei einer Behandlungszeit von 10 min zeigten sich Werte von $0,47 \mu\text{M}/\text{mg}$ Haut ($\pm 0,12$). In Hauthomogenisaten von Haut, bei der die Epidermis mit einem Dermatom entfernt wurde, zeigten sich ohne Behandlung RXNO-Konzentrationen von $0,01 \mu\text{M}/\text{mg}$ Haut ($\pm 0,008$) und nach 2,5 min Behandlung eine Konzentration von $0,20 \mu\text{M}/\text{mg}$ Haut ($\pm 0,13$).

Eine Verdopplung der Behandlungszeit auf 5 bzw. 10 min ergab RXNO-Konzentrationen von $0,34 \mu\text{M}/\text{mg}$ Haut ($\pm 0,27$) bzw. $0,55 \mu\text{M}/\text{mg}$ Haut ($\pm 0,37$), siehe Abb. 19.

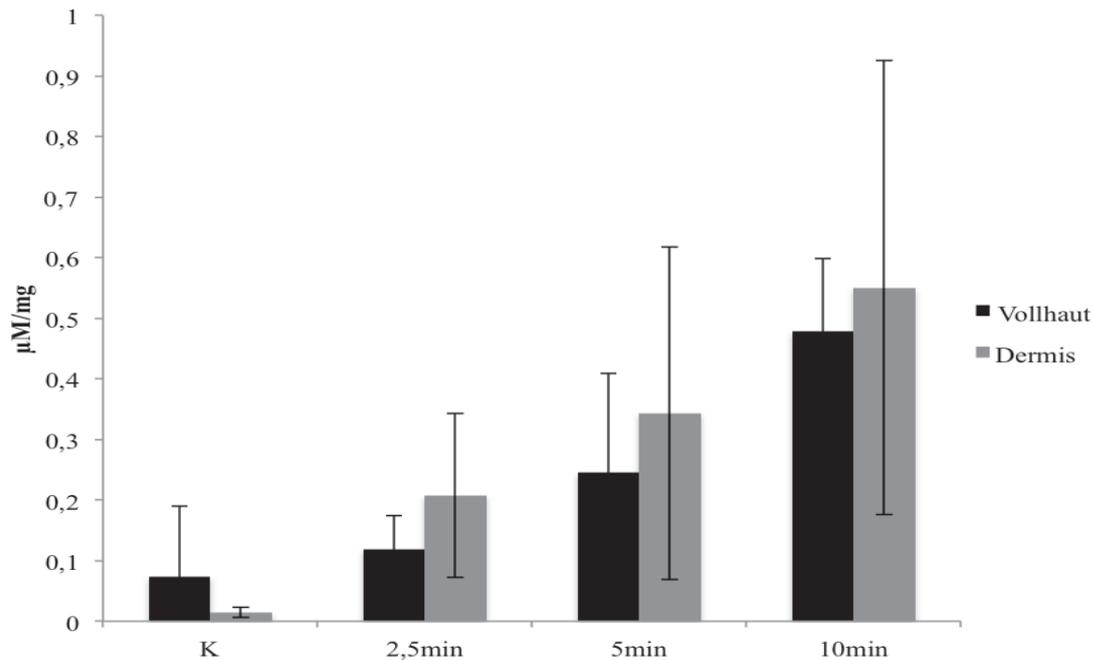


Abb. 19: Messung der RXNO-Konzentration in DBD-behandelter Haut

Hautexplantate wurden entweder direkt (Vollhaut) oder nach Entfernung der Epidermis mit einem Dermatom (Dermis) mit dem DBD-Plasmastick behandelt und anschließend homogenisiert. Zur Detektion der RXNO-Konzentration wurde das Sulfalinamid-Assay angewendet und das Homogenisat in die CLD injiziert und die RXNO-Konzentration bestimmt. Es wurde 2,5 min, 5 min und 10 min behandelt. Es zeigte sich eine dosisabhängige Zunahme der S-Nitroso-Verbindungen. K bedeutet unbehandelte Kontrolle. N = 5.

4.4 Einfluss von Kaltplasma auf Fibroblasten

4.4.1 Einfluss von Kaltplasma auf die Zellviabilität

Unter Zellviabilität versteht man die Aktivität der Gesamtheit einer Zellpopulation. Die Aktivität bzw. indirekt das dadurch dargestellte Wachstumsverhalten von humanen Fibroblasten nach der Behandlung mit Kaltplasma auf der Haut wurde mit dem CellTiter Blue Assay untersucht. Die adhärenenten Zellen wurden in 250µl humanem Blutplasma inkubiert und behandelt. Anschließend wurde jeden zweiten Tag eine Bestimmung der Zellviabilität durchgeführt. Als Positivkontrolle (K+) wurde Nitrat, Nitrit und Wasserstoffperoxid bei einem pH zwischen 5,5 und 6,5 in den in den Methoden genannten Konzentrationen hinzugefügt. Die Zugabe von TGF-β (10 ng/ml) in das Medium erfolgte, um eine Induktion der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten herbei zu führen.

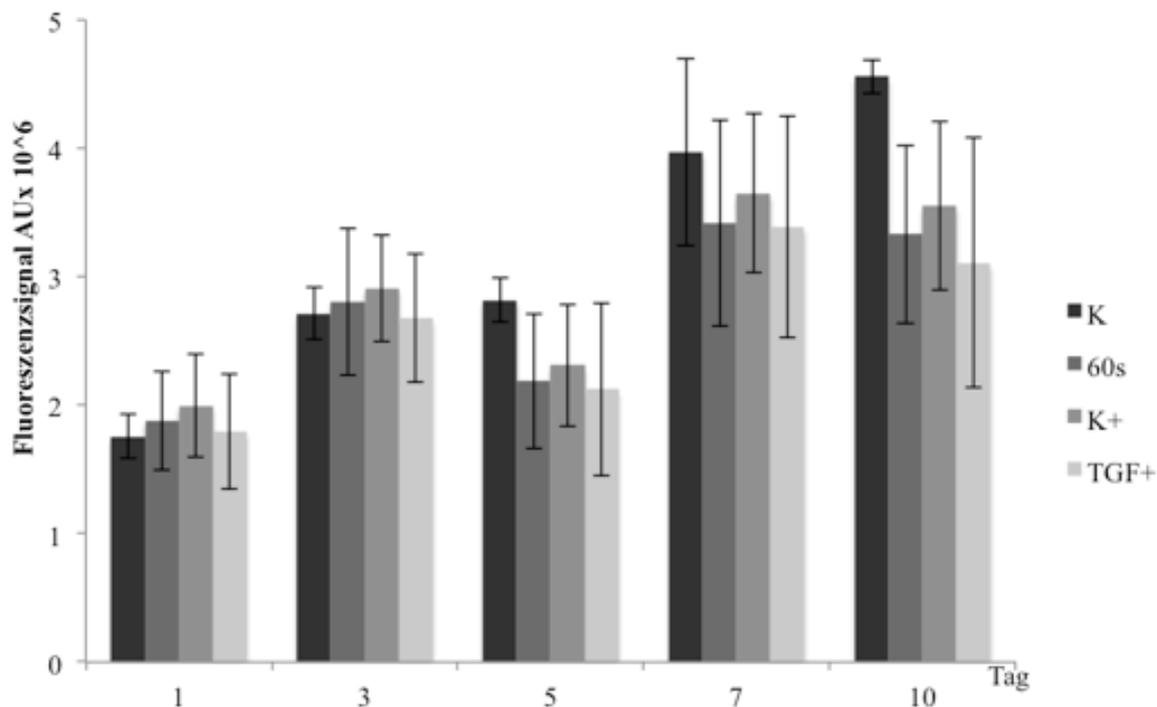


Abb. 20: Zellviabilitätsmessung von humanen Fibroblasten, die in Blutplasma mit Kaltplasma behandelt wurden

Es zeigte sich eine Stagnation der Zellviabilität, insbesondere ab Tag 5 nach der Behandlung mit kaltem Plasma und in den Proben, denen TGF- β hinzugefügt wurde. K bedeutet unbehandelte Kontrolle, K+ bedeutet eine Positivkontrolle mit 1,2 mM Nitrat, 300 μ M Nitrit, 200 μ M H₂O₂, TGF+ bedeutet eine Zugabe von TGF- β (10 ng/ml), N = 4

Damit sollte untersucht werden, inwiefern die Differenzierung Einfluss auf die Zellviabilität hat und ob diese Beobachtungen mit den Effekten der Kaltplasmabehandlung korreliert.

Abbildung 20 zeigt, dass die Aktivität der Zellen (gemessen als Fluoreszenzsignal nach Anwendung des CellTiter blue Assays) in den ersten 5 Tagen zunächst keine Unterschiede zeigen. Die Plasmabehandelten Zellen und die Positivkontrollen wachsen geringfügig aber nicht signifikant schneller. Ab Tag 7 kommt es zu einer Stagnation des Wachstums der 60 s lang behandelten Zellen ($34,17^{10 \times 6} \pm 0,8^{10 \times 6}$ an Tag 7, $33,31^{10 \times 6} \pm 0,7^{10 \times 6}$ an Tag 10), sowie der Positivkontrolle ($36,48^{10 \times 6} \pm 0,6^{10 \times 6}$ an Tag 7, $35,53^{10 \times 6} \pm 0,7^{10 \times 6}$ an Tag 10) und der Zellen, die zusätzlich TGF- β als Mediumzusatz erhielten ($33,90^{10 \times 6} \pm 0,9^{10 \times 6}$ an Tag 7, $31,1^{10 \times 6} \pm 0,9^{10 \times 6}$ an Tag 10), gegenüber der unbehandelten Kontrolle ($39,73^{10 \times 6} \pm 0,7^{10 \times 6}$ an Tag 7, $45,60^{10 \times 6} \pm 0,1^{10 \times 6}$ an Tag 10). An Tag 5 zeigt sich ein Rückgang der Zellaktivität, allerdings spricht das folgende weitere Wachstum gegen eine Toxizität. Eine Fehlerquelle für diesen Abfall der Zellaktivität konnte nicht gefunden werden, ist aber wahrscheinlich. Der weitere

Verlauf der Zellaktivität zeigt eine stagnierende bis leicht abfallende Aktivitätstendenz aller behandelten Zellen im Gegensatz zu den gut weiter wachsenden Zellen der Kontrolle. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese behandelten Zellen nun nicht mehr proliferieren, sondern beginnen sich zu differenzieren oder die Zellteilung einstellen. Diese erste Theorie wird dadurch unterstützt, dass die Positivkontrollen mit dem Differenzierungsinduktor TGF- β ebenfalls eine verminderte Aktivität zeigten. Zur Klärung dieser Hypothese wurde die Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten mit Hilfe des Western Blots untersucht (siehe hierzu Kapitel 4.4).

4.4.2 Einfluss von Kaltplasma auf die Zellmigration

Im Zuge der Wundheilung kommt es zu einer gewissen Bewegung der Fibroblasten, um den Hautdefekt zu verschließen. In diesem Versuchsaufbau sollte untersucht werden, inwieweit Kaltplasma diese Migration beeinflusst. Dafür wurde ein definierter Spalt zwischen den Zellen auf einer Wellplatte installiert und die Zellen nach Plasmabehandlung in humanem Blutplasma beobachtet.

Dieser Versuch wurde etabliert, nachdem eine Differenzierung der Fibroblasten zur Myofibroblasten durch Plasmabehandlung nachgewiesen wurde. Es wurde nun untersucht, ob gegebenenfalls die differenzierten Myofibroblasten mit ihrem kontraktilen Elementen einen Spalt schneller verschließen können, als unbehandelte Fibroblasten. Es zeigten sich kein signifikanter Unterschied zwischen plasmabehandelten Zellen und nicht plasmabehandelten Zellen bezüglich der Verkleinerung dieses Spaltes, siehe Abb. 21. Über die insgesamt 2 Tage verkleinert sich in allen Wellplatten der Spalt um durchschnittlich 80 % durch Einwachsen der Fibroblasten. Damit konnte eine erhöhte Migration nach Plasmabehandlung in diesem Versuch nicht nachgewiesen werden.

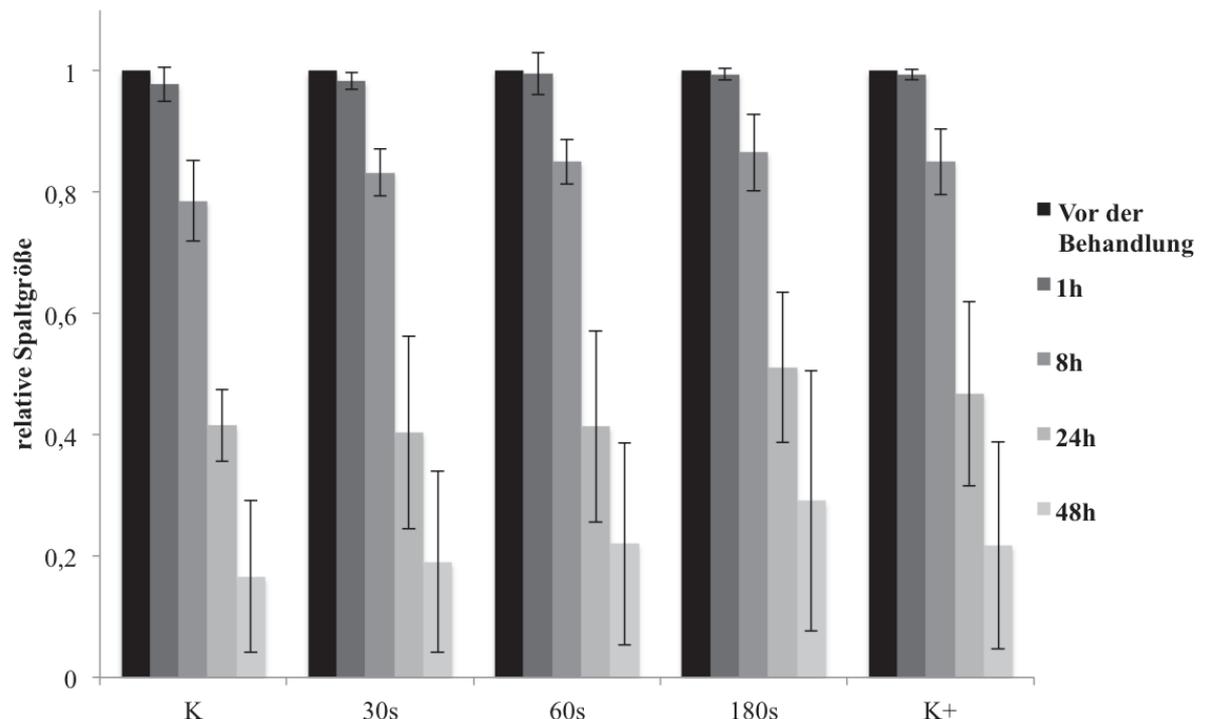


Abb. 21: Messung der Migration von kaltplasmabehandelten Fibroblasten

Es zeigt sich keine relevante Änderung der Spaltgröße in der beobachteten Zeit, unabhängig von Behandlungslänge und Zusammensetzung der Kontrollen. K+ bedeutet eine Positivkontrolle mit 1,2 mM Nitrat, 300 μ M Nitrit, 200 μ M H₂O₂ bei einem pH von 5,5 bis 6,5, N = 4

4.4.3 Einfluss von Kaltplasma auf die Differenzierung von Fibroblasten

Um nachzuweisen, dass Fibroblasten durch die Behandlung mit Kaltplasma zur Differenzierung angeregt werden, wurde Alpha-SMA detektiert. Dieses Protein wird von Myofibroblasten exprimiert, einer Differenzierungsstufe von Fibroblasten, welche vor allem in Wundgewebe vorkommen. Es wurden Hautexplantaten mit dem DBD-Plasmastick behandelt und nach 24 h Inkubationszeit Zellen aus diesen Hautproben isoliert und in Kultur genommen. Es sollte gezeigt werden, dass schon der einmalige Reiz des Kaltplasmas auf die Fibroblasten im intakten Zellverband der Haut reicht, um eine Differenzierung auszulösen (Methode siehe Kapitel 3.2.4 und 3.2.5).

Immunfluoreszenzmessung von Alpha-SMA in Fibroblasten

Mit einem Alpha-SMA-Maus-Antikörper, gekoppelt an einen Fluoreszenzsekundärantikörper wurde nach der DBD-Behandlung die Differenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten nachgewiesen. Es wurden sowohl Zellen aus dem Hautverband, als auch Fibroblasten in Kultur mit Kaltplasma behandelt und dann untersucht. Es zeigte sich das 60 Sekunden und

180 Sekunden Kaltplasma-Behandlung zu einem signifikanten Anstieg der Alpha-SMA-Konzentration in den Zellen führt (Kontrolle: $M = 11629,22 \pm 15004,37$; 60 s: $M = 150772,22 \pm 82175,87$; 180 s $M = 106172,27 \pm 78253,76$, $p < 0,01$). Eine Behandlung von nur 30 Sekunden führt zu keinem signifikanten Anstieg ($M = 11467,37 \pm 10163,27$), siehe Abb. 22. Die Positivkontrolle sind Fibroblasten, die mit TGF- β (10 ng/ml) und 1,2 mM Nitrat, 300 μ M Nitrit, 200 μ M H₂O₂) behandelt wurden. Da die Daten nicht normalverteilt waren, wurde die Signifikanz mit Hilfe des Wilcoxon-Tests bestimmt. In Abbildung 23 werden exemplarische Bilder der Fluoreszenzfärbungen gezeigt, auf denen die ASMA-positiven Zellen grün fluoreszieren. Die Zellkerne wurden mit Hoechst angefärbt und stellen sich blau dar.

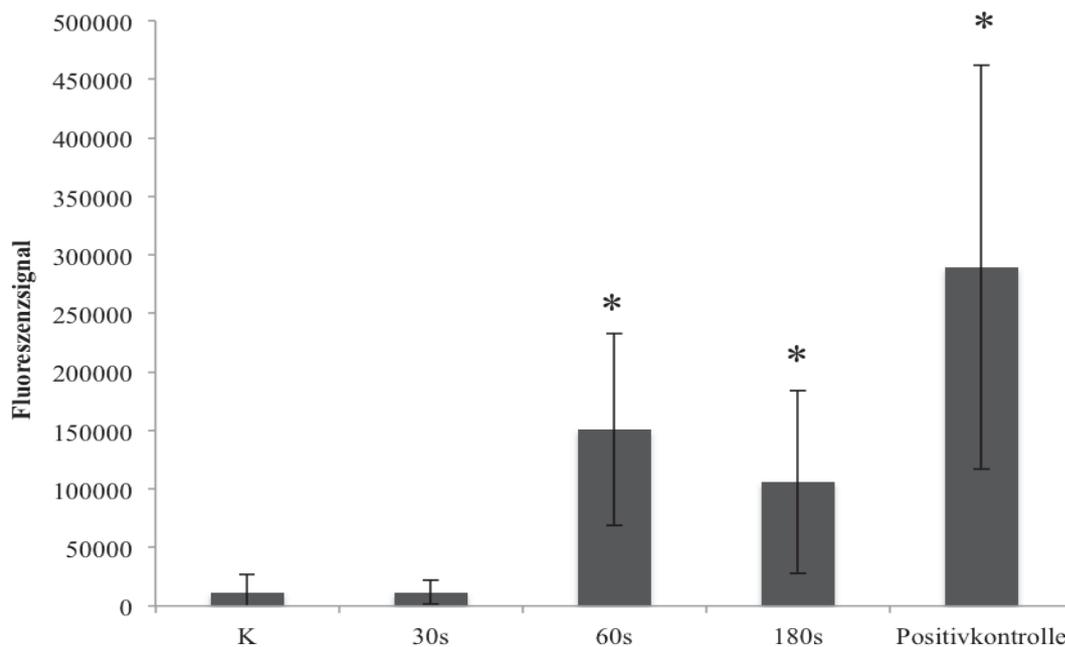


Abb. 22: Alpha-SMA Fluoreszenzdetektion in Fibroblasten nach DBD-Behandlung

Die Fibroblasten wurden aus Hautexplantaten isoliert, die 24 h zuvor mit dem DBD-Plasmastick behandelt wurden. Im Anschluss an die Isolation wurden die Zellen in Kultur genommen, nach 20 Tagen fixiert und mit einem α -SMA-Fluoreszenzfarbstoff angefärbt. Es zeigte sich eine signifikante Expression von Alpha-SMA.

K bedeutet unbehandelte Kontrolle. Positivkontrolle bedeutet die Zugabe von TGF- β (10 ng/ml)* Signifikant zur Kontrolle, $p < 0,01$. N = 4

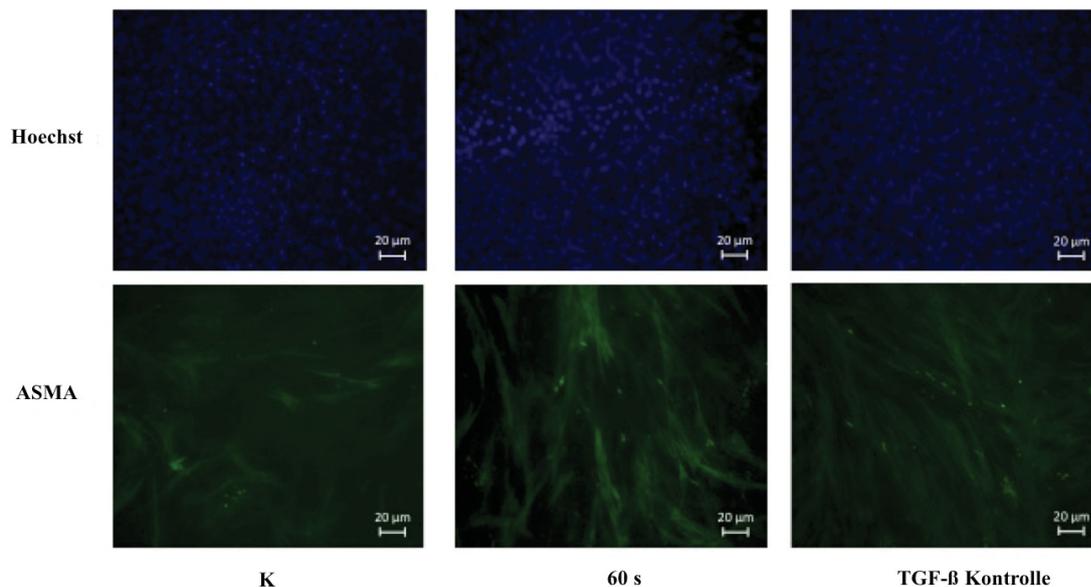


Abb. 23: Immunfloreszenznachweis der Alpha-SMA -Expression nach 60 sekundiger Behandlung von Fibroblasten mit dem DBD-Plasmastick (Axioskop, Zeiss, 400x Vergrößerung).

Es zeigt sich eine sichtbare Erhöhung des Fluoreszenzsignals der Alpha-SMA-Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (K). Der Positivkontrolle wurde TGF- β (10 ng/ml) hinzugefügt. N = 4

Alpha-SMA Nachweis mittels Western Blot

Zur Bestätigung der Ergebnisse der Alpha-SMA-Immunfluoreszenzfärbung wurde zusätzlich ein Western Blot durchgeführt. Dafür wurden adhärenente Fibroblasten in 250 μ l humanem Blutplasma mit dem DBD-Plasmastick behandelt und im Anschluss genauso kultiviert wie die isolierten Fibroblasten aus der Plasmabehandelten Haut für die zuvor beschriebene Immunfluoreszenzfärbung. Um nachzuvollziehen, ob allein die Kaltplasmabestandteile eine Differenzierung initiieren, wurde eine Kontrolle mit einem pH von 7,0 und Nitrit-, Nitrat- und Wasserstoffperoxidkonzentrationen entsprechend den zuvor gemessenen Werten angesetzt. Dabei zeigte sich, dass diese hier als Positivkontrolle bezeichnete Kontrolllösung zu einer erhöhten Expression des Alpha-SMA-Proteins führt (Kontrolle: $M = 0,01 \pm 0,00$; Positivkontrolle: $M = 1,01 \pm 1,08$, $p < 0,07$). Eine Kaltplasmabehandlung der Fibroblasten ergab schon nach 30 Sekunden einen signifikanten Anstieg der Alpha-SMA-Proteinkonzentration (30 s: $M = 0,84 \pm 0,75$, $p < 0,07$), bestätigt durch eine weitere Erhöhung nach 60 s und 180 s Behandlungszeit (60 s: $M = 0,78 \pm 0,81$; 180 s: $M = 1,08 \pm 1,29$, $p <$

0,07). Die mit TGF- β behandelten Fibroblasten, welches als Induktor der Differenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten benutzt wurde, wurden nicht mit Kaltplasma behandelt, aber auch in Blutplasma kultiviert. Hier zeigte sich die erwartete Erhöhung der Alpha-Konzentration mit einem Wert von 4,16 (\pm 1,70). Da die Werte bei kleiner n-Zahl nicht normalverteilt waren, wurde nach Wilcoxon getestet und für diese Messung ein p-Wert von 0,07 festgelegt, siehe Abb. 23.

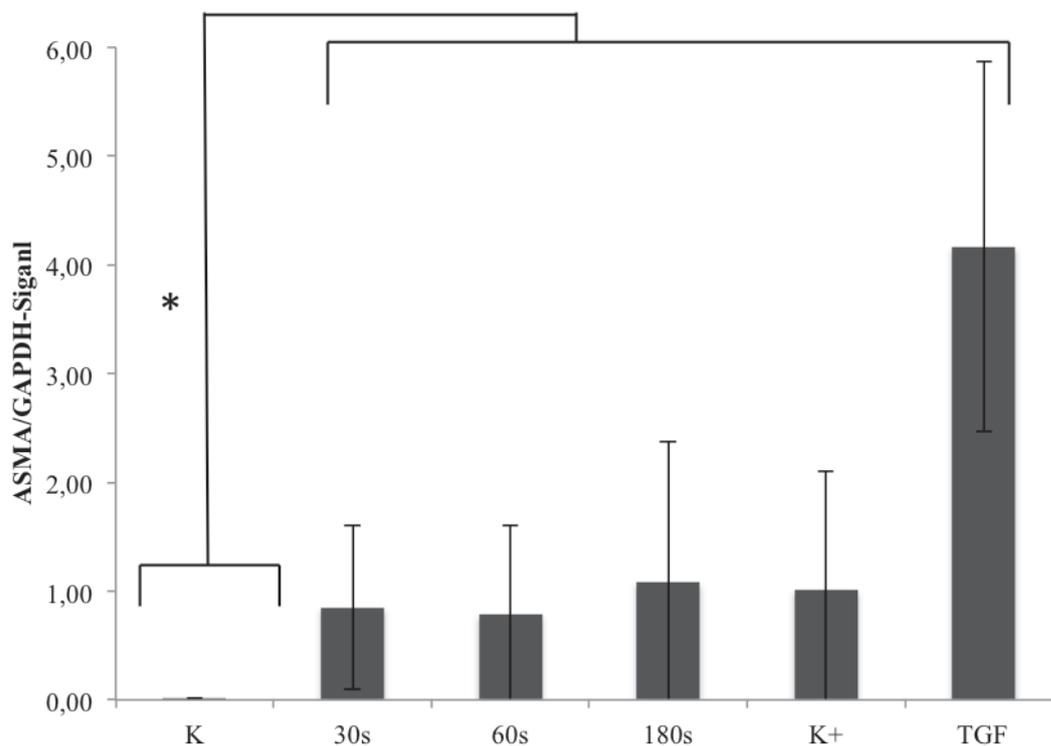


Abb. 23 Alpha-SMA-Detektion mittels Western Blot in DBD-behandelten Fibroblasten

Nach der Behandlung mit dem DBD-Plasmastick kommt es zu einer signifikanten Expression von Alpha-SMA. Positivkontrolle mit 1,2 mM Nitrat, 300 μ M Nitrit, 200 μ M HO₂ (K⁺), Die letzte Kontrolle im Diagramm (TGF) enthielt TGF- β (10 ng/ml) und wurde ebenfalls nicht mit Kaltplasma behandelt. N = 4,* p <0,07 (nach Wilcoxon)

5. Diskussion

In vielen bereits veröffentlichten Arbeiten erhofft man sich einen nahen Durchbruch in der Anwendung von Kaltplasma in der Medizin zur Bekämpfung von bis dahin unheilbaren oder chronischen Erkrankungen unter anderem als Therapieoption von chronischen Wunden [72, 171]. Die Hoffnung ist, ein individuell designbares Plasma zu erschaffen, was leicht anzuwenden und ohne Nebenwirkungen einsetzbar ist. Allerdings ist bisher noch nicht ausreichend verstanden, welche Komponenten des Kaltplasmas, was für biologische Effekte auf welches Gewebe haben und wie diese Effekte zu steuern sind. Umso wichtiger ist es, Grundlagenforschung zu betreiben und jede einzelne Komponente alleine zu betrachten und zu untersuchen, um eine Nutzung so sicher und effektiv wie möglich zu gestalten. Ziel dieser Arbeit ist es, einen weiteren Beitrag zum besseren Verständnis des kalten Plasmas und seiner Wirkungsweise zu geben. Speziell wurden dabei das im Kaltplasma entstehende Stickstoffmonoxid und seine Derivate bzw. dessen Oxidationsprodukte und ihre Einflussfaktoren auf menschliche Zellen und Gewebe in den Fokus genommen. Hintergrund ist die klinische Anwendung von Kaltplasma auf chronische Wunden, da das kaltplasmagenerierte Stickstoffmonoxid und seine Derivate über eine verbesserte Durchblutung und als wichtige Modulatoren im Wundheilungsprozess eine neue Therapieoption bieten könnten.

5.1 Toxizität des Kaltplasma

Der limitierende Faktor jeder neuen Technologie in der Medizin ist die Sicherheit der Anwendung. Es muss deshalb gewährleistet sein, dass keine akuten Schäden und keine Spätfolgen auftreten. Da bei Plasmaanwendungen immer reaktive Spezies entstehen, ist es wichtig zu wissen, ab wann diese Spezies zu irreversiblen Schäden an der DNA führen. Durch Anwendung des TUNEL-Assays wurde untersucht, ob die Behandlung von menschlicher Haut mit dem DBD-Plasmastick zu DNA-Schäden führt. Es zeigte sich, dass eine maximale Behandlungszeit von 6 min keine DNA-Einzel- oder Doppelstrangbrüche in menschlichen Hautzellen bewirkt. In weiteren Experimenten der Forschungsgruppe konnte gezeigt werden, dass auch ein artifizielles Epidermis-Model (Episkin) keine signifikante erhöhte Apoptoserate nach einer einstündigen Behandlung zeigt [48]. Diese Ergebnisse sind allerdings nur mit der hier benutzten Plasmaquelle reproduzierbar, in anderen Studien wurden bei kürzeren Behandlungszeiten Apoptoseinduktionen gesehen. Obwohl auch hier mit einer DBD-Elektrode gearbeitet wurde, sind die Ergebnisse nur bedingt vergleichbar, denn der Versuchsaufbau, die Beschichtung der Elektrode und die Energiedosis (J/cm^2) unterscheiden

sich [60]. Ausgehend von diesen Ergebnissen konnte nun für alle folgenden Versuche die maximale Behandlungszeit für die verwendete Plasmaquelle festgelegt werden. Es wurden Zellen und Gewebe bis zu 5 Minuten behandelt. Da es bereits bei diesen Behandlungszeiten zu relevanten Effekten kam, wurde die Behandlungszeit nicht verlängert. Der Vergleich mit anderen Studien und Versuchsaufbauten zeigt aber, wie wichtig es ist, die Grundeinstellungen der Plasmaquelle zu kennen, um die Effekte wirklich verstehen und reproduzieren zu können. In der ersten Phase der Beurteilung der Plasmaquelle ist es also essentiell, die Dosis und Behandlungszeit zu kennen, in der es noch nicht zu Schäden der DNA kommt.

Die potenziell toxische Wirkung des Plasmas bietet aber auch Optionen in der Bekämpfung von Bakterien. Dieser Aspekt ist besonders interessant vor dem Hintergrund, dass eine chronische Wunde häufig bakteriell besiedelt ist, nicht selten auch durch multiresistente Keime [34]. Napp *et al.* zeigten in einer *in vitro* Studie das insbesondere diese Keime sensibel auf eine wenige Sekunden dauernde DBD-Plasmabehandlung reagieren [172]. Der toxische Effekt wird ausgelöst durch reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies und kann auch mit anderen Plasmaquellen gezeigt werden [53, 173]. Es muss also die spezifische Dosis evaluiert werden, die toxisch für Bakterien ist, aber noch unschädlich für humane Zellen. Eine maximale Behandlungsdauer von bis zu 6 Minuten, welche in dieser Arbeit gezeigt wurde, bietet also ausreichend Spielraum, um an Bakterienkulturen die genaue bakterizide Dosis zu definieren. Kritisch muss allerdings hinterfragt werden, ob nicht langfristig Schäden aus einer Plasmabehandlung resultieren. Hierzu gibt es auf diesem sehr jungen Forschungsgebiet noch keine Daten, da die klinische Anwendung erst seit einigen Jahren und auch nur an einem kleinen Patientenkollektiv stattfindet.

5.2 Anwendung in Flüssigkeiten und auf der Haut

Stickstoffmonoxid und seine Derivate spielen in vielen Stoffwechselwegen eine wichtige Rolle. Eine Wundheilungsstörung kann entstehen bzw. aggraviert werden, weil ein Defizit von NO und seinen Derivaten vorliegt [138]. Dieses wurde schon in den 1990er Jahren erkannt und in den folgenden Jahren wurden einige Methoden entwickelt, um die NO-Konzentration in chronischen Wunden zu beeinflussen. Dazu zählen unter anderem eine Arginin-Diät um eine Verbesserung der iNOS-Expression zu erreichen [140, 174], Polymere, welche als Wundaufgabe benutzt werden und NO freigeben [175, 176] und eine Therapie mit gasförmigem NO [177]. Bisher ist keine dieser Methoden in der Praxis angekommen. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass der DBD-Plasmastick die NO-Derivate Nitrit und Nitrat in Konzentrationen bis zu 1654,55 μM (\pm 213,31 μM) in neutralen Flüssigkeiten (PBS) nach 10 minütiger Behandlungszeit und bis zu 774,99 \pm 133,29 μM nach

5 Minuten Behandlung freisetzt. Interessant ist, dass die Konzentrationen der gelösten NO-Derivate über einen gewissen Zeitraum stabil messbar sind und in gleichbleibender Konzentration in der Flüssigkeit vorliegen. Dies lässt darauf schließen, dass die Effekte der NO-Derivate auch unabhängig von der direkten Anwendung des Plasmasticks z.B. in Form von Plasma-behandelten Flüssigkeiten anwendbar sind. Und es zeigt, dass die NO-Verbindungen in flüssigem Milieu, wie z.B. im Bereich einer Wunde stabil und damit länger wirksam sein könnten. Gemessen wurden hier immer Nitrat und Nitrit, welche als NO-Speicher und Donatoren fungieren, da NO selbst sehr flüchtig ist und nur eine Halbwertszeit von wenigen Sekunden hat. Die klinische Relevanz, nicht nur im Bereich der Wundheilung, dieser Ergebnisse wird unterstützt durch Studien, in denen Krebszellen nach Behandlung mit Plasma-aktiviertem Medium (PAM) eine erhöhte Apoptoserate zeigten [178]. Dabei wurde auch gezeigt, dass die Effekte nahezu äquivalent zu einer reinen Exposition der Zellen mit Wasserstoffperoxid und Nitrit ohne Plasmabehandlung sind. Dies bedeutet, dass es noch weitere reaktive Spezies im Plasma gibt, die einen Effekt auf die behandelten Zellen haben [179]. Die Apoptose wird ausgelöst durch die reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies, die durch die Zellmembranen diffundieren und wie bereits mehrfach beschrieben, durch Oxidation von wichtigen Hämproteinen in der Atmungskette, die Freisetzung von proapoptotischen Faktoren auslösen. Zusätzlich wird durch die oxidative Schädigung der DNA der proapoptotische Faktor PARP-1 (Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1) freigesetzt. Insbesondere Tumorzellen sind, anders als gesunde Zellen, aufgrund ihrer erhöhten Zellteilungsrate anfälliger für oxidativen Stress [180-182]. Dieser Exkurs in die Anwendung von Plasma-aktivierter Flüssigkeit in der Tumorforschung zeigt, dass die freigesetzten Radikale zwar potenziell toxisch für humane Zellen werden können, aber gesunde Zellen durch die Hochregulation von Antioxidantien geschützt sind. Zudem werden damit die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützt, die zeigen, dass die Effekte der Kaltplasmabehandlung im feuchten Milieu einer Wunde über eine längere Zeit auch nach Beendigung der Behandlung ablaufen. Auf Wunden wurde bisher vor allem die Anwendung von Plasmasticks untersucht, da hier die direkte Anwendung des Plasmas gut möglich ist. Allerdings ist es vorstellbar, dass auch in der Behandlung von chronischen Wunden PAM eingesetzt werden können, z.B. bei schwer erreichbaren Wundgebieten oder wenn ein Plasmastick nicht anwendbar ist (bettlägerige Patienten zuhause oder im Altenheim). Da der Durchmesser der hier verwendeten Elektrode mit 1 cm relativ klein ist, muss für die Behandlung großflächigerer Wunden die Entwicklung größerer Elektroden erfolgen, oder eben eine Plasma-aktivierte Flüssigkeit zur Wundbehandlung entwickelt werden. Zu beachten ist, dass

die Bezeichnung Plasma-aktiviertes Medium viele, verschieden zusammengesetzte Lösungen beinhaltet, unter anderem auch Medien mit fetalem Kälberserum (FBS). Je nach Zusammensetzung kann es zu unterschiedlicher Effektstärke des Plasmas kommen, da z.B. das FBS als Radikalfänger wirkt [183].

In dieser Arbeit wurde deshalb neben PBS auch Blutplasma mit dem DBD-Plasmastick behandelt. Die Behandlung von Blutplasma ergab eine ebenfalls streng Behandlungszeit-abhängige Akkumulation von NO-Derivaten. Allerdings sind die Messergebnisse insgesamt minimal geringer als in der neutralen Flüssigkeit PBS. Dies kann dadurch erklärt werden, dass im Blutplasma verschiedenste Proteine (v.a. Albumin 60%) vorliegen, mit denen das NO, aber auch das Nitrit und Nitrat reagieren und dadurch gebunden sind. Dass solche Prozesse stattfinden, zeigt die Messung der S-Nitroso-Verbindungen. Hier zeigt sich nach der Behandlung ein Anstieg des proteingebundenen NO. Dies unterstützt die These, dass Plasmaproteine als Radikalfänger die Effekte des Plasmas abmildern könnten. Allerdings waren die Konzentrationen im nano- bis einstelligen Mikromolaren Bereich, so dass die Verminderung der Wirkung in den hier untersuchten Versuchsaufbauten wohl marginal sein wird. Zusätzlich wurde aber auch nachgewiesen, dass z.B. S-Nitrosoalbumin nicht nur als NO-Akzeptor fungiert, sondern auch als NO-Speicher und Donator [184]. Damit kann der verlängerte Effekt der Plasmawirkung auch durch die Entstehung dieser Verbindung erklärt werden. Das Blutplasma wurde in den folgenden Zellversuchen als Medium genommen, um das feuchte Milieu einer Wunde nachzubilden.

Bakterien, die in der feuchten Umgebung einer Wunden wachsen und einen Biofilm bilden, sind vor allem *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa*. Diese aeroben Bakterien sind häufig resistent gegen eine antibiotische Therapie [2, 185]. Durch physikalisches Kaltplasma konnte eine signifikante Reduktion dieser Bakterien erreicht werden. Der genaue Mechanismus ist bisher nicht bekannt, allerdings wird eine multifaktorielle Wirkung auf die bakterielle DNA, wichtige Proteine und die Zellmembran beschrieben [186]. Das in dieser Arbeit untersuchte Stickstoffmonoxid, sowie seine Derivate sind einige der potenziellen bakteriziden Komponenten. Es konnte in Studien gezeigt werden, dass Nitrit das Wachstum genau dieser Bakterien hemmt und sie abtöten kann, indem es Hämproteine der Atmungskette oxidiert [187]. Dieser Mechanismus führt dazu, dass noch mehr Sauerstoffteilchen in das Bakterium diffundieren und dort zu Superoxiden und Wasserstoffperoxid oxidieren. Durch das NO werden aber die bakteriellen antioxidativen GSH-Proteine bereits oxidiert und damit inaktiviert. Im Folgenden kann das Wasserstoffperoxid über Oxidation der DNA und wichtiger Proteinen dem Bakterium weiter

schaden und zum Zelltod führen. Für menschliche Zellen kann diese Kombination aus Wasserstoffperoxid und NO-Derivaten ebenfalls toxisch sein, allerdings sind mehr Antioxidantien und weniger eisenhaltige Proteine vorhanden. Damit wird eine höhere Dosis notwendig, um zu einem Zellschaden zu führen [188].

Aber auch weitere positive Effekte wie eine Vasodilatation und eine Induktion der Immunreaktion könnten ausgelöst werden. Immunreaktionen werden v.a. von NO direkt durch Induktion und Steuerung der Aktivität von Cytokinen (v.a. IL-1, IL-8 und TNF- α) kontrolliert [87, 153]. Allerdings muss noch untersucht werden, wie viel NO wirklich in den Zellen nach Plasmabehandlung ankommt, denn es hat nur eine kurze Halbwertszeit und ist sehr reaktiv. Das NO zum Teil in Wundgewebe eindringen kann und dort messbar ist, konnten Shekhter *et. al.* nach Behandlung von Wunden mit gasförmigem NO nachweisen [89]. Die NO-Derivate Nitrit und Nitrat sind weniger reaktiv und stabilere Verbindungen, die aber auch in das Gewebe diffundieren können und als NO-Donatoren fungieren. Nitrit hat alleine keine vasodilatatorischen Effekte [189], aber über die Oxidation von Hämproteinen, v.a. Hämoglobin unter Anoxie und Hypoxie kommt es zur Generierung von NO. Dies ist eine wichtige Reaktion zum Auslösen einer hypoxischen Vasodilatation im Blutkreislauf [190, 191]. Bei der Oxidation entstehen, wie schon zuvor beschrieben, die freien Radikale Superoxid und Peroxid und Methämoglobin [192]. Diese sind toxisch, ihre Wirkung kann aber durch Ascorbat gemindert werden und das Methämoglobin durch die Methämoglobinreduktase wieder reduziert werden. Nitrit und Nitrat, welches in Plasmabehandelten Medien gelöst wird, kann per Diffusion in das Gewebe und Zellen eindringen und teilweise auch über membranständige Transporter in die Zellen eindringen [193]. Diese Mechanismen könnten im hypoxischen Wundmilieu zu einer verbesserten Perfusion führen und den Effekt des meist nur wenige Sekunden stabilen NO-Moleküls prolongieren.

Nachdem nachgewiesen wurde, dass sich NO-Derivate in relevanten Konzentrationen in neutralen Flüssigkeiten und in Blutplasma lösen und dort über mehrere Minuten stabil sind, wurde menschliche Haut mit dem DBD-Plasmastick behandelt. Es wurde intakte Haut und Haut behandelt, bei der die Epidermis entfernt wurde. Nach der Behandlung wurde die behandelte Hautprobe homogenisiert, um zu messen, wie hoch die Konzentrationen der NO-Derivate in der Haut sind. Die Hautdicke betrug 6 mm. Die Ergebnisse zeigen, dass NO, Nitrit und Nitrat in der Haut akkumulieren und ihre Konzentrationen nach Plasmabehandlung signifikant ansteigen. Damit ist bewiesen, dass die Plasmaeffekte sich nicht nur an der Oberfläche und im Flüssigkeitsfilm auf der Haut abspielen, sondern dass die reaktiven

Stickstoffspezies in die Haut eindringen und dort reagieren können. Dies wird dadurch unterstützt, dass sich auch ein Anstieg der S-Nitrosoverbindungen nach Plasmabehandlung zeigte. In der Dermis, also in den Hautstücken bei denen die Epidermis zuvor entfernt wurde, war die Konzentration etwas, aber nicht signifikant höher. Damit zeigt sich, dass in der Haut NO an Proteine gebunden wird. In der plasmabehandelten Dermis fiel auf, dass die Nitrit-Konzentrationen viel geringer sind, als in der vollständigen Haut. In der intakten Haut (mit Epidermis) wird eine deutlich höhere Konzentration von Nitrit als von Nitrat gemessen. Diesen Effekt kann man dadurch erklären, dass die Halbwertszeit von NO extrem divergiert, je nach Umgebungszusammensetzung (Nitrit-Konzentration, Sauerstoffpartialdruck, u.a.)[101]. NO konvertiert in flüssigem Medien hauptsächlich zu Nitrit, teils durch Reaktionen mit Sauerstoff, teils durch Autooxidation [194]. Da die Dermis ohne die schützende Epidermis sehr schnell austrocknet, kann es sein, dass NO schneller zur Nitrat oxidiert ist und Nitrit nur sehr kurz nachweisbar ist. Nitrat ist im Gegensatz zum Nitrit eine stabilere Verbindung und hat eine Halbwertszeit von mehreren Stunden [189]. Es wurde bereits mehrfach nachgewiesen, dass eine erhöhte Nitratkonzentration im Blut zu einer verbesserten Gewebsdurchblutung und Senkung des Blutdrucks führt. Es wird geschlussfolgert, dass Nitrat eine alternative NO-Quelle ist, wenn die NO-Synthase nicht ausreichend NO produziert [195]. Hieraus kann abgeleitet werden, dass der Feuchtigkeitsgehalt der zu behandelnden Oberfläche eine maßgebliche Rolle in der Wirkungsweise des Plasmas spielt. Eine trockene Oberfläche führt zu einer anderen Zusammensetzung und wahrscheinlich auch Wirksamkeit der NO-Derivate als eine feuchte Oberfläche. Darauf deuteten auch die zuvor beschriebenen Konzentrationen von Nitrat und Nitrit in PBS und Blutplasma hin. Zudem kann aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass physikalisches Plasma längere und stärkere Effekte hat, wenn es auf feuchten Oberflächen angewendet wird, da hier die reaktiven Spezies akkumulieren und über einen längeren Zeitraum in die Haut aufgenommen werden können. Diese Akkumulation führt zu einer Verschiebung des pH-Werts der Flüssigkeit in einen sauren Bereich. Die pH-Wert Veränderungen während der Wundheilung sind bisher sehr selten untersucht worden, allerdings ist gesichert, dass der pH-Wert der Haut und der Wunde ein wichtiger Faktor ist [196]. In weiteren Versuchen im Vorfeld zu dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der DBD-Plasmastick den pH Wert von gesunder Haut auf minimal 2 absenken kann [48]. Abhängig vom Feuchtigkeitsgehalt und der Akkumulation der reaktiven Komponenten des Plasmas ist der pH-Wert sehr variabel und schwer einzustellen. Damit ist er ein weiterer Faktor, der bei der Qualifizierung und Quantifizierung des kalten Plasmas eine Rolle spielt.

Welche Effekte die Anpassung des pH-Werts auf die Plasmaeffekte hat, muss noch weiter untersucht werden. Nitrit und Nitrat hingegen haben ähnliche Funktionen z.B. als NO-Donatoren oder auch als direkte Einflussfaktoren auf den Zellstoffwechsel. Allerdings sind die unterschiedlichen Konzentrationen in der intakten Haut und der Dermis signifikant und es muss weiter untersucht werden, ob dies andere Effekte auslöst. Hier wird demonstriert, wie wichtig es ist, dass alle Parameter der Anwendung, insbesondere der Feuchtigkeitsgehalt der behandelnden Oberfläche stets einheitlich sein müssen, um die Plasmaeffekte vergleichen zu können. Die Akkumulation von NO und seinen Derivaten sowohl in der Dermis, als auch in der intakten Haut zeigt, dass durch die Plasma-Behandlung die aktiven Moleküle nicht nur an der Oberfläche gelöst werden, sondern auch tiefer in das Gewebe eindringen können und somit die bereits zuvor beschriebenen Effekte der Vasodilatation und Immunmodulation auslösen könnten.

Ergänzend zu den oben beschriebenen Untersuchungen, die mit Messungen aus Homogenisaten der Haut durchgeführt wurden, wurde die Penetration von Spalthaut (Epidermis einer definierten Dicke: 0,7 und 0,3 mm) untersucht. Es wurden deutlich geringe NOD-Konzentrationen gemessen (nmol), als in den Hauthomogenisaten, was sich dadurch erklären lässt, dass natürlich ein Teil der Derivate in der Haut akkumuliert und dort gebunden wird. Trotzdem zeigen die Messwerte sehr gut, dass ein Durchdringen der obersten Hautschicht durch die NO-Derivate nach Kaltplasmabehandlung möglich ist. Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass eine längere Behandlung zu einer höheren Konzentration von NO-Derivaten in der Trägerlösung unter der Haut führt. Das bedeutet, dass die notwendige Konzentration um den Benefit der NO-Freisetzung in der Haut zu erreichen zeitabhängig ist und über die Behandlungsdauer gesteuert werden kann. Zudem wurde durch Messungen nach der eigentlichen Behandlung gezeigt, dass es noch 50 Minuten nach der Plasmabehandlung zu einem Anstieg der Nitratkonzentration in der Lösung unter Haut kommt. Damit wird demonstriert, dass es erst nach Beendigung der Plasmabehandlung das Nitrat und auch das Nitrit in tiefere Hautschichten eindringt. Mögliche Effekte könnten also erst verzögert auftreten. Anzumerken ist, dass das Nitrit in sehr geringen Dosierungen im einstelligen bis niedrigem zweistelligem Nanomol-Bereich die Spalthaut durchdrungen hat. Das Nitrat konnte Konzentrationen bis fast 100 nmol erreichen. Im Vergleich zu den Messungen in der homogenisierten Haut geben diese Ergebnisse einen Hinweis auf die Verteilung von Nitrit und Nitrat in der Haut nach einer Plasmabehandlung. Nitrat scheint einfacher durch die Hautschichten in die Tiefe eindringen zu können, während Nitrit wahrscheinlich in der Epidermis akkumuliert. Ob die Konzentrationen, die bis dorthin durchdringen, ausreichend

sind, um relevante Effekt zu erzielen, muss noch weiter untersucht werden. Diese Experimente zeigen aber, dass die Plasmawirkungen nicht nur auf der Oberfläche der Haut stattfinden, sondern auch tiefer in das Gewebe eindringen können. Es ist nun wichtig herauszufinden, welche Dosierung den maximalen Effekt in welcher Hautschicht hervorruft, ohne an der Oberfläche zu toxischen Reaktionen zu führen. Berücksichtigt man das spezielle Milieu einer chronischen Wunde, kann es durchaus von Vorteil sein, wenn die NO-Derivate in tiefere noch intakte Hautschichten eindringen und dort zu einer Vasodilatation und Immunmodulation führen könnten. Denn würden sie nur an der Oberfläche akkumulieren, könnte es sein, dass die Wirkung auf eine reine Sterilisation durch Auslösung von Oxidationsreaktionen begrenzt ist. Die NO-Derivate benötigen, wie bereits zuvor beschrieben, bestimmte Proteine um wirken zu können. Speziell für die Vasodilatation ist es relevant, dass Kapillaren durch das NO erreicht werden können. In chronischen Wunden müssen dafür zunächst die oberflächlichen Zellschichten durchdrungen werden. Diese Ergebnisse ergänzen die zuvor beschriebenen Messungen aus den Hauthomogenisaten und zeigen deutlich, dass die reaktiven Stickstoffspezies in die Haut eindringen.

Zusammenfassend wird gezeigt, dass plasmainduzierte NO-Derivate (spezieller Nitrat und Nitrit, und auch NO selbst) in Flüssigkeiten akkumulieren und dort auch über einen Zeitraum von mehreren Minuten nachweisbar sind. Im Weiteren konnte gezeigt werden, dass die NO-Derivate in homogenisierter Haut nachweisbar sind und somit auch in die Haut eindringen können. Essentiell scheint eine ausreichende Feuchtigkeit des Gewebes zu sein, um eine größtmögliche Reaktivität zu erreichen. Die tatsächliche Diffusionsfähigkeit wurde am Beispiel von Epidermispräparaten nachgewiesen. Hier konnte gezeigt werden, dass Plasma-induzierte NO-Derivate durch die Epidermis penetrieren können. Welche genauen Mechanismen sie dort auslösen und welche Konzentrationen notwendig sind, muss in weiteren Versuchen untersucht werden.

5.3 Anwendung auf Zellen und Beeinflussung des Wachstums- und Differenzierungsverhaltens

Nach den quantitativen Untersuchungen von Plasmainduzierten Stickstoff-Derivaten in Flüssigkeiten und in menschlicher Haut, folgten Versuche zur Wirkung des Plasmas auf Fibroblasten.

Es wurde die Zellviabilität (Anteil lebender Zellen in einer Gesamtzellpopulation) untersucht, da bereits bekannt ist, dass die Plasmaanwendung das Wachstum hemmen kann bzw. in humanen Zellen Apoptose und teilweise sogar nekrotische Prozesse auslösen kann [77, 197, 198]. Unter den hier durchgeführten Versuchsbedingungen zeigte sich die Zellviabilität ab einer Behandlungszeit von 60 s bereits vermindert. Wichtig ist hier die Unterscheidung zu dem oben beschriebenen TUNEL-Assay, welcher gezeigt hat, dass die Fibroblasten, die in der intakten Haut Plasmabehandelt wurden, keine DNA-Strangbrüche zeigten und somit nicht geschädigt wurden (bei einer Behandlungsdauer bis zu 6 min). Somit ist zu vermuten, dass die Fibroblasten im Zellverband der Haut weit aus längere Behandlungszeiten ohne toxische Schäden überstehen. Dies ist bei der Übertragung von Anwendungsschemata von *in vitro* auf *in vivo* zu beachten. In den Versuchen zur Zellviabilität wurden Fibroblasten direkt in der Zellkultur behandelt. Hier ist das Milieu feuchter als auf der Haut, da es ohne einen Flüssigkeitsfilm zur Austrocknung der Zellen während der Behandlung kommen würde. Wie bereits in Kapitel 5.2 beschrieben, kommt es in Flüssigkeiten zu einer Akkumulation der NO-Derivate und somit auch zu prolongierten Effekten ebendieser. Es akkumulieren aber nicht nur NO-Derivate, sondern auch andere Radikale, wie z.B. Wasserstoffperoxid in der Flüssigkeit. Dies könnte ein Erklärungsansatz für die gezeigte verringerte Zellviabilität nach 60 s Behandlung sein. Die Toxizität des Plasmas ist v.a. bedingt durch die reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies, wie bereits mehrfach in dieser Arbeit beschrieben. Allerdings sind die Fibroblasten als Monolayer auf der Wellplatte angezchtet und damit sensibler gegenüber äußeren Einflüssen. Durch die Behandlungszeit von 60 Sekunden kommt es zu einer geringen Verdunstung des Blutplasma mit dem die Zellen bedeckt waren. Dies kann zur erhöhten Akkumulation der reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies führen, aber auch einfach zu einer Austrocknung der Zellen. Ähnliche Beobachtungen wurden auch in anderen Studien gemacht [46]. Ein Hinweis, dass die Sauerstoff- und Stickstoffspezies ursächlich für die verminderte Zellviabilität sind, zeigt die Kontrolle, in die Nitrit, Nitrat und Wasserstoffperoxid in den Konzentrationen, die bei einer Behandlungszeit von 60 s entstehen, hinzugefügt wurden. Hier bot sich ebenfalls eine verringerte Zellviabilität. Damit kann zu mindestens ein toxischer Einfluss der UV-Strahlung und des Spannungsfelds in diesem Versuchsaufbau wahrscheinlich ausgeschlossen werden. Interessant ist auch, dass der Zusatz von TGF- β eine ähnliche verminderte Zellviabilität aufweist. TGF- β ist ein wichtiger Faktor für die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten [199]. Die im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle niedrigerer Zellviabilität kann durch eine Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten erklärt werden. Die dadurch verminderte bzw. langsamere

Zellteilungsrate erklärt den Unterschied zur unbehandelten Kontrolle. In weiteren Untersuchungen der Forschungsgruppe wurde in *in vitro*-Studien das Wasserstoffperoxid als auslösender Faktor identifiziert, allerdings ist der genaue Mechanismus und weitere Einflussfaktoren noch nicht endgültig geklärt [162]. Obwohl im Gegensatz zur unbehandelten Kontrolle die Zellviabilität niedriger ist, wird aber auch hier deutlich, dass die Fibroblasten trotzdem weiter wachsen, denn nach 10 Tagen ist ihre Stoffwechselaktivität um 50% gestiegen.

Um zu sehen, ob die These der Differenzierung der Zellen und damit einhergehenden verminderten Zellviabilität korrekt ist, wurden die Fibroblasten auf die Expression von Alpha-SMA untersucht. Dies ist ein Protein, welches in Myofibroblasten exprimiert wird. Es ist Teil des Zytoskeletts und kann durch Kontraktion die Zellwände zusammenziehen. Mehrere dieser spezialisierten Zellen nebeneinander in einer Matrix können zusammen so eine Kontraktion z.B. von einem Wundrand auslösen. Dadurch wird der Wundschluss beschleunigt [149, 200]. Die Hypothese war, dass aufgrund der Plasma-Behandlung die Fibroblasten in Myofibroblasten differenzieren. Alpha-SMA Proteine konnten dann sowohl in Fluoreszenzfärbungen, als auch per Western Blot in Plasma-behandelten Fibroblasten nachgewiesen werden. Dabei führte schon eine Behandlung über 30 Sekunden zu einem signifikanten Anstieg der Alpha-SMA Expression im Western Blot. Die längeren Behandlungszeiten führten zu keinem weiteren Anstieg der Expression, sondern blieben auf einem ähnlichen Niveau. Das zeigt, dass bereits eine kurze Behandlungszeit zu einem zellulären Effekt führt. Dieser Effekt kann sowohl positiv, als auch negativ sein. In der physiologischen Wundheilung spielen Myofibroblasten eine wichtige Rolle, allerdings kann eine überschießende Differenzierung zu ausgeprägter Narbenbildung und Entstehung von Kontrakturen führen [201, 202]. Auch in diesem Versuch differenzierten die Zellen unter Zugabe von Nitrit, Nitrat und Wasserstoffperoxid, so dass einer dieser Faktoren die Differenzierung ausgelöst hat. Es zeigte sich, dass eine alleinige Zugabe von Wasserstoffperoxid ebenfalls zu einer erhöhten Alpha-SMA Expression führte [162]. Der genaue Mechanismus dieser Ergebnisse ist nicht bekannt. Allerdings wurde in anderen Veröffentlichungen nachgewiesen, dass reaktive Sauerstoffspezies einen Einfluss auf die Differenzierung von Zellen haben [203]. Andere Untersuchungen zeigen, dass auch reaktive Stickstoffspezies (z.B. Peroxynitrit) eine erhöhte TGF- β -Produktion in humanen Fibroblasten auslösen und zur Gewebsmodellierung durch Kontraktion führen [204]. Dass physikalisches, kaltes Plasma zu einer Differenzierung von Zellen führt, ist eine erstaunliche Entdeckung, die

vielversprechend auch für andere klinischen Bereich außerhalb der topischen Anwendung auf Wunden ist, z.B. in der Stammzellforschung.

Es wurde im Folgenden untersucht, ob aufgrund der beschriebenen Differenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten das Migrationsverhalten ebenfalls verändert ist. Dabei wurde gemessen, ob die Fibroblasten nach Plasmabehandlung schneller einen artifiziellen Spalt auf einer Well-Platte verschließen. Die Untersuchung zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen der unbehandelten Kontrolle und den behandelten Zellen. Grundlage für diesen Versuch war ,neben den oben beschriebenen Erkenntnissen, auch die These, dass NO zu einer erhöhten Migration führt. Dies konnte bereits durch Anwendung von NO-Nanopartikel auf humanen Fibroblasten und *in vivo* am Mausmodell nachgewiesen werden [205]. Dass die Kaltplasma-Behandlung keinen Effekt auf die Migration gezeigt hat, könnte durch eine zu kurze Behandlungszeit und damit zu geringen NO-Konzentration erklärt werden. Zu bedenken ist auch, dass in den zuvor durchgeführten Versuchen prinzipiell zunächst von einer Stagnation des Wachstums auszugehen ist. Somit kann es sein, dass die Zellen durch den oxidativen Stress, wie oben beschrieben, in der beobachteten Zeit nach der Behandlung zunächst nicht in der Lage sind zu migrieren, sondern entweder in die Differenzierung gehen, apoptotisch werden oder in einem Ruhezustand verweilen. Ein längerer Beobachtungszeitraum bei einem größeren Spalt könnte Aufschluss geben, ob dies der Fall ist.

6. Kritik

Insgesamt ist die Arbeit mit der Plasmaquelle sehr diffizil, da es multiple Störfaktoren gibt. Die Elektrode muss absolut trocken sein, der Abstand von 1 mm über dem zu behandelnden Gewebe muss immer eingehalten werden, auch wenn wie z.B. bei der Behandlung von menschlicher Haut minimale Dellen und Vertiefungen bestehen. Selbst der Atem des Forschenden kann die Zusammensetzung des erzeugten Spannungsfeldes beeinflussen. Trotz großer Sorgfalt und optimierter und sehr aufwendiger Untersuchungsaufbauten, kann eine Störung nie ausgeschlossen werden. Somit ist die Verbesserung der Anwendungsgenauigkeit von Plasmaquellen ein weiterhin spannendes und notwendiges Forschungsfeld bevor eine klinische Anwendung erfolgreich, reproduzierbar und sicher erfolgen kann und insbesondere in der Forschung eine valide Reproduzierbarkeit erreicht wird. Die Übertragbarkeit der *in vitro* - Ergebnisse auf die Anwendung im klinischen Umfeld ist dann die nächste Herausforderung.

Einige der Versuchsaufbauten in dieser Arbeit waren sehr aufwendig und wurden so bisher noch nicht durchgeführt. Dadurch haben diese Methoden durch Modifikationen und Erweiterungen durchaus noch Optimierungspotenzial für folgende Forschungen. Insbesondere die Festlegung der optimalen Behandlungszeiten ist wichtig vor jeder Arbeit mit dem DBD-Plasmastick. Die Unterschiede der Behandlungszeiten in dieser Arbeit resultieren aus den unterschiedlichen Geweben und Zellen. Intakte Haut mit Epidermis kann sehr lange behandelt werden, während Zellen in der Zellkultur sehr schnell austrocknen, wenn sie zu lange ungeschützt unter dem Plasmastick stehen. Dies ist nicht durch eine Temperaturerhöhung durch den Plasmastick, sondern durch Verdunstung bedingt. Haut, bei der die Epidermis entfernt wurde, zeigt bereits makroskopisch nach wenigen Minuten trockene Stellen unabhängig von der Behandlung, so dass dies zu einer veränderten Diffusionsfähigkeit und Akkumulation der reaktiven Plasmaproducte führt. Dies spiegelt sich in den gemessenen Nitrit und Nitrat Konzentrationen wieder. Da eine Wunde unterschiedlichste Oberflächenstrukturen aufweist, ist es umso wichtiger, die genauen Wirkprozesse und Einflussfaktoren des Plasmas zu kennen, um eine optimale Wirkung erzielen zu können und toxischen Effekten vorzubeugen.

Die Plasmaquelle ist in dieser Arbeit eine DBD-Plasmaelektrode. Wie in der Einleitung beschrieben gibt es mehrere Möglichkeiten kaltes Plasma zu erzeugen. Es gibt bereits viele Studien, die die Effekte der unterschiedlichen Plasmaquellen vergleichen. Und auch die Ergebnisse dieser Arbeit müssten mit einer indirekten Plasmaquelle validiert werden, um eine Vergleichbarkeit zu erreichen. In der klinischen Anwendung sind bisher 2 Plasmaquellen zugelassen: der PlasmaDerm® (eine DBD-Elektrode der Firma Cinogy GmbH, Duderstadt) und der kINPen MED® (ein Plasmajet mit Argon als Trägergas der Firma neoplas tools GmbH, Greifswald). Weitere Geräte sind bereits zugelassen oder kurz vor der Marktreife. Doch bisher sind noch viele Fragen bezüglich der genauen Wirkmechanismen der Plasmaquelle ungelöst und müssen weiter untersucht werden. Trotz einiger positiver Ergebnisse in der Behandlung und Sterilisation von chronischen Wunden, zeigt diese Arbeit, dass es dringend notwendig ist, weiter Grundlagenforschung zu betreiben, um eine sichere und effektive Anwendung zu ermöglichen. Beide genannten Plasmaquellen werden auf Wunden verschiedener Ursache angewendet, allerdings ist weiterhin nicht klar, welche genauen Einflüsse die Oberflächenfeuchtigkeit und die Zusammensetzung des Wundmilieus auf die Heilung haben. Zudem sind die Plasma-Geräte bisher nur an sehr kleinen Patientenkollektiven angewendet worden und nicht gegenüber herkömmliche Wundbehandlungen als Kontrollen getestet worden. Die Bakterienreduktion zeigte auch eher

selektive Ergebnisse bei bestimmten Bakterienstämmen. Ergänzend muss untersucht werden, ob jede Wunde mit jedem Plasmastick behandelt werden kann, oder ob eine individuell, an die Charakteristika der Wunde und der Grunderkrankung angepasste Plasmatherapie zu einem verbesserten Outcome führt. Dafür muss weiterhin untersucht werden, welche Plasmafaktoren- und Zusammensetzungen relevant für die Wundheilung sind. Diese Erkrankungen können ebenfalls von einem individuell „designten“ Plasma profitieren, denn sie haben andere Ursachen und Pathomechanismen als eine chronische Wunde. Auch die Folgen einer häufigen und langfristigen Anwendung sind noch nicht absehbar. Aufgrund der multiplen Einsatzmöglichkeiten, nicht nur in der Medizin, sondern auch in der Kosmetikindustrie birgt die Plasmamedizin ein enormes ökonomisches Potenzial, umso mehr muss auf eine validierte und sichere Anwendung der Geräte geachtet und weiter Grundlagenforschung betrieben werden. Zu schnelle erfolgsverheißende Versprechungen können dieses junge Forschungsfeld schnell in Verruf bringen. Dies wurde bereits 2012 in einem Konsensuspapier von deutschen Plasma-Forschern angemerkt und gilt auch noch im Jahr 2020 [206].

7. Schlussfolgerung

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass Kaltplasma relevante Konzentrationen von NO-Derivaten erzeugt und diese in flüssigem Medium aber auch in menschlicher Haut nachgewiesen werden können. Im Vordergrund dieser Arbeit steht die Grundlagenforschung zur klinischen Anwendung des Plasmas in der Behandlung von chronischen Wunden, somit liegt der Fokus insbesondere auf den Effekte des Stickstoffmonoxids und seiner Derivate, die zu einer Verbesserung der Wundheilung führen könnten. Dazu gehört unter anderem eine verbesserte Durchblutung durch den vasodilatatorischen Effekt des NO, als auch die Abtötung von Bakterien durch reaktive Stickstoff- und Sauerstoffspezies, die Aktivierung einer Angioproliferation und die Induktion von Immunreaktionen. Es ist bewiesen, dass NO und seine Derivate in all diesen Prozessen eine wichtige Rolle spielen und diese Prozesse in chronischen Wunden nicht ausreichend funktionieren [4, 86]. In dieser Arbeit konnte eine messbare und signifikant von der Behandlungszeit abhängige Akkumulation von NO-Derivaten in der menschlichen Haut nachgewiesen werden. Daraus folgt, dass die Effekte des Plasmas sich nicht nur an der Oberfläche abspielen, sondern die reaktiven Spezies in das Gewebe eindringen können. Dies ist der Beweis, dass Plasmakomponenten in Gewebe eindringen und hier bestimmte Effekte

auslösen können. Hier können sie als NO-Donatoren Einfluss auf die Durchblutung nehmen. Dieser Effekt wurde im Vorfeld dieser Arbeit bereits an freiwilligen Probanden nach einer DBD-Plasmabehandlung von 90 s nachgewiesen. Der Blutfluss und die kapilläre Sauerstoffkonzentrationen waren signifikant erhöht, eine Negativkontrolle zeigte, dass dieser Effekt durch die Gaskomponenten des Plasmas bedingt wird und nicht durch die UV-Strahlung [48].

Neben der Akkumulation in der Haut wurden auch die Konzentrationen von NO-Derivaten in Flüssigkeiten nach Plasmabehandlung gemessen. Auch hier zeigt sich eine signifikanter behandlungszeitabhängige Zunahme von Nitrit und Nitrat und zwar sowohl in Blutplasma, als auch in neutralen Flüssigkeiten. Da eine Wunde immer ein feuchtes Milieu hat, können die reaktiven Stickstoffspezies in Kombination mit den ebenfalls entstehenden Sauerstoffspezies eine wirksame bakterizide Wirkung entfalten. Die Anreicherung von Flüssigkeiten mit plasmainduzierten reaktiven Spezies bietet nicht nur in der Anwendung auf Wunden eine zunehmend wichtigere Rolle in der Plasmaforschung, sondern auch in der gezielten Bekämpfung von Tumorzellen. Dass eine Plasmabehandlung, unabhängig aus welcher Quelle, effektiv bakterizid wirken kann, wurde bereits in vielen Studien nachgewiesen. Es zeigt sich auch, dass gesunde menschliche Zellen höhere Dosen des Plasmas ohne Schaden überleben, allerdings sind die genauen Mechanismen der Bakterientötung noch nicht bekannt [207]. Es wird immer wieder gezeigt, dass die reaktiven Stickstoff- und Sauerstoffspezies hier eine wichtige Rolle spielen. Umso wichtiger ist es, genau zu wissen, wie hoch die Konzentrationen in den unterschiedlichen Medien sind, die behandelt werden und welche Einflussfaktoren die Zusammensetzung der reaktiven Spezies verändern. Dabei spielt der pH-Wert wahrscheinlich eine essentielle Rolle, welche bisher kaum wahrgenommen wurde [208].

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass in intakter Haut viel mehr Nitrit gemessen wird, als wenn die Epidermis entfernt wird und direkt die Dermis-Schicht behandelt wird. In diesem Fall wurde ein deutlich höherer Nitrat-Wert gemessen. Der Unterschied macht deutlich, wie anfällig die Konzentrationen der erzeugten Teilchen gegenüber Änderungen der Feuchtigkeit oder der Oberfläche sind. Das allgemeine Ziel der Plasmamedizin ist es, ein speziell „designtes“ Plasma für den jeweiligen Anwendungszweck zu gestalten. Die vielen Anwendungsmöglichkeiten, aber auch die aktuell noch schwierige Steuerbarkeit der einzelnen Komponenten, machen diesen Schritt notwendig aber äußerst schwierig.

In dieser Arbeit konnten zu den quantitativen Ergebnissen aber auch qualitative Effekte auf Zellebene gezeigt werden. Die Behandlung von Fibroblasten mit Kaltplasma führt zu einer Differenzierung der Zellen zu Myofibroblasten. Damit hat die Kaltplasmabehandlung einen

direkten Effekt auf den Zellzyklus und kann die Funktion von Zellen verändern. Gerade in der Wundheilung ist dieser Prozess außerordentlich wichtig. Ausgelöst wird dieser Effekt wahrscheinlich von Wasserstoffperoxid, was in zu dieser Arbeit ergänzenden Versuchen belegt wurde. Es zeigt, dass die Komponenten des Kaltplasmas noch viel Potenzial haben, um weitere Effekte der Behandlungen zu erklären. Und es zeigt, was für ein Potenzial die Anwendung von Kaltplasma birgt, nicht nur in Bezug auf die Wundheilung, sondern auch in vielen weiteren Bereichen, z.B. in der Tumorforschung oder allgemeinen Pharmazie. Allerdings muss nach Aufzählung der multiplen Plasmaeffekte und der immer wieder erwähnten schwierigen Steuerbarkeit aufgrund der multiplen Komponenten auch kritisch hinterfragt werden, ob die Effekte nicht auch durch die Anwendung von Flüssigkeit versetzt mit Nitrat, Nitrit und Wasserstoffperoxid erreicht werden können. Nicht nur diese Arbeit hat gezeigt, dass Kontrollen mit den oben genannten reaktiven Stoffen ähnliche Effekte auf die Proliferation, Differenzierung und Bakterienabtötung haben. Diese Überlegung muss vor dem Hintergrund erfolgen, dass das physikalische Plasma auch einen hohen Kostenfaktor in Entwicklung und Ausführung hat und es bisher keine ausreichende Grundlagenforschung gibt, die alle möglichen Bestandteile charakterisiert und untersucht hat. Bei der Anwendung der oben genannten Kontrollflüssigkeiten wäre die Dosierung und Überwachung der Effekte einfacher und kostengünstiger.

Zusammengefasst möchte diese Arbeit einen weiteren Teil zum besseren Verständnis der Kaltplasmawirkung beitragen. Dies ist allerdings nur ein kleiner Ausschnitt der möglichen Wirkungen und es braucht noch weitergehende Grundlagenforschung und vor allem eine Vergleichbarkeit der benutzten Plasmaquellen, um alle Effekte des Kaltplasmas zu verstehen. Um die Ergebnisse dieser Arbeit zu vervollständigen und weiter zu führen, empfehlen sich ergänzende Untersuchungen zur definitiven Eindringtiefe der NO-Derivate, der Aktivierung von Gefäßproliferation und Vasodilatation in der Haut und genauere Evaluation der auslösenden Faktoren der Differenzierung. Ob und wann sich Kaltplasmageräte in der klinischen Praxis sicher etablieren, ist weiter unsicher. Wie in dieser Arbeit mehrfach gezeigt, haben die multiplen Störfaktoren einen schwer zu kontrollierenden Einfluss auf die Effekte des Plasmas. Um eine sichere und effektive Anwendung zu garantieren, müssen diese Faktoren definiert und normiert werden. Dies ist aber gerade im Bereich der klinischen Anwendung auf chronischen Wunden extrem schwierig. Ein an diese divergenten Bedingungen angepasstes Plasma zu erschaffen, ist die Herausforderung der weiteren Forschung.

Literaturverzeichnis

1. Fachgesellschaften, A.d.W.M. *S3-Leitlinie: Lokaltherapie chronischer Wunden bei Patienten mit den Risiken periphere arterielle Verschlusskrankheit, Diabetes mellitus, chronisch venöse Insuffizienz*. 12.02.2012; Available from: http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/091-001k_S3_Lokaltherapie_chronischer_Wunden_2015-verlaengert.pdf.
2. James, G.A., et al., *Biofilms in chronic wounds*. Wound Repair Regen, 2008. **16**(1): p. 37-44.
3. Guo, S. and L.A. Dipietro, *Factors affecting wound healing*. J Dent Res, 2010. **89**(3): p. 219-29.
4. Lee, R.H., et al., *Nitric oxide in the healing wound: a time-course study*. J Surg Res, 2001. **101**(1): p. 104-8.
5. Schaffer, M.R., et al., *Nitric oxide regulates wound healing*. Journal of Surgical Research, 1996. **63**: p. 237-240.
6. Langmuir, I., *Oscillations in Ionized Gases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1928. **14**(8): p. 627-37.
7. Michel Moisan, J.B., Marie-Charlotte Crevier, Jacques Pelletier, Nicolas Philip, and Bachir Saoudi, *Plasma sterilization. Methods and mechanisms*. Pure Appl. Chem, 2002 **74**(3): p. pp. 349–358.
8. Arndt, S., et al., *Cold atmospheric plasma (CAP) activates angiogenesis-related molecules in skin keratinocytes, fibroblasts and endothelial cells and improves wound angiogenesis in an autocrine and paracrine mode*. J Dermatol Sci, 2018. **89**(2): p. 181-190.
9. Aumüller, G., Aust, G.; Doll, A., Engele, J., *Anatomie*. Duale Reihe, ed. A. Bob, Bob, K. Vol. 1. 2007, Stuttgart: Georg Thieme Verlag. 1286-1293.
10. Drenckhahn, D., Benninghoff, A., *Taschenbuch Anatomie*, ed. D. Drenckhahn, Waschke, J. 2008, München: Elsevier GmbH. 559-560.
11. Fritsch, P., *Dermatologie Venerologie: Grundlagen. Klinik. Atlas*. Vol. 2. 2013, Springer-Verlag, Berlin. 1025.
12. Julius Ecke, M.n., *Hautaufbau*. <https://www.carecreations.basf.com/news-media/photos-and-illustrations/photosandillustrations-detail/2011/6/14/poster-skin-care-forum-illustrations>.
13. Nussbaum, S.R., et al., *An Economic Evaluation of the Impact, Cost, and Medicare Policy Implications of Chronic Nonhealing Wounds*. Value Health, 2018. **21**(1): p. 27-32.
14. Sen, C.K., et al., *Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy*. Wound Repair Regen, 2009. **17**(6): p. 763-71.
15. Janßen H., B.R., *Qualität und Kosten in der chronischen Wundversorgung – Widerspruch oder vereinbar?.* Orthopädie Technik, 2008: p. 920-924.
16. Meszaros, A.J., J.S. Reichner, and J.E. Albina, *Macrophage-induced neutrophil apoptosis*. J Immunol, 2000. **165**(1): p. 435-41.
17. Mosser, D.M. and J.P. Edwards, *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(12): p. 958-69.
18. Gosain, A. and L.A. DiPietro, *Aging and wound healing*. World J Surg, 2004. **28**(3): p. 321-6.
19. Hinz, B., et al., *Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation*. Am J Pathol, 2001. **159**(3): p. 1009-20.
20. Williamson, D. and K. Harding, *Wound healing*. Medicine, 2004. **32**(12): p. 4-7.
21. Lorena, D., et al., *Normal scarring: importance of myofibroblasts*. Wound Repair Regen, 2002. **10**(2): p. 86-92.

22. Desmouliere, A., et al., *Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar*. Am J Pathol, 1995. **146**(1): p. 56-66.
23. Assadian, O., *Wundatlas: Kompendium der komplexen Wundbehandlung*. Vol. 2. 2006: Georg Thieme Verlag. 252.
24. Hatz, R.A.N.R., Vanscheidt, W., Vesterhof W., *Wundheilung und Wundmanagement: Ein Leitfaden für die Praxis*. Vol. 1. 1993. 1-14.
25. Voggenreiter, G., Doldt, C., *Wundtherapie*. Vol. 1. 2004. 6-14.
26. Loots, M.A., et al., *Differences in cellular infiltrate and extracellular matrix of chronic diabetic and venous ulcers versus acute wounds*. J Invest Dermatol, 1998. **111**(5): p. 850-7.
27. Greenman, R.L., et al., *Early changes in the skin microcirculation and muscle metabolism of the diabetic foot*. Lancet, 2005. **366**(9498): p. 1711-7.
28. Falanga, V., *Wound healing and its impairment in the diabetic foot*. Lancet, 2005. **366**(9498): p. 1736-43.
29. Nabuurs-Franssen, M.H., et al., *The effect of polyneuropathy on foot microcirculation in Type II diabetes*. Diabetologia, 2002. **45**(8): p. 1164-71.
30. Okonkwo, U.A. and L.A. DiPietro, *Diabetes and Wound Angiogenesis*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(7).
31. Lerman, O.Z., et al., *Cellular dysfunction in the diabetic fibroblast: impairment in migration, vascular endothelial growth factor production, and response to hypoxia*. Am J Pathol, 2003. **162**(1): p. 303-12.
32. Eming, S.A., T. Krieg, and J.M. Davidson, *Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(3): p. 514-25.
33. Hurlow, J., et al., *Clinical Biofilms: A Challenging Frontier in Wound Care*. Adv Wound Care (New Rochelle), 2015. **4**(5): p. 295-301.
34. Omar, A., et al., *Microbial Biofilms and Chronic Wounds*. Microorganisms, 2017. **5**(1).
35. Diener, H., et al., *Revaskularisation und Amputation bei kritischer Ischämie*. Gefäßchirurgie, 2010. **15**(1): p. 20-32.
36. Köster, I. and D.I. Schubert, *Epidemiologie und Versorgung von Patienten mit chronischen Wunden. Eine Analyse auf der Basis der Versichertenstichprobe AOK Hessen:KV Hessen*. 2015.
37. Karl, T., A. Gussmann, and M. Storck, *[Chronic wounds--perspective for integrated care]*. Zentralbl Chir, 2007. **132**(3): p. 232-5.
38. Diabetes-Hilfe, D.D.G.D.u.d.D., *Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2018 Die Bestandsaufnahme*. Günter Nuber (Redaktion Diabetes-Journal, Mainz), 2018.
39. Lindholm, C., et al., *Quality of life in chronic leg ulcer patients. An assessment according to the Nottingham Health Profile*. Acta Derm Venereol, 1993. **73**(6): p. 440-3.
40. Augustin, M., et al., *Quality of life evaluation in wounds: validation of the Freiburg Life Quality Assessment-wound module, a disease-specific instrument*. Int Wound J, 2010. **7**(6): p. 493-501.
41. Nosenko, T., T. Shimizu, and G.E. Morfill, *Designing plasmas for chronic wound disinfection*. New Journal of Physics, 2009. **11**(11): p. 115013.
42. Zenker, M., *Argon plasma coagulation*. GMS Krankenhhyg Interdiszip, 2008. **3**(1): p. Doc15.
43. Fridman, G., et al., *Applied Plasma Medicine*. Plasma Processes and Polymers, 2008. **5**(6): p. 503-533.
44. Fridman, G., et al., *Comparison of Direct and Indirect Effects of Non-Thermal Atmospheric-Pressure Plasma on Bacteria*. Plasma Processes and Polymers, 2007. **4**(4): p. 370-375.

45. Shimizu, T., et al., *Characterization of Microwave Plasma Torch for Decontamination*. Plasma Processes and Polymers, 2008. **5**(6): p. 577-582.
46. Mann, M.S., et al., *Introduction to DIN-specification 91315 based on the characterization of the plasma jet kINPen® MED*. Clinical Plasma Medicine, 2016. **4**(2): p. 35-45.
47. Dobrynin, D., et al., *Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue*. New Journal of Physics, 2009. **11**(11): p. 115020.
48. Heuer, K., et al., *The topical use of non-thermal dielectric barrier discharge (DBD): nitric oxide related effects on human skin*. Nitric Oxide, 2015. **44**: p. 52-60.
49. Laroussi, M., et al., *Inactivation of Bacteria by the Plasma Pencil*. Plasma Processes and Polymers, 2006. **3**(6-7): p. 470-473.
50. Yu, H., et al., *Effects of cell surface loading and phase of growth in cold atmospheric gas plasma inactivation of Escherichia coli K12*. J Appl Microbiol, 2006. **101**(6): p. 1323-30.
51. Lademann, O., et al., *Skin disinfection by plasma-tissue interaction: comparison of the effectivity of tissue-tolerable plasma and a standard antiseptic*. Skin Pharmacol Physiol, 2011. **24**(5): p. 284-8.
52. Cabisco, E., J. Tamarit, and J. Ros, *Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species*. Int Microbiol, 2000. **3**(1): p. 3-8.
53. Brun, P., et al., *Antibacterial efficacy and mechanisms of action of low power atmospheric pressure cold plasma: membrane permeability, biofilm penetration and antimicrobial sensitization*. J Appl Microbiol, 2018. **125**(2): p. 398-408.
54. Hee Lee, M., et al., *Removal and sterilization of biofilms and planktonic bacteria by microwave-induced argon plasma at atmospheric pressure*. New Journal of Physics, 2009. **11**(11): p. 115022.
55. Morfill, G.E., et al., *Nosocomial infections—a new approach towards preventive medicine using plasmas*. New Journal of Physics, 2009. **11**(11): p. 115019.
56. Ermolaeva, S.A., et al., *Bactericidal effects of non-thermal argon plasma in vitro, in biofilms and in the animal model of infected wounds*. J Med Microbiol, 2011. **60**(Pt 1): p. 75-83.
57. Mohd Nasir, N., et al., *Cold plasma inactivation of chronic wound bacteria*. Arch Biochem Biophys, 2016. **605**: p. 76-85.
58. Kylián, O., et al., *Removal of model proteins by means of low-pressure inductively coupled plasma discharge*. Journal of Physics D: Applied Physics, 2008. **41**(9): p. 095201.
59. Kylián, O.e., et al., *Removal of Model Proteins Using Beams of Argon Ions, Oxygen Atoms and Molecules: Mimicking the Action of Low-Pressure Ar/O₂ICP Discharges*. Plasma Processes and Polymers, 2009. **6**(4): p. 255-261.
60. Kalghatgi, S., et al., *Effects of non-thermal plasma on mammalian cells*. PLoS One, 2011. **6**(1): p. e16270.
61. Dobrynin, D., Wu, A., Kalghatgi, S., Park, S., Shainsky, N., Wasko, K., Dumani, E., Ownbey, R., Joshi, S., Sensenig, R., Brooks, A.D., *Live Pig Skin Tissue and Wound Toxicity of Cold Plasma Treatment*. Plasma Medicine, 2011. **1**(1): p. 93-108.
62. Blackert, S., et al., *Influence of non-thermal atmospheric pressure plasma on cellular structures and processes in human keratinocytes (HaCaT)*. J Dermatol Sci, 2013. **70**(3): p. 173-81.
63. Wende, K., et al., *Atmospheric pressure plasma jet treatment evokes transient oxidative stress in HaCaT keratinocytes and influences cell physiology*. Cell Biol Int, 2014. **38**(4): p. 412-25.

64. Kalghatgi, S., et al., *Endothelial cell proliferation is enhanced by low dose non-thermal plasma through fibroblast growth factor-2 release*. Ann Biomed Eng, 2010. **38**(3): p. 748-57.
65. Kalghatgi, S.U., et al., *Non-thermal dielectric barrier discharge plasma treatment of endothelial cells*. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc, 2008. **2008**: p. 3578-81.
66. Arjunan, K.P., et al., *Non-thermal dielectric barrier discharge plasma induces angiogenesis through reactive oxygen species*. J R Soc Interface, 2012. **9**(66): p. 147-57.
67. Lademann, J., et al., *Risk assessment of the application of tissue-tolerable plasma on human skin*. Clinical Plasma Medicine, 2013. **1**(1): p. 5-10.
68. Keidar, M., et al., *Cold plasma selectivity and the possibility of a paradigm shift in cancer therapy*. Br J Cancer, 2011. **105**(9): p. 1295-301.
69. Xia, J., et al., *Cold Atmospheric Plasma Induces Apoptosis of Melanoma Cells via Sestrin2-mediated iNOS Signaling*. J Biophotonics, 2018: p. e201800046.
70. Sensenig, R., et al., *Non-thermal plasma induces apoptosis in melanoma cells via production of intracellular reactive oxygen species*. Ann Biomed Eng, 2011. **39**(2): p. 674-87.
71. Turrini, E., et al., *Cold Atmospheric Plasma Induces Apoptosis and Oxidative Stress Pathway Regulation in T-Lymphoblastoid Leukemia Cells*. Oxid Med Cell Longev, 2017. **2017**: p. 4271065.
72. Volotskova, O., et al., *Targeting the cancer cell cycle by cold atmospheric plasma*. Sci Rep, 2012. **2**: p. 636.
73. Shashurin, A., et al., *Living tissue under treatment of cold plasma atmospheric jet*. Applied Physics Letters, 2008. **93**(18): p. 181501.
74. Arndt, S., et al., *Cold atmospheric plasma (CAP) changes gene expression of key molecules of the wound healing machinery and improves wound healing in vitro and in vivo*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e79325.
75. Leduc, M., et al., *Cell permeabilization using a non-thermal plasma*. New Journal of Physics, 2009. **11**(11): p. 115021.
76. Yan, D., et al., *The Strong Cell-based Hydrogen Peroxide Generation Triggered by Cold Atmospheric Plasma*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 10831.
77. Virard, F., et al., *Cold Atmospheric Plasma Induces a Predominantly Necrotic Cell Death via the Microenvironment*. PLoS One, 2015. **10**(8): p. e0133120.
78. Chatraie, M., et al., *In vivo study of non-invasive effects of non-thermal plasma in pressure ulcer treatment*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 5621.
79. He, R., et al., *The efficacy and safety of cold atmospheric plasma as a novel therapy for diabetic wound in vitro and in vivo*. Int Wound J, 2020.
80. Xu, G.M., et al., *Dual effects of atmospheric pressure plasma jet on skin wound healing of mice*. Wound Repair Regen, 2015.
81. Hasse, S., et al., *Induction of proliferation of basal epidermal keratinocytes by cold atmospheric-pressure plasma*. Clin Exp Dermatol, 2015.
82. Haertel, B., et al., *Non-thermal atmospheric-pressure plasma possible application in wound healing*. Biomol Ther (Seoul), 2014. **22**(6): p. 477-90.
83. Brehmer, F., et al., *Alleviation of chronic venous leg ulcers with a hand-held dielectric barrier discharge plasma generator (PlasmaDerm((R)) VU-2010): results of a monocentric, two-armed, open, prospective, randomized and controlled trial (NCT01415622)*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2015. **29**(1): p. 148-55.
84. Eggers, B., et al., *The beneficial effect of cold atmospheric plasma on parameters of molecules and cell function involved in wound healing in human osteoblast-like cells in vitro*. Odontology, 2020.

85. Guo, L., et al., *Cold atmospheric-pressure plasma induces DNA-protein crosslinks through protein oxidation*. Free Radic Res, 2018. **52**(7): p. 783-798.
86. Schaffer, M.R., et al., *Nitric oxide metabolism in wounds*. Journal of Surgical Research, 1997. **71**: p. 25-31.
87. Schwentker, A., et al., *Nitric oxide and wound repair- role of cytokines*. Nitric Oxide, 2002. **7**: p. 1-10.
88. Witte, M. and A. Barbul, *Role of nitric oxide in wound repair*. The American Journal of Surgery, 2002. **183**: p. 406-412.
89. Shekhter, A.B., et al., *Beneficial effect of gaseous nitric oxide on the healing of skin wounds*. Nitric Oxide, 2005. **12**(4): p. 210-9.
90. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. Nature, 1980. **288**(5789): p. 373-6.
91. Ignarro, L.J., et al., *Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(24): p. 9265-9.
92. Nathan, C., *Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells*. FASEB J, 1992. **6**(12): p. 3051-64.
93. Hakim, T.S., et al., *Half-life of nitric oxide in aqueous solutions with and without haemoglobin*. Physiol Meas, 1996. **17**(4): p. 267-77.
94. Wang, R., et al., *Human dermal fibroblasts produce nitric oxide and express both constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms*. J Invest Dermatol, 1996. **106**(3): p. 419-27.
95. Kobzik, L., et al., *Nitric oxide in skeletal muscle*. Nature, 1994. **372**(6506): p. 546-8.
96. Nakane, M., et al., *Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle*. FEBS Lett, 1993. **316**(2): p. 175-80.
97. Balligand, J.L., et al., *Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes*. J Biol Chem, 1995. **270**(24): p. 14582-6.
98. Wink, D.A. and J.B. Mitchell, *Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide*. Free Radic Biol Med, 1998. **25**(4-5): p. 434-56.
99. Derbyshire, E.R. and M.A. Marletta, *Structure and regulation of soluble guanylate cyclase*. Annu Rev Biochem, 2012. **81**: p. 533-59.
100. Thomas, D.D., *Breathing new life into nitric oxide signaling: A brief overview of the interplay between oxygen and nitric oxide*. Redox Biol, 2015. **5**: p. 225-233.
101. Beckman, J.S. and W.H. Koppenol, *Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly*. Am J Physiol, 1996. **271**(5 Pt 1): p. C1424-37.
102. Carballal, S., S. Bartsaghi, and R. Radi, *Kinetic and mechanistic considerations to assess the biological fate of peroxynitrite*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1840**(2): p. 768-80.
103. Ischiropoulos, H., L. Zhu, and J.S. Beckman, *Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide*. Arch Biochem Biophys, 1992. **298**(2): p. 446-51.
104. Alvarez, M.N., et al., *Intraphagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized Trypanosoma cruzi: consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity*. J Biol Chem, 2011. **286**(8): p. 6627-40.
105. Hickok, J.R., et al., *Oxygen dependence of nitric oxide-mediated signaling*. Redox Biol, 2013. **1**: p. 203-9.
106. Foster, M.W., D.T. Hess, and J.S. Stamler, *Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective*. Trends Mol Med, 2009. **15**(9): p. 391-404.

107. Hess, D.T., et al., *Protein S-nitrosylation: purview and parameters*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(2): p. 150-66.
108. Jaffrey, S.R., et al., *Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(2): p. 193-7.
109. Foster, M.W., T.J. McMahon, and J.S. Stamler, *S-nitrosylation in health and disease*. Trends in Molecular Medicine, 2003. **9**(4): p. 160-168.
110. Stamler, J.S., S. Lamas, and F.C. Fang, *Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism*. Cell, 2001. **106**(6): p. 675-83.
111. Benhar, M., M.T. Forrester, and J.S. Stamler, *Protein denitrosylation: enzymatic mechanisms and cellular functions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(10): p. 721-32.
112. Lundberg, J.O., E. Weitzberg, and M.T. Gladwin, *The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics*. Nat Rev Drug Discov, 2008. **7**(2): p. 156-67.
113. Bull, H.A., et al., *Neuropeptides induce release of nitric oxide from human dermal microvascular endothelial cells*. J Invest Dermatol, 1996. **106**(4): p. 655-60.
114. Hoffmann, G., et al., *Human dermal microvascular endothelial cells express inducible nitric oxide synthase in vitro*. J Invest Dermatol, 1999. **112**(3): p. 387-90.
115. Kolb-Bachofen, V., et al., *Epidermal keratinocyte expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of psoriasis vulgaris*. Lancet, 1994. **344**(8915): p. 139.
116. Rowe, A., A.M. Farrell, and C.B. Bunker, *Constitutive endothelial and inducible nitric oxide synthase in inflammatory dermatoses*. Br J Dermatol, 1997. **136**(1): p. 18-23.
117. Cals-Grierson, M.M. and A.D. Ormerod, *Nitric oxide function in the skin*. Nitric Oxide, 2004. **10**(4): p. 179-93.
118. Corson, M.A., et al., *Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress*. Circ Res, 1996. **79**(5): p. 984-91.
119. Cooke, J.P., *The endothelium: a new target for therapy*. Vasc Med, 2000. **5**(1): p. 49-53.
120. Bolotina, V.M., et al., *Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle*. Nature, 1994. **368**(6474): p. 850-3.
121. Gow, A.J., et al., *Basal and stimulated protein S-nitrosylation in multiple cell types and tissues*. J Biol Chem, 2002. **277**(12): p. 9637-40.
122. Deliconstantinos, G., V. Villiotou, and C. Fassitsas, *Ultraviolet-irradiated human endothelial cells elaborate nitric oxide that may evoke vasodilatory response*. J Cardiovasc Pharmacol, 1992. **20 Suppl 12**: p. S63-5.
123. Warren, J.B., *Nitric oxide and human skin blood flow responses to acetylcholine and ultraviolet light*. FASEB J, 1994. **8**(2): p. 247-51.
124. Deliconstantinos, G., V. Villiotou, and J.C. Stavrides, *Nitric oxide and peroxynitrite released by ultraviolet B-irradiated human endothelial cells are possibly involved in skin erythema and inflammation*. Exp Physiol, 1996. **81**(6): p. 1021-33.
125. Weller, R., et al., *Autologous nitric oxide protects mouse and human keratinocytes from ultraviolet B radiation-induced apoptosis*. Am J Physiol Cell Physiol, 2003. **284**(5): p. C1140-8.
126. Sur, R., et al., *UVB light suppresses nitric oxide production by murine keratinocytes and macrophages*. Biochem Pharmacol, 2002. **64**(10): p. 1469-81.
127. in *Vacuum Assisted Wound Closure Therapy*. 2011: Stockholm.
128. Romero-Graillet, C., et al., *Nitric oxide produced by ultraviolet-irradiated keratinocytes stimulates melanogenesis*. J Clin Invest, 1997. **99**(4): p. 635-42.
129. Roujeau, J.C., et al., *Toxic epidermal necrolysis (Lyell syndrome)*. J Am Acad Dermatol, 1990. **23**(6 Pt 1): p. 1039-58.
130. Lerner, L.H., et al., *Nitric oxide synthase in toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome*. J Invest Dermatol, 2000. **114**(1): p. 196-9.

131. Ormerod, A.D., et al., *The inflammatory and cytotoxic effects of a nitric oxide releasing cream on normal skin*. J Invest Dermatol, 1999. **113**(3): p. 392-7.
132. Messmer, U.K., U.K. Reed, and B. Brune, *Bcl-2 protects macrophages from nitric oxide-induced apoptosis*. J Biol Chem, 1996. **271**(33): p. 20192-7.
133. Yabuki, M., et al., *Molecular mechanisms of apoptosis in HL-60 cells induced by a nitric oxide-releasing compound*. Free Radic Res, 1997. **27**(3): p. 325-35.
134. delaTorre, A., et al., *Endotoxin-mediated S-nitrosylation of p50 alters NF-kappa B-dependent gene transcription in ANA-1 murine macrophages*. J Immunol, 1999. **162**(7): p. 4101-8.
135. Hemish, J., et al., *Nitric oxide activates diverse signaling pathways to regulate gene expression*. J Biol Chem, 2003. **278**(43): p. 42321-9.
136. Garg, U.C. and A. Hassid, *Nitric oxide-generating vasodilators inhibit mitogenesis and proliferation of BALB/C 3T3 fibroblasts by a cyclic GMP-independent mechanism*. Biochem Biophys Res Commun, 1990. **171**(1): p. 474-9.
137. Du, M., et al., *Promotion of proliferation of murine BALB/C3T3 fibroblasts mediated by nitric oxide at lower concentrations*. Biochem Mol Biol Int, 1997. **41**(3): p. 625-31.
138. Yamasaki, K., et al., *Reversal of impaired wound repair in iNOS-deficient mice by topical adenoviral-mediated iNOS gene transfer*. J Clin Invest, 1998. **101**(5): p. 967-71.
139. Luo, J.D., et al., *Gene therapy of endothelial nitric oxide synthase and manganese superoxide dismutase restores delayed wound healing in type 1 diabetic mice*. Circulation, 2004. **110**(16): p. 2484-93.
140. Shi, H.P., et al., *Supplemental dietary arginine enhances wound healing in normal but not inducible nitric oxide synthase knockout mice*. Surgery, 2000. **128**(2): p. 374-8.
141. Witte, M.B., et al., *L-Arginine supplementation enhances diabetic wound healing: Involvement of the nitric oxide synthase and arginase pathways*. Metabolism, 2002. **51**(10): p. 1269-1273.
142. Desneves, K.J., et al., *Treatment with supplementary arginine, vitamin C and zinc in patients with pressure ulcers: a randomised controlled trial*. Clin Nutr, 2005. **24**(6): p. 979-87.
143. Debats, I.B., et al., *Infected chronic wounds show different local and systemic arginine conversion compared with acute wounds*. J Surg Res, 2006. **134**(2): p. 205-14.
144. Schaffer, M.R., et al., *Nitric oxide, an Autocrine Regulator of Wound Fibroblast Synthetic Function*. The Journal of Immunology, 1997. **158**: p. 2375-2381.
145. Wu, H.M., et al., *VEGF induces NO-dependent hyperpermeability in coronary venules*. Am J Physiol, 1996. **271**(6 Pt 2): p. H2735-9.
146. Nathan, C.F. and J.B. Hibbs, Jr., *Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity*. Curr Opin Immunol, 1991. **3**(1): p. 65-70.
147. Villarete, L.H. and D.G. Remick, *Nitric oxide regulation of IL-8 expression in human endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **211**(2): p. 671-6.
148. Belenky, S.N., R.A. Robbins, and I. Rubinstein, *Nitric oxide synthase inhibitors attenuate human monocyte chemotaxis in vitro*. J Leukoc Biol, 1993. **53**(5): p. 498-503.
149. Gabbiani, G., G.B. Ryan, and G. Majne, *Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction*. Experientia, 1971. **27**(5): p. 549-50.
150. Horan, M.P., et al., *Impaired wound contraction and delayed myofibroblast differentiation in restraint-stressed mice*. Brain Behav Immun, 2005. **19**(3): p. 207-16.
151. Thornton, F.J., et al., *Enhanced collagen accumulation following direct transfection of the inducible nitric oxide synthase gene in cutaneous wounds*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **246**(3): p. 654-9.

152. Park, J.E., et al., *Excessive nitric oxide impairs wound collagen accumulation*. J Surg Res, 2013. **183**(1): p. 487-92.
153. Frank, S., et al., *Nitric oxide triggers enhanced induction of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes (HaCaT) and during cutaneous wound repair*. FASEB J, 1999. **13**(14): p. 2002-14.
154. Frank, S., et al., *Induction of inducible nitric oxide synthase and its corresponding tetrahydrobiopterin-cofactor-synthesizing enzyme GTP-cyclohydrolase I during cutaneous wound repair*. J Invest Dermatol, 1998. **111**(6): p. 1058-64.
155. Xiong, M., et al., *Production of vascular endothelial growth factor by murine macrophages: regulation by hypoxia, lactate, and the inducible nitric oxide synthase pathway*. Am J Pathol, 1998. **153**(2): p. 587-98.
156. Wang, R.G., A.; Shen, Y. J.; Scott, P. G.; Tredget, E. E., *Nitric Oxide Synthase Expression and Nitric Oxide Production Are Reduced in Hypertrophic Scar Tissue and Fibroblasts*. Journal for Investigative Dermatology, 1997. **108**(4): p. 438-444.
157. Krischel, V., et al., *Biphasic effect of exogenous nitric oxide on proliferation and differentiation in skin derived keratinocytes but not fibroblasts*. J Invest Dermatol, 1998. **111**(2): p. 286-91.
158. Hill, J.R., et al., *Nitric oxide regulates interleukin 1 bioactivity released from murine macrophages*. J Biol Chem, 1996. **271**(37): p. 22672-8.
159. Stallmeyer, B., et al., *The function of Nitric Oxide in Wound Repair: Inhibition of Inducible Nitric Oxide-Synthase Severely Impairs Wound Reepitheliaziation*. Journal of Investigative Dermatology, 1999. **113**: p. 1090-1098.
160. Wiegand, C., et al., *Antimicrobial impact of cold atmospheric pressure plasma on medical critical yeasts and bacteria cultures*. Skin Pharmacol Physiol, 2014. **27**(1): p. 25-35.
161. Yu, Y., et al., *Non-thermal plasma suppresses bacterial colonization on skin wound and promotes wound healing in mice*. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2011. **31**(3): p. 390-4.
162. Balzer, J., et al., *Non-Thermal Dielectric Barrier Discharge (DBD) Effects on Proliferation and Differentiation of Human Fibroblasts Are Primary Mediated by Hydrogen Peroxide*. PLoS One, 2015. **10**(12): p. e0144968.
163. Isbary, G., et al., *Successful and safe use of 2 min cold atmospheric argon plasma in chronic wounds: results of a randomized controlled trial*. Br J Dermatol, 2012. **167**(2): p. 404-10.
164. Bibinov, N., et al., *Spectroscopic characterization of an atmospheric pressure μ -jet plasma source*. Journal of Physics D: Applied Physics, 2011. **44**(34): p. 345204.
165. Kuchenbecker M., B.N., Kaemling A., Wandke D., Awakowicz P. and Viöl W., *Characterization of DBD plasma source for biomedical applications*. Journal of Physics D: Applied Physics. **Volume 42, Number 4**.
166. Hinz, B., et al., *The myofibroblast: one function, multiple origins*. Am J Pathol, 2007. **170**(6): p. 1807-16.
167. Stedman, D.H., et al., *Analysis of Ozone and Nitric Oxide by a Chemiluminescent Method in Laboratory and Atmospheric Studies of Photochemical Smog*. Journal of the Air Pollution Control Association, 1972. **22**(4): p. 260-263.
168. Laver, J.R., T.M. Stevanin, and R.C. Read, *Chemiluminescence Quantification of NO and Its Derivatives in Liquid Samples*. Methods in Enzymology, 2008. **436**: p. 113-127.
169. Cox, R., *Determination of nitrate and nitrite at the parts per billion level by chemiluminescence*. Anal. Chem., 1980. **52**: p. 332-335.
170. Franz, T.J., *Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data*. J Invest Dermatol, 1975. **64**(3): p. 190-5.

171. Isbary, G., et al., *Cold atmospheric plasma devices for medical issues*. Expert Rev Med Devices, 2013. **10**(3): p. 367-77.
172. Napp, M., et al., *In vitro susceptibility of methicillin-resistant and methicillin-susceptible strains of Staphylococcus aureus to two different cold atmospheric plasma sources*. Infection, 2016. **44**(4): p. 531-7.
173. Thana, P., et al., *A compact pulse-modulation cold air plasma jet for the inactivation of chronic wound bacteria: development and characterization*. Heliyon, 2019. **5**(9): p. e02455.
174. Witte, M.B., et al., *L-Arginine supplementation enhances diabetic wound healing: involvement of the nitric oxide synthase and arginase pathways*. Metabolism, 2002. **51**(10): p. 1269-73.
175. Li, Y. and P.I. Lee, *Controlled nitric oxide delivery platform based on S-nitrosothiol conjugated interpolymer complexes for diabetic wound healing*. Mol Pharm, 2010. **7**(1): p. 254-66.
176. Ganzarolli de Oliveira, M., *S-Nitrosothiols as Platforms for Topical Nitric Oxide Delivery*. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 2016. **119**: p. 49-56.
177. Moeen Rezakhanlou, A., et al., *Gaseous nitric oxide exhibits minimal effect on skin fibroblast extracellular matrix gene expression and immune cell viability*. Cell Biol Int, 2011. **35**(4): p. 407-15.
178. Li, Y., et al., *Effects of atmospheric-pressure non-thermal bio-compatible plasma and plasma activated nitric oxide water on cervical cancer cells*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 45781.
179. Kurake, N., et al., *Cell survival of glioblastoma grown in medium containing hydrogen peroxide and/or nitrite, or in plasma-activated medium*. Arch Biochem Biophys, 2016. **605**: p. 102-8.
180. Kaushik, N.K., et al., *Biological and medical applications of plasma-activated media, water and solutions*. Biol Chem, 2018. **400**(1): p. 39-62.
181. Tanaka, H.M., M., Ishikawa, K.; Nakamura, K.; Utsumi, F.; Kajiyama, H.; Kano, K.; Maruyama, S; Kikkawa, K.; Hori M. , *Cell survival and proliferation signaling pathways are downregulated by plasmaactivated medium in glioblastoma braintumor cells*. Plasma Medicine, 2012. **2**(4): p. 207–220
182. Horiba, M., et al., *Cytoprotective effects of mild plasma-activated medium against oxidative stress in human skin fibroblasts*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 42208.
183. Yan, D., et al., *The Specific Vulnerabilities of Cancer Cells to the Cold Atmospheric Plasma-Stimulated Solutions*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 4479.
184. Orié, N.N., et al., *S-nitroso-albumin carries a thiol-labile pool of nitric oxide, which causes venodilation in the rat*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **289**(2): p. H916-23.
185. Vestby, L.K., et al., *Bacterial Biofilm and its Role in the Pathogenesis of Disease*. Antibiotics (Basel), 2020. **9**(2).
186. Lackmann, J.W., et al., *Photons and particles emitted from cold atmospheric-pressure plasma inactivate bacteria and biomolecules independently and synergistically*. J R Soc Interface, 2013. **10**(89): p. 20130591.
187. Zemke, A.C., et al., *Nitrite modulates bacterial antibiotic susceptibility and biofilm formation in association with airway epithelial cells*. Free Radic Biol Med, 2014. **77**: p. 307-16.
188. Pacelli, R., et al., *Nitric oxide potentiates hydrogen peroxide-induced killing of Escherichia coli*. J Exp Med, 1995. **182**(5): p. 1469-79.
189. Lauer, T., et al., *Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(22): p. 12814-9.

190. Zhi Huang, 2 Sruti Shiva, 1 Daniel B. Kim-Shapiro, 3,4 Rakesh P. Patel, 5 Lorna A. Ringwood, 1 Cynthia E. Irby, 6 Kris T. Huang, 3,4 Chien Ho, 7 Neil Hogg, 8 Alan N. Schechter, 2 and Mark T. Gladwin, 1,6, *Enzymatic function of hemoglobins as a nitrite reductase that produces NO under allosteric control*. The Journal of Clinical Investigation, 2005. **115**: p. 2099-2107.
191. Curtis, E., et al., *Oxygen regulates tissue nitrite metabolism*. Antioxid Redox Signal, 2012. **17**(7): p. 951-61.
192. Doyle, M.P., et al., *Involvement of peroxide and superoxide in the oxidation of hemoglobin by nitrite*. Biochem Biophys Res Commun, 1982. **105**(1): p. 127-32.
193. May, J.M., et al., *Nitrite uptake and metabolism and oxidant stress in human erythrocytes*. Am J Physiol Cell Physiol, 2000. **279**(6): p. C1946-54.
194. Kelm, M., *Nitric oxide metabolism and breakdown*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1411**(2-3): p. 273-89.
195. Hezel, M., et al., *Dietary nitrate improves age-related hypertension and metabolic abnormalities in rats via modulation of angiotensin II receptor signaling and inhibition of superoxide generation*. Free Radic Biol Med, 2016. **99**: p. 87-98.
196. Schreml, S., et al., *The impact of the pH value on skin integrity and cutaneous wound healing*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2010. **24**(4): p. 373-8.
197. Duval, A., et al., *Cell death induced on cell cultures and nude mouse skin by non-thermal, nanosecond-pulsed generated plasma*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e83001.
198. Kim, C.H., et al., *Induction of cell growth arrest by atmospheric non-thermal plasma in colorectal cancer cells*. J Biotechnol, 2010. **150**(4): p. 530-8.
199. Phan, S.H., *Biology of fibroblasts and myofibroblasts*. Proc Am Thorac Soc, 2008. **5**(3): p. 334-7.
200. Shen Cherng *, J.Y., Hongbao Ma **, ***, *Alpha-Smooth Muscle Actin (α -SMA)* The Journal of American Science, 2008. **4**(4): p. 7-9.
201. Gabbiani, G., *The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases*. J Pathol, 2003. **200**(4): p. 500-3.
202. Penn, J.W., A.O. Grobbelaar, and K.J. Rolfe, *The role of the TGF-beta family in wound healing, burns and scarring: a review*. Int J Burns Trauma, 2012. **2**(1): p. 18-28.
203. Su, B., et al., *Redox regulation of vascular smooth muscle cell differentiation*. Circ Res, 2001. **89**(1): p. 39-46.
204. Sugiura, H., et al., *Reactive nitrogen species augment fibroblast-mediated collagen gel contraction, mediator production, and chemotaxis*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2006. **34**(5): p. 592-9.
205. Han, G., et al., *Nitric oxide-releasing nanoparticles accelerate wound healing by promoting fibroblast migration and collagen deposition*. Am J Pathol, 2012. **180**(4): p. 1465-73.
206. Emmert, S.I.G.K.J.L.J.P., F.; Metelmann H.-R.; Daeschlein G.; Masur, K.; Woedtke, von T.; Weltmann K.-D., *Clinical plasma medicine—position and perspectives in 2012 Paper of consent, result of the workshop “Clinical Concepts in Plasma Medicine”, Greifswald April 28th, 2012*. Clinical Plasma Medicine, 2013. **1**: p. 3–4.
207. Daeschlein, G., et al., *Skin and wound decontamination of multidrug-resistant bacteria by cold atmospheric plasma coagulation*. J Dtsch Dermatol Ges, 2015. **13**(2): p. 143-50.
208. Hoffmanns, M., Demir, E., Baldus, S., Balzer, J., Heuer, K., Fuch, P.C., Awakowicz, P., Suschek, C., Opländer, C., *Acidification and Nitrite:Nitrate Accumulation by Nonthermal Dielectric Barrier Discharge (DBD) Affect Human Dermal Fibroblasts*. Plasma Medicine, 2015. **5**(1): p. 71–85