

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

Grundlagen zur Verträglichkeit von Kaltplasma und Evaluation hauttoxischer Effekte

Dissertation

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

vorgelegt von
Martin Alexander Hoffmanns

2021

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Christoph V. Suschek

Zweitgutachter: PD Dr. rer. nat. Csaba Mahotka

Meinen Eltern,

die mich auf meinem Weg stets unterstützt und angespornt haben

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Heuer, K., et al. (2015). "The topical use of non-thermal dielectric barrier discharge (DBD): nitric oxide related effects on human skin." Nitric Oxide **44**: 52-60.

Balzer, J., et al. (2015). "Non-Thermal Dielectric Barrier Discharge (DBD) Effects on Proliferation and Differentiation of Human Fibroblasts Are Primary Mediated by Hydrogen Peroxide." PLoS One **10**(12): e0144968.

Hoffmanns M.A., E. Demir, S. Baldus, J. Balzer, K. Heuer, P. C. Fuchs, P. Awakowicz, C. V. Suschek, C. Opländer (2015) Acidification and nitrite/nitrate accumulation by non-thermal dielectric barrier discharge (DBD) affect human dermal fibroblasts. Plasma Medicine 5(1):71-85

Zusammenfassung

Hintergrund

Die Wundheilung ist ein komplexer Prozess, der durch unterschiedliche Einflüsse, z.B. Infekte oder verminderte Mikrozirkulation gestört werden kann. Da dies weiterhin ein relevantes Problem im klinischen Alltag ist, wird stets nach besseren Möglichkeiten gesucht, Wundheilungsstörungen entgegen zu wirken. Kaltes Plasma ist Gegenstand der aktuellen klinischen Forschung, da es den Heilungsverlauf von chronischen Wunden positiv beeinflussen könnte.

Zielsetzung

In dieser Arbeit wurde ein direkt über der zu behandelnden Oberfläche erzeugtes kaltes Atmosphärenplasma (Dielectric Barrier Discharge - DBD) auf Haut-Verträglichkeit geprüft. Weiterhin sollten mögliche toxische Effekte näher charakterisiert und die Rolle von radikalen Sauerstoffspezies untersucht werden.

Methoden

Mit einem durch die OECD anerkannten Haut-Toxizitäts-/Reizungsassay wurde mittels Episkin-Modell (künstliche Epidermis) die Wirkung von DBD (3-60 min) untersucht. Zum Vergleich erfolgte eine Behandlung von humaner Spenderhaut. In einem Zell-Kulturmodell mit primären humanen Hautfibroblasten wurden die physikalischen Auswirkungen (Austrocknung, pH, Osmolarität) von DBD sowie induzierbare toxische Effekte durch Live-Cell-Imaging, Viabilitätsassay (Resazurin) und Westernblot (PARP) untersucht. Zudem wurde oxidativer Stress mit einem intrazellulären ROS-Sensor gemessen und mittels Antioxidantien antagonisiert.

Ergebnisse

Am Episkin-Modell konnten keine hautschädlichen Effekte nachgewiesen werden. Analog hierzu konnten keine akuten schädlichen Effekte bei der Behandlung von humaner Spalthaut nachgewiesen werden. Jedoch wurde ein zeitverzögerter toxischer Effekt (Nachweis mittels Resazurin Assay 42 Stunden nach Behandlung von humaner Haut) beobachtet (Viabilitätsminderung ~60 %, n=6, p<0,05). Die zur Zellkulturbehandlung untersuchten physikalischen Parameter zeigten erst bei Behandlungszeiten ab 10 Minuten oder geringen Behandlungsvolumina < 215 µl signifikante Veränderungen. Nach fünfminütiger Behandlung bei einem Behandlungsvolumen von 250 µl wurde ein signifikant toxischer Effekt erzeugt (Viabilitätsminderung ~20,5 % n=8, p<0,001) und als Apoptose charakterisiert. Durch den Einsatz von spezifischen Antioxidantien konnte der toxische Effekt zumindest teilweise antagonisiert (z.B. ~21% Toxizitätsreduktion durch Ascorbat, n=6, p<0,05) werden. Alle verwendeten intrazellulären Fluoreszenzindikatoren zeigten eine vermehrte Signalinduktion durch Plasmabehandlung.

Schlussfolgerung

DBD-Behandlungen (3 Minuten) scheinen keinen unmittelbar schädlichen Effekt auf intakte Haut zu haben. Bei längeren Behandlungsdauern (15 min) ist eine zeitverzögerte schädliche Wirkung denkbar. Die Zellkulturversuche weisen auf mögliche Zell-toxische Effekte bei nicht intakter Epidermis, wie es bei Wunden der Fall ist, hin. Die Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass Wasserstoffperoxid maßgeblich für die Vermittlung eines zellschädigenden Effekts verantwortlich ist. Eine weitergehende klinische Beobachtung und Evaluation sind hier sinnvoll, da sich die positiven Effekte des Plasmas mit den toxischen Effekten die Waage halten müssen.

Abkürzungsverzeichnis

a.e.	Am ehesten
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
Asc	Ascorbat
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Calcium
CaCl	Calciumchlorid
cm	Zentimeter
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DBD	Dielectric Barrier Discharge
DBE	Dielektrische Barriereentladung
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Zellmedium
DNA	Deoxyribonucleic Acid
Fa.	Firma
FCS/FBS	Fetales Kälberserum
Fe _(aq) II	Eisenoxid
FITC	Anti-Fluorescein Antibody
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Hour (Stunde)
HaCaT-Keratinocyten	Human adult low Calcium high Temperatur Keratinocyten
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HCl	Salzsäure
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Hz	Herz
IL	Interleukin
i.S.v.	Im Sinne von
KCl	Kaliumchlorid
m	Meter
Mg ²⁺	Magnesium
mg	Milligramm
min	Minute
M	Mol
mm	Millimeter
mM	Millimol
NAC	N-Acetylcystein
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	NO-Derivate
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxid
OES	Absolutely calibrated optical emission spectroscopy

PARP	Poly ADP ribose polymerase
PBS	Phosphat buffered Solution
Pos.	Positiv
ppb	Parts per billion
ppm	Parts per million
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SSC	Saline Sodium Citrate
Tbl	Tablette
TBS	Tris-buffered Saline
TBS-T	Tris-bufferd Saline mit Tween 0,1 %
TUNEL	Terminal Transferase mediated dUTP Nick End Labeling
UKD	Universitätsklinik Düsseldorf
UV	Ultraviolett
vgl.	Vergleiche
w/o	Ohne
z.B.	Zum Beispiel
µm	Mikrometer
µM	Mikromol
°C	Grad Celcius

Inhalt

1	Einleitung	10
1.1	Plasma	10
1.2	Die Haut	14
1.2.1	Wundheilung	16
1.2.2	Gestörte Wundheilung.....	17
1.3	Art des Zelltodes	18
1.4	Ziele dieser Arbeit.....	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Materialien	20
2.1.1	Plasmaquelle.....	20
2.1.2	Gewebe.....	21
2.1.3	Hautersatzmodel.....	21
2.1.4	Verbrauchsmaterialien	22
2.2	Methoden.....	25
2.2.1	Zellkultur.....	25
2.2.2	Haut	29
2.2.3	Assays	31
2.2.4	Plasmabehandlung.....	42
2.2.5	Statistik.....	44
3	Ergebnisse	45
3.1	Physikalische Effekte / Grundlegende physikalische Wirkungen.....	45
3.1.1	Austrocknung bei Behandlung einer Zellkultur	45
3.1.2	Plasma-induzierte pH-Wert-Änderung.....	46
3.1.3	Osmolarität.....	48
3.1.4	Einfluss von Plasma auf dermale Fibroblasten	50
3.2	Haut-Korrosion.....	53
3.2.1	EpiSkin	53
3.2.2	Plasmaeffekte auf humane Spalthaut	54
3.3	Haut-Reizung	55
3.3.1	EpiSkin	55
3.3.2	Plasmaeffekte auf humane Spalthaut	56
3.4	Plasmawirkung in einer Wunde	57
3.4.1	Etablierung der Behandlungsdauer	57

3.5	Plasmainduzierter Zelltod	58
3.5.1	Apoptosemarker PARP	58
3.5.2	TUNEL.....	59
3.5.3	Wirkung von Antioxidantien.....	60
4	Diskussion.....	62
4.1	Einfluss physikalischer Effekte auf die Zellkultur	63
4.2	Wirkung auf oberflächliche / intakte Haut	66
4.3	Wirkung auf frei liegende Fibroblasten.....	70
5	Schlussfolgerungen	74
6	Abbildungsverzeichnis	75
7	Tabellenverzeichnis.....	77
8	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	78
9	Danksagung.....	83

1 Einleitung

1.1 Plasma

Unter dem Begriff Plasma versteht man in der Medizin meistens Blutplasma, ein Gemisch aus Wasser, Proteinen und weiteren kleinmolekularen Stoffen, das einen Teil des menschlichen Blutes ausmacht, für den kolloidosmotischen Druck im Gefäßsystem verantwortlich ist, eine Transport- und Pufferfunktion hat und ein Reservoir für Aminosäuren ist. (Schmidt 2011)

Zum anderen bezeichnet das Wort Plasma im physikalischen Sinne ein Gas, das zum Teil oder vollständig aus geladenen Teilchen (Ionen und Elektronen) besteht. Dieser Zustand eines Gases wird auch als vierter Aggregatzustand bezeichnet. Das Verhalten und die Eigenschaften von Plasma im physikalischen Sinne können stark variieren, abhängig von Umgebungsbedingungen wie anliegenden elektrischen, magnetischen oder gravitativen Feldern. (Fridman 2008)

Bei physikalischem Plasma wird weiterhin zwischen „kaltem“ beziehungsweise non thermalem und „heißem“ Plasma unterschieden.

Plasma in der Medizin

Die Anwendung von heißem Plasma, wie es bereits seit langer Zeit zur Koagulation und damit zu Blutstillung oder als Elektroskalpell in der Chirurgie verwendet wird (Robinson 1934), ist inzwischen klinischer Alltag. Es wird mittels Wechselstrom mit Frequenzen von 300–4000 kHz erzeugt, um eine Reizung von Nerven und Muskeln zu vermeiden. Hierbei kommt es durch hohe Spannungen zu einer Gasentladung, die als Lichtbogen sichtbar ist. Die gezielte Anwendung von Stromfluss wird in der Medizin zur Erreichung von Hämostase und für die Zerstörung von Gewebe in unterschiedlichem Ausmaß genutzt. (Pollock 2008)

Bei heißem Plasma macht man sich die hohe Temperatur eines Stromflusses an einer blutenden Stelle im Gewebe zu Nutze, entweder mithilfe einer bipolaren Pinzette, die den fließenden Strom sofort wieder ableitet, oder mittels Elektroskalpell und großflächiger Gegenelektrode am Patienten, die den Strom so durch den Patienten ableitet, dass es nur an der zu kauterisierenden Stelle zu Verbrennungen und damit zum Stillstand einer Blutung kommt. Innerhalb der beiden

oben genannten Anwendungsformen existieren inzwischen bereits verschiedene Unterformen. So gibt es die Soft-Koagulation mit Spannungen <190 V, um ohne ungewollten Funkenschlag und ohne die Wirkung eines Elektroskalpells Blutgefäße zu verschließen. Bei der forcierten Koagulation mit Spannungen bis 2,65 kV erreicht man eine höhere Koagulationstiefe und bei der Spray-Koagulation mit Spannungen bis 4 kV werden Lichtbögen erzeugt, um Gewebe großflächig zu koagulieren. (Rüdiger Kramme 2011) Diese Anwendung wird aufgrund der verwendeten Frequenzen auch als Hochfrequenz-Chirurgie bezeichnet und nutzt vor allem die thermischen Eigenschaften von heißem Plasma, um durch Gewebeschädigung eine Blutstillung zu erreichen.

Non-thermales Plasma (kaltes Plasma)

Vom heißen Plasma muss das kalte Plasma unterschieden werden, bei dem es in erster Linie nicht um thermische, sondern um andere physikalische Eigenschaften geht, welche für medizinische Anwendungen nutzbar gemacht werden können. In der Medizin findet eine Art von kaltem Plasma zurzeit Anwendung in der Sterilisation hitzelabiler Stoffe. (Bertoldi, Fare et al. 2015)

Innerhalb des kalten Plasmas gibt es weitere Unterkategorien. Unterschieden wird hauptsächlich nach Erzeugungsort des Plasmas. Hier existieren direktes, indirektes sowie sog. Hybridplasma.

Direktes Plasma wird unmittelbar auf der Probe erzeugt, die Gegenelektrode zur dielektrisch behinderten Elektrode ist also Substrat. Folglich erfolgt auch der Stromfluss über das Substrat. Eine Art, dieses direkte kalte Plasma zu erzeugen, ist die stille elektrische Entladung, Dielectric Barrier Discharge (DBD) oder dielektrische Barriereentladung (DBE).

Hierbei handelt es sich um eine Wechselfspannungs-Gasentladung, bei der mindestens eine der Elektroden vom Gasraum durch galvanische Trennung mittels eines Dielektrikums elektrisch isoliert ist. (Neiger and Liu 2001)

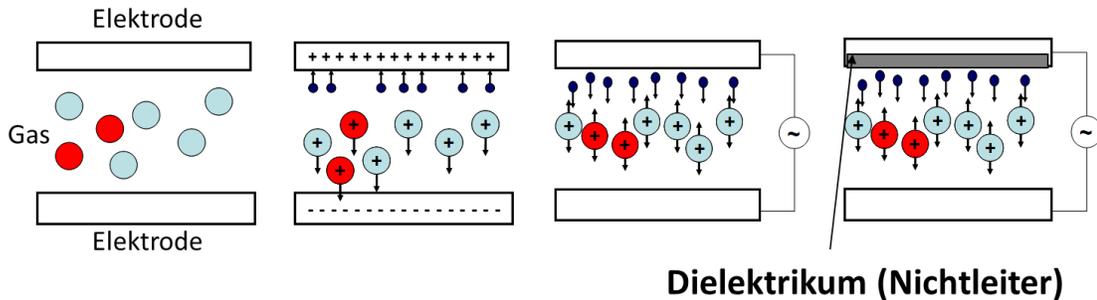


Abbildung 1: Vereinfachte schematische Darstellung der Erzeugung von DBD. Im elektrischen Wechselfeld werden Elektronen beschleunigt und ionisieren weitere Atome und Moleküle.

Generell gilt für die DBD-Erzeugung, dass die in der Plasmaquelle anliegende Spannung die Durchschlagsspannung der Atmosphäre übersteigt, die sich zwischen den Elektroden befindet. Hierbei kommt es durch Stoßionisation zur Entstehung eines Lichtbogens. Einzelne Elektronen werden im elektrischen Feld beschleunigt und ionisieren weitere Atome oder Moleküle, auf die sie treffen. Auf diese Weise kommt es durch eine Kettenreaktion zur Bildung eines Leitungschanals. Hierbei entstehen neben dem sichtbaren Blitz ionisierte Moleküle, die verschiedene biologische Effekte haben. (Kogelschatz, Eliasson et al. 1997)



Abbildung 2: Nahaufnahme mit einer Hochgeschwindigkeitskamera von DBD-Entladungen über humaner Dermis. Es zeigen sich elektrische Entladungen in Form von Filamenten. (Bilder mit freundlicher Genehmigung der Ruhr-Universität Bochum)

Kaltes Plasma (DBD) findet bereits in zahlreichen Gebieten Anwendung. Ein für die medizinische Anwendung zugelassener Plasmagenerator ist beispielsweise der „Plasmaderm“ von CINOGY.



Abbildung 3: „Plasmaderm“ von CINOGY

Beim indirekten Plasma wird die Gasentladung zwischen zwei durch ein Dielektrikum getrennten Elektroden erzeugt. Diese bilden hierbei eine gemeinsame Oberfläche. Analog hierzu wird Hybridplasma wie direktes Plasma generiert, jedoch wird hier der elektrische Strom über ein leitendes Netz, das einen geringeren elektrischen Widerstand als das zu behandelnde Substrat besitzt, abgeleitet. (Lee et al. 2011)

Diese Arten von Plasmen können zudem in einem Trägergas wie Helium oder Argon erzeugt werden, welches dann zu den behandelnden Oberflächen geleitet wird. (Emmert, Brehmer et al. 2013) Da kaltes Plasma nicht durch seine thermischen Eigenschaften auf biologische Systeme wirkt, ist es entscheidend, aus welchem Gas es erzeugt wird. Hier existieren verschiedene Systeme, die zum Beispiel Plasma aus Argon oder Raumluft erzeugen. (Gorynia, Koban et al. 2013)

In dieser Arbeit bezieht sich der Begriff Kaltplasma, sofern nicht anders definiert, stets auf kaltes Plasma beziehungsweise auf Dielectric Barrier Discharge (DBD).

Kaltes Plasma in der medizinischen Forschung

In den letzten Jahren rückte kaltes Plasma mehr in den Focus der medizinischen Forschung, da festgestellt wurde, dass Kaltplasma antibakterielle Effekte sowie weitere biologisch aktive Eigenschaften hat, die u.a. durch seine physikalischen Eigenschaften vermittelt werden.

Kaltes Plasma kann zum Beispiel genutzt werden, um zumindest *in vitro* die Größe von endometrialen Stromazell-Herden signifikant zu verkleinern (Ishida, Mori et al. 2016) und Biofilme in Form von Plaque auf Zähnen zu bekämpfen. (Jablonowski, Fricke et al. 2016) Des Weiteren gibt es Anwendungsstudien, in denen indirektes Argon-Plasma erfolgreich sowohl zur kurativen als auch palliativen Therapie von Magentumoren genutzt werden konnte. (Oh, Kim et al. 2016)

Diese Auswahl an Studien zeigt, dass Plasma verschiedener Systeme (direkte vs. indirekte Anwendung, Helium-Plasma, Argon-Plasma etc.) inzwischen vielfache Anwendung in der Medizin findet. Einige Studien weisen darauf hin, dass Plasma insbesondere bei Wundheilungsstörungen positive Effekte haben kann. Hier konnte gezeigt werden, dass kaltes Plasma in der Lage ist, chronisch venöse Ulcera signifikant zu verkleinern (Brehmer, Haenssle et al. 2015) sowie die Keimzahl in chronischen Wunden signifikant zu senken. (Isbary, Heinlin et al. 2012)

1.2 Die Haut

Die Haut ist das größte Organ des Menschen. Mit einer Fläche von ca. 2 m² und einer Dicke von 1 bis 8 mm ist sie durchschnittlich 20 kg schwer und damit größer und schwerer als alle anderen Organe des menschlichen Körpers. Sie schützt den Körper vor äußeren Einflüssen, wie z.B. Kälte und Hitze sowie vor Austrocknung. Zugleich ist sie ein Sinnesorgan und schützt den Körper vor Krankheitserregern. Um diesen vielfältigen Aufgaben gerecht zu werden, ist die Haut komplex aufgebaut und besteht aus verschiedenen Schichten. Anatomisch ist dies die Epidermis (Oberhaut), welche je nach Ort eine Dicke von 0,03 bis 1,5 mm aufweist. Diese Schicht besteht fast ausschließlich aus Zellen, den Keratinozyten, die von basal nach apikal eine Differenzierung durchlaufen, in der ein programmierter Zelltod stattfindet. Dieser Zyklus dauert durchschnittlich 27 Tage (Doran et al. 1980; Eckert 1989; Senegal 1976), in denen die

Zellen sich mit Keratin, dem Hautprotein, anreichern und zu Keratinozyten werden. (Haake and Holbrook 1999; STENN KS 1983)

Im Rahmen dieses Differenzierungsprozesses werden verschiedene Schichten der Epidermis unterschieden, von apikal nach basal (der Differenzierungsprozess erfolgt in umgekehrter Reihenfolge):

1. Stratum corneum
2. Stratum lucidum
(bei dicker Haut)
3. Stratum
granulosum
4. Stratum basale

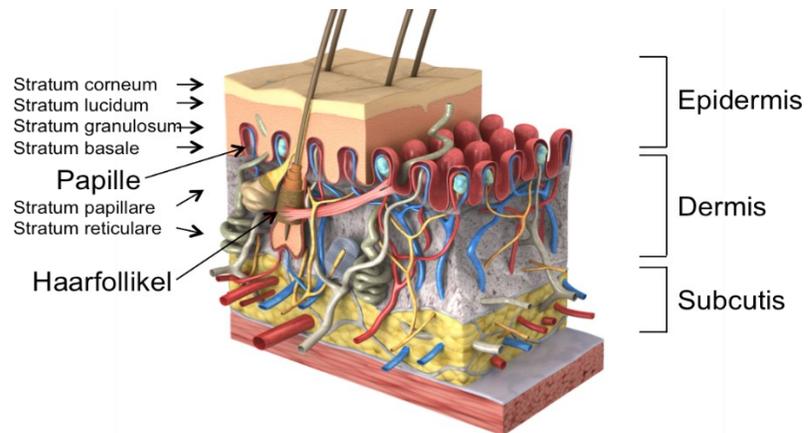


Abbildung 4: Aufbau der menschlichen Haut, Querschnitt der Haut (Skin Care Forum Ausgabe 27, www.scfonline.com, Cognis, Deutschland GmbH & Co. KG, modifiziert)

In der Epidermis finden sich zudem die so genannten Merkel-Zellen, die den Tastsinn der Haut vermitteln, Melanozyten, die die Pigmentstoffe der Haut produzieren und Langerhans-Zellen als Teil des Immunsystems. (Aubin 2003; Jimbow et al. 1976; Quevedo, JR and Fleischmann 1980; Wolff 1973). Unter der Epidermis liegt die Dermis (Lederhaut), die mit 1,5 bis 6 mm den dicksten Teil der Haut bildet. In der Dermis finden sich Drüsen, Haarfollikel, Nervenenden, Blut- und Lymphgefäße sowie Strukturproteine wie Kollagen. Die Dermis ist unterteilt in ein Stratum papillare und ein Stratum reticulare, in dem sich die o.g. Strukturen befinden. In diesem Bereich finden sich Fibroblasten als vorherrschende Zellart. Diese normalerweise durch die Epidermis geschützte Zellschicht hat verschiedene Aufgaben, wie die Produktion der extrazellulären Matrix oder die Steuerung der Keratinozyten-Proliferation. Dies geschieht unter anderem durch Zell-Zell-Kontakte sowie auch durch sezernierte Botenstoffe. Unter der Dermis befindet sich die Unterhaut, die Subcutis, als Verbindung zu den tiefergelegenen Schichten wie Knochen und Muskeln. Sie dient als Isolator, Schutz und Energiereserve. (Haake and Holbrook 1999)

1.2.1 Wundheilung

Zu Beginn muss der Begriff der Wunde genauer definiert werden, da die Medizin zwischen Wunden und Ulcera unterscheidet. Bei der Wunde handelt sich um eine akute Verletzung von nicht vorgeschädigtem Gewebe, die prinzipiell eine gute Heilungstendenz hat. Ulcera hingegen sind chronische Wunden, bedingt durch eine Vorschädigung, wie zum Beispiel eine periphere arterielle Verschlusskrankheit.

Bei der Wunde verläuft die Heilung in verschiedenen Phasen, die durch Botenstoffe des Körpers, wie z.B. Zytokine oder Komplementfaktoren vermittelt werden. Grob geschieht dies in folgender Reihenfolge:

1. Entzündungsphase / Exsudative Phase

Einwanderung von immunkompetenten Zellen, die das verletzte Gewebe reinigen und über die Abgabe von Botenstoffen die nächste Phase der Wundheilung einleiten.

2. Proliferationsphase

Es kommt zur Einwanderung von Fibroblasten und Einsprossung von Gefäßen. Durch Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten besitzen diese kontraktilen Eigenschaften, durch welche es zur Kontraktion des Granulationsgewebes kommt.

3. Remodellierung

Zuletzt wird das entstandene Granulationsgewebe zu einer Narbe umgebaut.

4. Re-Epithelisierung

Die Epithelisierung beginnt früh während der Heilung. Keratinozyten wandern aus und bedecken das verletzte Gewebe.

Im klinischen Alltag unterscheidet man zwischen primärer und sekundärer Wundheilung, abhängig davon, ob bei einer Wunde zur Heilung die Wundränder adaptiert sind oder eine Defektheilung stattfindet. Da Wunden, die primär heilen, eine gute Heilungstendenz haben, finden die aktuell vorhandenen Geräte Anwendung vor allem bei chronischen sekundär

heilenden Wunden, bei denen eine Infekt-Konstellation problematisch ist. (Wild and Auböck 2007)

Bei einem Ulkus handelt es sich im Gegensatz hierzu nicht um eine akute Verletzung, sondern um einen Hautdefekt, der bis in die Dermis reicht, verschiedene Ursachen haben kann und durch verschiedene Faktoren unterhalten wird. (Nast et al. 2016; Avishai et al. 2017) Während die Heilung einer Wunde in der Regel komplikationslos abläuft, bestehen bei Entstehung eines Ulkus in der Regel bereits Risikofaktoren, die eine Heilung des Defektes verhindern oder zumindest verzögern. (Avishai et al. 2017) Da eine der Hauptursachen die bakterielle Kontamination darstellt, ist es naheliegend, dass eine von Wundspülung, Debridement und Antibiotika unabhängige Möglichkeit der Dekontamination einer Wunde eine sinnvolle Ergänzung in der Wundtherapie darstellt.

1.2.2 Gestörte Wundheilung

Wie man an der Komplexität der Wundheilung erahnen kann, kann diese an verschiedenen Stellen bzw. durch unterschiedliche Faktoren gestört werden. Da für die verschiedenen Abläufe viel Energie bereitgestellt werden muss und die Abläufe durch verschiedene Signalstoffe koordiniert werden, ist es gut nachvollziehbar, dass diese durch die in Tab. 1 genannten Risikofaktoren ggf. nicht ordnungsgemäß ablaufen können.

Tabelle 1: Risikofaktoren für Wundheilungsstörungen (Avishai et al. 2017)

<ul style="list-style-type: none">- Infektionen- Genetisches Risiko (nicht beeinflussbar)- Autoimmunkrankheiten- Alter- Psychischer Stress- Rauchen- Alkoholabusus- Unausgeglichene Ernährung (Fettsucht, Nährstoffmangel)- Vorerkrankungen (Diabetes, Kardio-vaskuläre Erkrankungen)- Krebserkrankungen

1.3 Art des Zelltodes

Ein Zellschaden kann auf unterschiedliche Arten vermittelt werden und verschiedene Arten des Zelltodes verursachen. Eine Form wird Apoptose genannt (von griech. „abfallen“). Hierbei handelt es sich um einen programmierten Zelltod. Dieser wird durch eine Zelle eingeleitet, wenn z.B. irreparable DNA-Schäden oder eine hypoxische Schädigung der Zelle vorliegen oder wenn bestimmte Zellsignale erkannt werden. Hiernach laufen innerhalb der Zelle verschiedene Cytochrom-C vermittelte Kaskaden in der Zelle ab, wodurch sich die geschädigte Zelle aus dem Zellverband löst und im Verlauf fragmentiert, um vom körpereigenen Immunsystem phagozytiert zu werden. (Li et al. 2006)

Anders als ein geplanter Zelluntergang bezeichnet die Nekrose einen nicht physiologischen Zelluntergang, der immer mit einer Entzündungsreaktion einhergeht. Dieser ist vermittelt durch einen direkten Zellschaden und führt zum Zelluntergang durch Integritätsverlust. Die darauffolgende Entzündung ist vermittelt durch Granulozyten, die die Gewebsreste abbauen. (Krams and Frahm 2013)

1.4 Ziele dieser Arbeit

Die Wundheilung ist ein komplexer Prozess, der durch unterschiedliche Einflüsse, z.B. Infekte oder verminderte Mikrozirkulation, gestört werden kann. Wundheilungsstörungen sind ein relevantes Problem im klinischen Alltag und der Einsatz von Kaltplasma könnte den Heilungsverlauf insbesondere von bakteriell kontaminierten chronischen Wunden positiv beeinflussen.

Daher ist es ein Ziel dieser Arbeit, die Hautverträglichkeit von Kaltplasma, hier Dielectric barrier discharge (DBD) unter Einsatz von anerkannten Hautersatzmodellen aber auch menschlicher Spenderhaut zu überprüfen .

Mittels Zellkulturversuchen soll zudem die Wundsituation simuliert werden und die Verträglichkeit von Kaltplasma auch auf freiliegenden Bindegewebszellen (Hautfibroblasten) untersucht werden. Hier werden auch mögliche Plasma-induzierte chemo-physikalische Veränderungen des Zellmilieus (pH-Wert, Osmolarität) charakterisiert, da diese einen starken Effekt auf die Zellphysiologie haben können. Da Kaltplasma u.a. auch bioaktive radikale Sauerstoffspezies generiert, soll des Weiteren geklärt werden, welche Rolle diese bei möglichen plasma-induzierten Zelleffekten, insbesondere Zelltoxizität und Zelltod, spielen.

Da schon einige Plasmaquellen im experimentell-klinischen Einsatz sind, sollen mit Hilfe dieser Studie ein Beitrag für die Festlegung eines möglichen therapeutischen Behandlungszeitraums geleistet und zudem mögliche schädliche Wirkungen von Kaltplasma-Behandlungen und deren Mechanismen evaluiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Plasmaquelle

Die zur Behandlung verwendete Plasmaquelle war ein Prototyp aus einer angesteuerten zylindrischen Kupferelektrode, beschichtet mit Aluminiumoxid. Der Durchmesser der Elektrode betrug 10 mm. Mit dieser Plasmaquelle kann Plasma mit einer geerdeten Gegenelektrode oder einer Gegenelektrode mit hoher Kapazität erzeugt werden. Der Hersteller des verwendeten Gerätes ist die Firma CINOGY GmbH, Duderstadt.

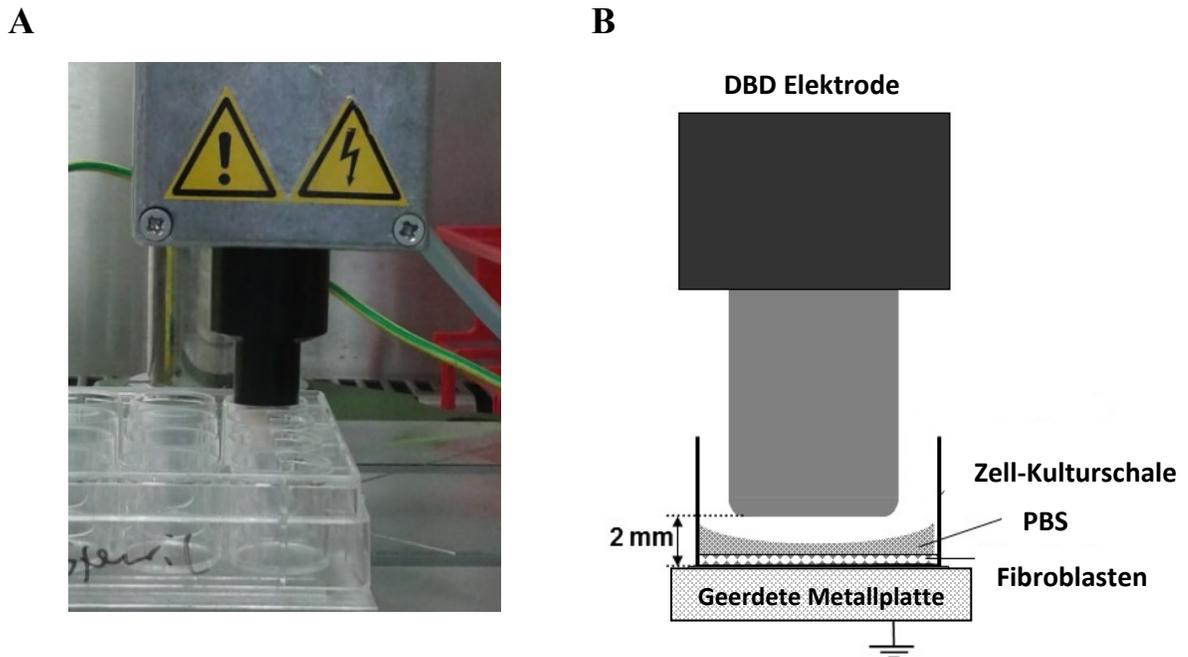


Abbildung 5 **A:** Verwendete Plasmaquelle über einer 24-Well-Platte **B:** Schema der die durch ein Dielektrikum isolierten Elektrode der Plasmaquelle über einer Flüssigkeit enthaltenden Zellkulturschale mit Fibroblasten (Balzer, J., et al. 2015)

Das entstandene Plasma wurde mittels *absolutely calibrated optical emission spectroscopy* (OES) von der Ruhr-Universität Bochum charakterisiert. Es wurden Gas-Temperatur, UV-Strahlung und Plasmaparameter wie Elektronendichte und *electron velocity distribution function* bestimmt.

Spektren wurden mittels Spektrometer (Ocean Optics, QE 65000) mit einer Auflösung von etwa 1,3 nm bei 200–800 nm Wellenlänge gemessen. Die mittlere Gastemperatur wurde bestimmt, indem die gemessene Rotationstemperatur von Stickstoff bei 337,1 nm mit einem simulierten Spektrum der gleichen Bedingungen verglichen wurde. (Bibinov, Knake et al. 2011)

2.1.2 Gewebe

Gewebe zur Zellisolation und für Versuchszwecke wurden von der plastischen Chirurgie in Köln-Merheim (Kliniken der Stadt Köln - Gewebe von Abdominal-Plastiken) zur Verfügung gestellt. Eine Einwilligung der jeweiligen Spender lag für alle von uns verwendeten Gewebestücke vor. Bei der Haut aus der plastischen Chirurgie in Köln-Merheim bestanden die Proben aus humaner Haut und, sofern dies dem Operateur möglich war, aus Spalthaut der Dicke 0,7 mm.

Ein Ethikantrag für die Verwendung der Spenderepidermis und den daraus isolierten Zellen liegt mit der Antrags-Nr. 3634 bei der Ethikkommission der Universitätsklinik Düsseldorf vor.

2.1.3 Hautersatzmodell

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete EpiSkin (künstlich gezüchtete Haut) wurde von der Firma SkinEthics aus Frankreich bezogen. Bei den Präparaten handelte es sich um humane Keratinozyten, die auf einer Kollagenmatrix gezüchtet wurden und gemäß den Angaben des Herstellers histologisch humaner Epidermis gleichen. (Roguet, Regnier et al. 1994) Diese künstliche Haut ist entsprechend der hier verwendeten Testprotokolle validiert für die Ermittlung von Haut-Korrosion und Irritation. (M.K. Robinsona and M. Ponced 2002) (Kandarova, Liebsch et al. 2006) (Tornier, Amsellem et al. 2010)

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Einwegmaterialien

Material	Firma
Biopsiestanze	pfm medical ag, Köln
Falcon™ (Volumen: 15 / 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Glas-Pasteurpipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Mikroreaktionsgefäß (Volumen: 1,5; 2,0 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen	moonlab plastics, Heidelberg
Spritzen (diverse Größen)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Stripetten	Merck KGaA, Darmstadt
T75 Flaschen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Well-Platten (6, 24, 96)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Whatman-Paper, Filterpapier (2,5 mm)	Merck KGaA, Darmstadt
Zellkulturschalen (Petrischalen)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zell-Sieb	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Millipore Sterilfilter (Porenweite 0,22 µm)	Merck KGaA, Darmstadt

Tabelle 3: Antikörper

Antikörper	Firma
Alexa Fluor 488-conjugated Donkey monoclonal to Mouse IgG	Abcam, Cambridge
Anti-alpha SMA Antibody	Abcam, Cambridge
Anti-Fluorescein Antibody	Abcam, Cambridge
Anti-S-Nitrosocysteine Mouse monoclonal Antibody	Abcam, Cambridge
Dako Goat Anti-Mouse Immunoglobulin	Agilent, Santa Clara
Dako Goat Anti-Rabbit Immunoglobulin	Agilent, Santa Clara

Tabelle 4: Medien, Chemikalien und Reagenzien

Material	Firma
2',7'-Dichlorofluorescein	SIGMA-ALDRICH®, Deisenhofen
Acrylamid 30 %	Carl Roth, Karlsruhe
AFCS	Pan Biotech, Aidenbach
Ascorbat	SIGMA-ALDRICH®, Deisenhofen
Benzoessäure	SIGMA-ALDRICH®, Deisenhofen
BSA (Fraction V pH 7,0)	PAA Laboratories GmbH, Linz
cComplete™ Mini Proteasehemmer-Cocktail	Merck KGaA, Darmstadt
D-Mannitol	SIGMA-ALDRICH®, Deisenhofen
Dako - DAPI	Agilent, Santa Clara
Deadend TUNEL Fluometric Assay Kit	Promega, Madison
Dispase-II	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel
Gibco DMEM 4,5 g/l Glucose	Pan Biotech, Aidenbach

Tabelle 4: Medien, Chemikalien und Reagenzien (Fortsetzung)

Material	Firma
DMSO (Dimethylsulfoxide D2650 - Hybri-Max™)	SIGMA-ALDRICH®, Deisenhofen
Essigsäure (96 %)	Merck KGaA, Darmstadt
Formaldehyd (4 %, methanolfrei)	AppliChem, Darmstadt
Glutamin	Pan Biotech, Aidenbach
Glutathion	SIGMA-ALDRICH®, Deisenhofen
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
HEPES Buffer Solution 1M	Pan Biotech, Aidenbach
Hoechst 3342	Hoechst-AG, Frankfurt-Höchst
Hydrogenchlorid 1M	Reagecon Diagnostics Ltd, Shannon
Kollagenase Typ 1	Biochrom GmbH, Berlin
L-Ascorbic Acid	SIGMA-ALDRICH®, Deisenhofen
L-Glutathione	SIGMA-ALDRICH®, Deisenhofen
Mannitol	SIGMA-ALDRICH®, Deisenhofen
Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
NAC	SIGMA-ALDRICH®, Deisenhofen
Na-Deoxycholsäure	SIGMA-ALDRICH®, Deisenhofen
Neutralrot	SIGMA-ALDRICH®, Deisenhofen
Vectashield, Mounting Zellmedium	Vecta Laboratories, Inc., Burlingame
N-Acetyl-Cystein	SIGMA-ALDRICH®, Deisenhofen
Natriumchlorid	B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG, Melsungen
Paraformaldehyd 4 %	SIGMA-ALDRICH®, Deisenhofen
PBS (phosphate buffered saline solution)	Pan Biotech, Aidenbach
Penicillin Streptomycin	Pan Biotech, Aidenbach
Pierce S-Nitrosylation Westernblot Kit	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
PonceauS	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Resazurin „Cell-Titer Blue®“	Promega, Madison
Sodium Dodecyl Sulfat	SIGMA-ALDRICH®, Deisenhofen
Sodium-L-Ascorbat	SIGMA-ALDRICH®, Deisenhofen
Sodiumnitrit	VWR International GmbH, Darmstadt
Trypanblau	Promega, Madison
Trypsin/ EDTA 0,05 %/0,02 %	Pan Biotech, Aidenbach
Tween 0,1 %	SIGMA-ALDRICH®, Deisenhofen
Urat	SIGMA-ALDRICH®, Deisenhofen

Tabelle 5 Verwendete technische Geräte

Gerät	Firma
Autoklav	Systec, Wettengel
Blottkammer (Gel-Doc)	BioRad, Hercules
Brutschrank (HERAcell® 150)	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham
Einbettssystem TPS- 1 EVO II	Horst Wendt – Pathisto, Georgsmarienhütte
Heizbad (drybath)	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham
Kryo-Einfriergerät (Mr. Frosty)	Carl Roth, Karlsruhe
Mikroskop: Zeiss Axiovert 40	Carl Zeiss, Oberkochen
Mikroskop: Zeiss Axioskop	Carl Zeiss, Oberkochen
Mikrotom Cut 6062	SLEE medical GmbH, Mainz
Multipipette® plus	Eppendorf AG, Hamburg
Multiplattenlesegerät (VICTOR 3™ V Multilabel Counter model 1420)	Perkin Elmer, Waltham
Karl Hecht™ Assistent™ Neubauerzählkammer	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham
Osmometer Typ 6	Waldemar Loeser GmbH & Co. KG, Speyer
Pipetten (Research® fix 10 - 100 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten (Research® fix 100 - 1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten (Research® fix 0,5 - 10 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten (DH09306)	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham
Pipettierhilfe (accu-jet® pro)	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Fixierapparat (Shandon Citadell 1000)	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham
Sterilbank (Euroflow EF5E)	Clean Air by Baker, Utrecht
Taumel-Rollenmischer (RM5-V 1750)	Labortechnik Fröbel GmbH, Lindau
Taumel-Rollenmischer (RM5-V80 1752)	Labortechnik Fröbel GmbH, Lindau
Ultraschallprozessor UP50H	Welabo, Nettetal
Waage (Kern ABJ Log NoA01 Electronic Balance Typ ABJ2204 No WB1150494)	KERN & SOHN GmbH, Balingen
Waage (Kern 440-45)	KERN & SOHN GmbH, Balingen
Zentrifuge (Fresco 17)	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham
Zentrifuge (Megafuge 16 R)	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham
Zentrifuge (Pico 17 Microzentrifuge)	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham

Tabelle 6: verwendete Software

Programm	Verwendung
GraphPad Prism 5.0	Statistik
Microsoft Excel	Datenaufbereitung / Statistik
Microsoft Word	Textverarbeitung
OCLC Citavi 6	Literaturverwaltung
Quantity One 4.6.5 Basic	Westernblot
Wallac 1420 Workstation	Multiplattenlesegerät
Zeiss Axio Vision	Mikroskopsoftware

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Arbeit mit Zellkulturen fand stets unter sterilen Bedingungen in einer Sterilbank mit sterilen Einwegmaterialien statt, sofern die Zellen im Anschluss weiter kultiviert werden sollten. Bei einzelnen Experimenten, deren Dauer keine Möglichkeit für eine nennenswerte bakterielle Kontamination bot, welche zu einer Verfälschung der Ergebnisse hätte führen können, wurde auf das sterile Arbeiten unter der Bank verzichtet. Konnten benötigte Einwegmaterialien nur in unsterilem Zustand vom Labor bezogen werden, wurden sie in entsprechenden Autoklavierbeuteln eingeschweißt und im laboreigenen Autoklaven hitzesterilisiert. Alle unsterilen Flüssigkeiten wurden mittels Sterilfiltern sterilisiert.

2.2.1.1 Zellisolation

Isoliert wurden Zellen (Fibroblasten) aus Vollhaut (Hautpräparate plastischer Operationen i.S.v. Mamma- oder Abdominalreduktionsplastiken). Die Präparate wurden von den jeweiligen Operateuren unter OP-Bedingungen steril verpackt und von Mitarbeitern des Forschungslabors der Orthopädie und Unfallchirurgie (ehemals Unfall- und Handchirurgie) des Universitätsklinikums Düsseldorf UKD abgeholt.

Die Isolation der Zellen erfolgte nach der im Forschungslabor der Orthopädie und Unfallchirurgie (ehemals Unfall- und Handchirurgie) des Universitätsklinikums Düsseldorf etablierten Prozedur. Hierfür wurden am ersten Tag der Aufbereitung im ersten Schritt die

Hautpräparate unter einer Sterilbank in eine mit PBS gefüllte Petrischale (Durchmesser 15 cm) überführt. In dieser wurde, falls erforderlich, mit Pinzette und Schere das subkutane Fettgewebe abpräpariert. Die nun fettfreie Haut wurde als nächstes in ca. 1 x 0,5 cm große Stücke zerteilt. Nun wurde eine Dispase-II-Lösung mit einer Dispasekonzentration von 2,5 U/ml in PBS mit 5 % HEPES-Puffer angesetzt und steril filtriert. Die klein geschnittenen Hautstücke wurden in ein Zentrifugenröhrchen (50 ml / Falcon™) überführt. Es wurden 5-10 ml Dispase zugegeben, sodass die Haut mehr als vollständig bedeckt war. Als nächstes wurde das Röhrchen 12 Stunden lang bei 4 °C auf einem Taumelroller inkubiert. Anschließend kam das Röhrchen für etwa 10-30 Minuten bei 37 °C in ein Schüttelwasserbad, bis eine Trübung der Lösung darauf hinwies, dass sich die Epidermis der Präparate bereits von der Dermis gelöst hatte. Unter der Sterilbank wurde nun die Dispase mit 4 °C kaltem PBS abgestoppt und der Inhalt des Zentrifugenröhrchens wieder in eine Petrischale gegeben. Hier wurde nun mittels zweier Pinzetten die Epidermis von der Dermis getrennt. Während des Vorgangs wurde die Epidermis in neuen 50 ml-Röhrchen mit PBS gesammelt und die Dermis für den nächsten Schritt in ein 50 ml-Röhrchen mit Kollagenase (0,2 % Kollagenase Typ 1 und 1,5 % BSA in einem Kollagenasepuffer (100 mM Hepes, 120 mM NaCl, 50 mM KCl, 1 mM CaCl₂ und 5 mM Glucose in destilliertem Wasser) steril filtriert) gegeben. In dieser wurde die Dermis 30 Minuten lang in Kollagenase/PBS (Endkonzentration 1 mg/ml) im Schüttelwasserbad unter konstantem Schütteln bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Suspension durch ein Sieb gegeben (Porenweite 100 µm), mehrfach mittels Glasstempel bearbeitet und mit PBS nachgespült. Die filtrierte Lösung wurde dann 10 Minuten lang bei 300 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert, auf Zellkultur-Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm verteilt und bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Bei der Isolation wurde in der Suspension vor dem Zentrifugationsschritt eine Zellzahlbestimmung vorgenommen, um die genaue Zelldichte der ausgesäten Zellen festzulegen. (Oplander, Hidding et al. 2011) Zur Zellzahlbestimmung in einer Zellsuspension wurde dieser jeweils ein Volumen von 20 µl entnommen und in ein Mikroreaktionsgefäß (Eppendorf-Reaktionsgefäß) überführt. Hierzu wurde das gleiche Volumen an Trypanblau gegeben und eine ausreichend große Menge nach mehrmaliger Resuspendierung zur Sicherstellung einer gleichmäßigen Zell-Verteilung auf ein Hämocytometer (Neubauer Zählkammer) gegeben.

2.2.1.2 Zellkultivierung

Zellkulturen wurden in einem Inkubator bei 37 °C mit 5 % Kohlenstoffdioxid-Anteil und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % gezüchtet. Sofern nicht anders beschrieben, wurden alle für die Zellkultur verwendeten Flüssigkeiten zuvor im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Ein Mediumwechsel der Zellkulturen fand standardisiert jeden Dienstag und Freitag statt. Hierbei wurde bei allen Fibroblastenkulturen das alte Medium mittels Pasteurpipette abgesaugt und im Anschluss ein der Kulturgefäßgröße entsprechendes Volumen an frischem Medium vorsichtig an den Rand der Zellkultur pipettiert.

Die verwendeten Volumina sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Volumina der verwendeten Kulturgefäße

Kulturgefäß	Volumen des Kulturmediums
Zellkultur-Petrischale (Durchmesser 10cm)	12 ml
T75-Flasche	15 ml
T175-Flasche	35 ml
24-Well-Platte	400 µl pro Well
6-Well-Platte	1 ml pro Well

Fibroblasten wurden in DMEM-Medium mit einem Glucose-Anteil von 1 g/l beziehungsweise 4,5 g/l kultiviert. Zugewetzt wurden 5 ml Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin), 5 ml Glutamin (200 mM) und 50 ml fetales Kälberserum (10%ig). Das Kälberserum wurde vor der Verwendung aufgetaut, im Schüttelwasserbad bei 60 °C 30 Minuten lang hitzeinaktiviert und bis zur endgültigen Verwendung bei -20 °C in Portionen à 50 ml gelagert.

Für die Passagierung von Zellen zur Weiterkultivierung oder den experimentellen Einsatz wurde von diesen unter der Sterilbank das Medium abgesaugt und die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. Nachdem die Salzlösung wieder abgesaugt war, wurde eine bestimmte Menge (s. Tabelle 8) Trypsin/EDTA (Konzentration: 0,05 % / 0,02 % (w/v) in PBS w/o Ca²⁺ w/o Mg²⁺) auf die Zellen gegeben.

Tabelle 8: Verwendete Trypsinmengen zur Zellpassagierung

Zellkulturgefäß	Verwendete Menge Trypsin bzw. FCS
Petrischale (Durchmesser 10 cm)	2,5 ml
T75-Zellkulturflasche	2,5 ml
T175-Zellkulturflasche	5 ml
24-Well-Platte	200 µl pro Well

Mit dem Trypsin wurden die Zellen etwa fünf Minuten lang inkubiert, bis durch lichtmikroskopische Kontrolle festzustellen war, dass sich die Zellen von dem Kulturgefäß gelöst hatten. Das Trypsin wurde nun mit dem gleichen Volumen FCS abgestoppt und in ein Falcon™ überführt. Eine geringe Menge wurde zur Zellzahlbestimmung entnommen, bei ca. 300 g 5 Minuten lang zentrifugiert und anschließend wurde unter sterilen Bedingungen der Überstand über dem Pellet abgesaugt.

2.2.1.3 Kryokonservierung von Zellen

Die Zellen wurden zur Konservierung trypsiniert und anschließend in FCS mit 10 % DMSO resuspendiert. Zur Kühlung wurden die Flüssigkeiten unter der Sterilbank auf Eis gelegt. Abgefüllt wurde in jedes Kryoröhrchen je 1 ml der Zellsuspension, stets entsprechend einer Zellzahl von einer Million Zellen. Die nun gefüllten Kryoröhrchen wurden in speziellen Gefriergefäßen (Nalgene™ Cryo 1 °C Freezing Container) mit etwa 1 K pro Minute auf -80 °C heruntergekühlt gelagert.

Zum Auftauen der Zellsuspension wurde ein 50 ml-Falcon™ mit etwa 35 ml vorgewärmtem Kulturmedium befüllt. Nun wurde die Zellsuspension zügig bis zur Hälfte aufgetaut und in das Falcon™ mit dem vorgewärmten Medium überführt. Es erfolgte eine Zellzahlbestimmung und die Zellen wurden 10 Minuten bei 300 g zentrifugiert, um danach in Kulturmedium resuspendiert zu werden. Am nächsten Tag erfolgte ein Wechsel des Mediums, um Bestandteile toter Zellen zu entfernen.

2.2.2 Haut

2.2.2.1 Handhabung der EpiSkin™-Proben

Die künstlich gezüchtete Haut erreichte das Labor der Klinik für Unfall- und Handchirurgie des UKD einen Tag nach Absendung in Frankreich durch einen Kurierdienst. Verpackt war die EpiSkin in Isolationsmaterial und eingebettet in eine kollagene Matrix. Jeder Lieferung lagen zwei unterschiedliche Medien bei, ein Kulturmedium und ein Assay-Medium. Die Haut befand sich in Plastik-Einsätzen, die genau passend für eine 12-Well-Platte waren. Nach Erhalt der Lieferung wurden die Hautstücke gemäß Herstellerangaben unter der Sterilbank vom Kollagen befreit und bei Raumtemperatur in Kulturmedium überführt (Abb. 6). Eine Liefereinheit der Firma umfasste 12 Stücke EpiSkin, die in je 1 ml Medium auf einer 12-Well-Platte mindestens zwei Stunden bei 37 °C inkubiert wurden, bevor sie entsprechend der validierten Protokolle der Firma am selben Tag für Versuche verwendet wurden. (M.K. Robinsona and M. Ponedc 2002) (Kandarova, Liebsch et al. 2006) (Tornier, Amsellem et al. 2010)

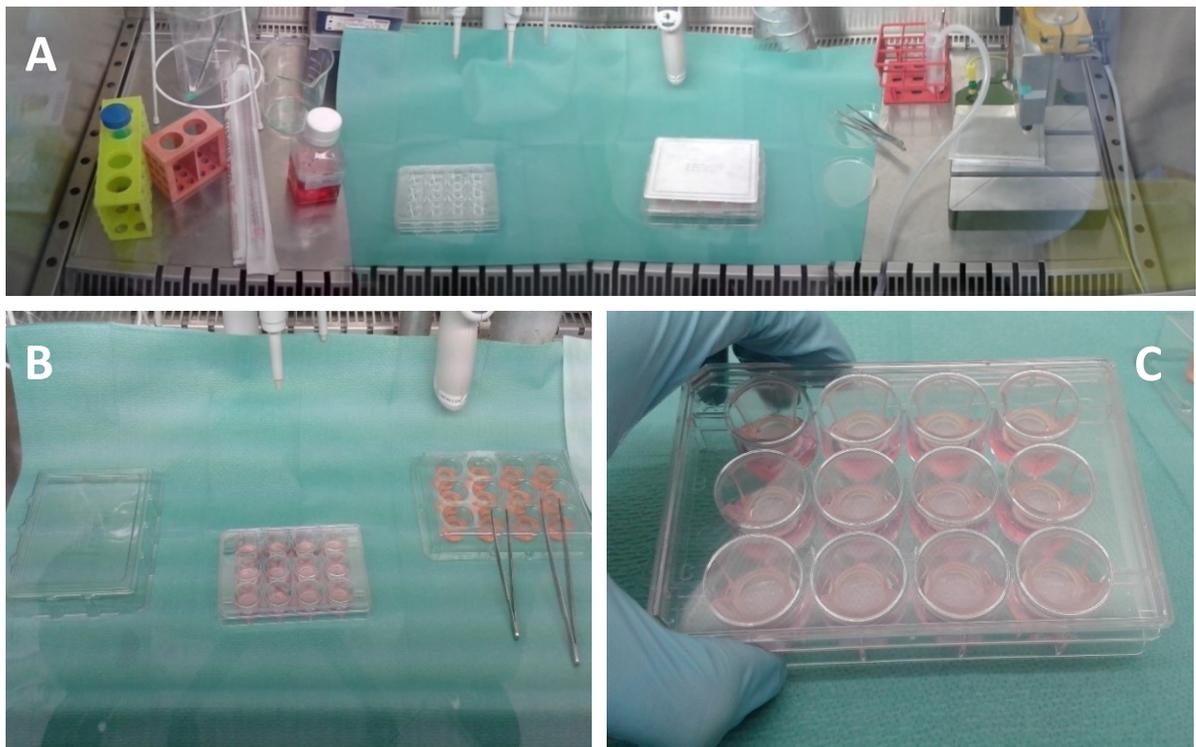


Abbildung 6 **A:** Arbeitsumgebung unter einer Sterilbank für die Arbeit mit Episkin. Gearbeitet wurde stets auf einem sterilen Tuch, um die Kontaminationsgefahr der Proben so gering wie möglich zu halten. **B:** Die Episkin-Stücke wurden unter sterilen Bedingungen von der Kollagenmatrix, in der sie vom Hersteller geliefert wurden, in eine 12-Well-Platte mit Kulturmedium überführt. **C:** Episkin in Kulturmedium.

2.2.2.2 Menschliche Haut

Für Versuche mit Präparaten aus menschlicher Haut wurde diese, um möglichst vergleichbare Proben zu erhalten, mittels einer Biopsie-Stanze mit einem Durchmesser von 8 mm zugeschnitten. Bei Vollhaut wurde auch hier das subkutane Fettgewebe unter der Sterilbank und unter sterilen Kautelen möglichst vollständig entfernt. Die Haut wurde nun in ca. 1 ml Fibroblasten-Medium auf einer 12-Well-Platte bis zum Versuchsbeginn inkubiert. Im Gegensatz zur EpiSkin (fixiert in einem Plastik-Inlay) lagen die Proben unfixiert im Behandlungsmedium.

2.2.3 Assays

2.2.3.1 Behandlungsprotokolle EpiSkin / humane Haut

Haut-Korrosion

Die künstliche Epidermis wurde entsprechend dem Hersteller-Protokoll, welches die Grundlage zur OECD-Richtlinie 431 („*In vitro* Skin Corrosion“) bildet, zum einen drei Minuten und in abgeänderter Form des Protokolls 60 Minuten lang behandelt. Danach wurden die Proben für eine Stunde inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Viabilitätsmessung der Epidermis mittels MTT-Assay. Die durchgeführten Behandlungen wurden jeweils mit unbehandelten Proben verglichen. Zudem wurde eine Positivkontrolle je Versuchsdurchführung mit 40 µl Natronlauge (8 M NaOH) behandelt.

Zum Vergleich wurde der Versuch mit humaner Spenderhaut und einem anderen Farbstoff wiederholt. Da die initialen Versuche zur Viabilität von Zellen zur Etablierung der Behandlungsdauer mit einem Resazurin Assay (Cell-Titer Blue) durchgeführt wurden, wurde nun zum Vergleich eine Versuchsdurchführung mit humaner Spenderhaut getestet, um herauszufinden, ob ein Effekt produzierbar ist.

Haut-Reizung

Zum Nachweis einer möglichen Hautreizung durch DBD wurde das Protokoll der Firma SkinEthics genutzt, das Grundlage für die OECD-Richtlinie 439 („*In vitro* Skin Irritation of Chemicals“) ist. Hierfür wurden die zu bewertenden Proben 15 Minuten lang behandelt. Dies erfolgte mittels Plasma-Generator unter der Sterilbank. Hiernach wurden die Proben 42 Stunden lang im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung mittels Zytotoxizitäts-Assay (MTT) sowie eine Bestimmung der IL-1 α Konzentration im Medium mittels ELISA (S. Kapitel 2.2.3.6 Entzündungsmarker).

Zum Vergleich wurde auch hier ein analoger Versuch mit humaner Spenderhaut durchgeführt. Die Probe wurde analog zum Skin Irritation Protokoll für 15 Minuten mit Plasma behandelt. Die Kontrolle war eine unbehandelte Hautprobe, die während der Plasma-Behandlung der Probe ebenfalls unter der Sterilbank stand, die Positivkontrolle wurde analog mit Natronlauge

behandelt. Die Auswertung erfolgte wie beim Assay nach 42stündiger Inkubation, jedoch auch hier wie bei der humanen Spenderhaut zuvor mit einem Resazurin-Assay.

2.2.3.2 Nachweis radikaler Sauerstoff-Spezies / oxidativer Stress

Dichloro-Dihydro-Fluoresceindiacetate

Zur Quantifizierung von oxidativem Stress erfolgte die Messung mittels Dichloro-Dihydro-Fluorescein-Diacetat (DCH2FDA). Hierbei handelt es sich um den Farbstoff Dichloro-Dihydro-Fluorescein mit einer zusätzlichen Diacetat-Gruppe. Wenn dieser Farbstoff oxidativem Stress, insbesondere durch H₂O₂ ausgesetzt wird, findet eine Oxidation desselben Farbstoffes statt, bei dem die Diacetat-Gruppe des Stoffes abgespalten wird und sich die Absorptions- und Emissionsspektren ändern. Im oxidierten Zustand liegt das Absorptionsspektrum bei 504 nm und das Emissionsspektrum bei 529 nm. Für die Untersuchung des oxidativen Stresses durch die Plasmabehandlung wurden 80.000 Zellen pro Well einer 24-Well-Platte ausgesät. Am Folgetag wurde nach lichtmikroskopischer Kontrolle eine Inkubation mit 400 µl 1 µM Dichloro-Dihydro-Fluorescein-Diacetat 30 Minuten lang im Inkubator vorgenommen. Für jede Versuchsdurchführung wurde ein Ansatz mit unbehandelten Zellen, mit DBD behandelten Zellen, unbehandelten Zellen mit DCH2FDA, mit DBD behandelten Zellen mit DCH2FDA, Zellen mit H₂O₂ und Zellen mit H₂O₂ und DCH2FDA gewählt. Die Plasmabehandlung der Zellen erfolgte eine Minute lang in 200 µl PBS. Zur Auswertung wurden die Zellen in Isopropanol mit 1 % Triton lysiert und es erfolgte die unmittelbare spektrometrische Absorptions-Messung im Multiplattenlesegerät (VICTOR 3™) bei 490 nm.

2.2.3.3 Viabilitäts-Testung

Resazurin – “CellTiter Blue”

Der Farbstoff Resazurin (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide) wird unter Aufwendung von NADH zu Resorufin reduziert. Die Absorptions-/Emissionsmaxima von Resazurin liegen bei ~575/585 nm. Verwendet wurde der „CellTiter-Blue Reagent“ der Firma Promega. Dieser wurde im Verhältnis 1:20 mit Medium verdünnt. Anschließend erfolgte eine Inkubation der zu untersuchenden Zellkultur mit dem Farbstoff-Medium-Gemisch für 45 bis 60 Minuten bei

37 °C und 5 % CO₂. Danach erfolgte die Auswertung im Multiplattenlesegerät (VICTOR 3™) bei den o.g. Wellenlängen. Wenn nicht anders erwähnt, wurden für ein Well einer 24-Well-Platte 400 µl der Farblösung verwendet.

Neutralrot

Neutralrot ist ein Phenazin-Farbstoff, der bei nicht saurem pH-Wert membrangängig ist und sich daher in sauren Kompartimenten einer Zelle ansammelt. Durch diesen Umstand kann Neutralrot auch als Zell-Viabilitätsassay verwendet werden, da die Auskristallisierung des Farbstoffs nur in vitalen Zellen mit Kompartimentierung erfolgen kann. Neutralrot ist im Gegensatz zu anderen Farbstoffen nicht abhängig von der Atmungskette der Zelle. (FINTER 1969) Für den Test wurde eine Neutralrot-Inkubationslösung mit 10 mM HEPES und 50 µg/ml Neutralrot- Lösung (0,4 % in dH₂O) in Zellkulturmedium verwendet, verwendete Menge pro Well: 400 µl. Hiermit wurden die Zellen 1,5 h lang bei 37 °C inkubiert. Danach wurde der Überstand verworfen und 300 µl Fixierlösung (1 % Formaldehyd und 1 % Essigsäure) hinzugegeben und sofort wieder abgesaugt. Nach einmaligem Waschen mit 400 µl PBS wurden 200 µl Extraktionslösung (50 % Ethanol, 1 % Essigsäure) hinzugegeben und die für die Versuche verwendeten 24-Well-Platten für ca. 30 min auf einer Schüttelplatte geschüttelt, bevor eine Messung bei 550 nm vorgenommen wurde.

Fluorescein-Diacetat

Zur fluoreszenzmikroskopischen Bestimmung vitaler Zellen wurde der Farbstoff Fluorescein-Diacetat verwendet. Dieser Farbstoff wird nach Diffusion in eine Zelle durch Esterasen hydrolysiert und kann daraufhin die Zellmembran nicht mehr passieren. Folglich ist er nun in seiner fluoreszierenden Form in der Zelle gefangen. Die Voraussetzungen, dass dies geschieht, sind sowohl eine enzymatisch aktive (vitale) Zelle als auch eine intakte Zell-Membran. Dieser Farbstoff eignet sich also zur Anfärbung vitaler und intakter Zellen. Für die durchgeführten Versuche wurden die anzufärbenden Zellen mit 0,05 mg/ml für fünf Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und anschließend ausgewertet. (Aon et al. 2003)

Hoechst 33342

Hoechst 33342 ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der frei durch Zell-Membranen und Nucleus-Membranen diffundiert und selektiv an die DNA von sowohl vitalen als auch avitalen Zellen bindet. Im gebundenen Zustand liegt das Absorptions- bzw. Emissionsspektrum bei ~350 bzw. 461 nm. Für die Anfärbung wurden die Zellen bei einer Konzentration von 8 µg/ml 5 min lang bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. (Opländer 2009)

2.2.3.4 Toxizitätsnachweis

Propidiumiodid

Propidiumiodid ist ein Farbstoff, der aus vitalen Zellen aktiv ausgeschleust wird. Geschieht dies nicht, bindet er unspezifisch an Sequenzen von 4–5 Basenpaaren der DNA. Er färbt folglich nur avitale Zellen an, die den Farbstoff nicht mehr aus der Zelle befördern können. Zur Anfärbung wurden die Kulturen mit 0,5 µg/ml für 5 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. (Opländer 2009)

Apoptosenachweis mittels Westernblot

Ein Nachweis von apoptotischen Ereignissen in plasmabehandelten Zellen wurde mittels Westernblot zum Nachweis von PARP1 als Apoptosemarker durchgeführt unter Verwendung von Staurosporin als Positivkontrolle. Die Auswertung der Proben erfolgte 6 Stunden nach der gewählten Behandlung zur Peak-Zeit (TERRI SUNDQUIST m.s. 2006) des PARP. Zur Auswertung wurde der Marker auf das *housekeeping gene* α -Tubulin normiert.

Das für den Westernblot verwendete Protokoll ist dem ursprünglichen *semi dry* Westernblot-Protokoll von Laemmli nachempfunden. (Laemmli 1970)

Für den im Labor der Unfall- und Handchirurgie des UKD etablierten Westernblot wurden verschiedene Puffer benötigt, die sich wie in Tabelle 9 dargestellt zusammensetzten:

Tabelle 9: Für Westernblot verwendete Materialien

4 x Trenngelpuffer	1,5 M Tris und 0,4 % SDS in destilliertem Wasser
4 x Sammelgelpuffer	0,5 M Tris und 0,4 % SDS in destilliertem Wasser
Laufpuffer (Elphopuffer)	25 mM Tris, 192 mM Glycin sowie 0,1 % SDS in destilliertem Wasser
Tris-Glycine Transferpuffer	12 mM Tris-Base und 96 mM Glycin in destilliertem Wasser
Blotting-Puffer (2 x Tris-Glycine Transferpuffer)	Transferpuffer, Methanol und destilliertes Wasser im Verhältnis 1:1, 25:12,5
Ponceau S	0,1 % Ponceau in 3%iger Trichloressigsäure
TBS	7,7 mM Tris (pH 7,5) und 150 mM NaCl in destilliertem Wasser
4 x Tris-Glycine SDS Sample Puffer (4 x Laemmli-Puffer)	252 mM Tris-HCl, 40 % Glycerol, 8 % SDS und 0,01 % Bromphenolblau in destilliertem Wasser
RIPA-Puffer (Nach Abcam)	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 % NP-40 0,5 % Na-deoxycholat und 0,1 % SDS
RIPA+Complete	10 ml RIPA und 1 Tbl Complete, Mini

Proteinisolation

Für einen Westernblot mussten zuerst die dafür vorgesehenen Zellen lysiert werden, damit deren Proteine frei vorlagen. Hierzu wurden die Zellen in RIPA+Complete gelöst (Mengen abhängig von der zur Verfügung stehenden Zellzahl) und mittels Sonifizierung (10 Stöße à 1 s bei 30 kHz) aufgeschlossen.

Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Proteinbestimmung musste zuerst ein BSA-Standard zur Bestimmung einer Referenzkurve ermittelt werden. Dieser wurde durch Verdünnung des hier genutzten Kits der Firma BioRad hergestellt. Dazu wurde gemäß Herstellerangaben die benötigte Menge Working Reagent (WR) durch Mischung der zwei Reagenzien A+B im Verhältnis 50:1 angesetzt. Pro 10 µl des Standards bzw. der zu bestimmenden Probe wurden 200 µl WR genutzt und in je einem Well einer 96-Well-Platte gemischt. Nach 30minütiger Inkubation bei 37 °C wurde, nachdem die Platte auf Raumtemperatur abgekühlt war, die Absorption bei 562 nm gemessen. Mittels des angesetzten Standards wurde auf die Konzentration der jeweiligen Probe geschlossen. Hiernach konnten diese auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt werden.

Gießen der Gele

Zur Vorbereitung mussten die Gelgießapparaturen mit 70%igem Ethanol gereinigt werden, um eventuell vorhandene Proteinrückstände zu entfernen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Westernblot zum Nachweis von PARP1 als Apoptosemarker verwendet. Da das Molekulargewicht dieses Proteins in der ungetrennten Form 116 kDa und 89 kDa nach Spaltung beträgt, wurde mit einem 10%igen Gel gearbeitet. Hierfür wurden 2,5 ml Acrylamid (30 %) mit 3,125 ml destilliertem Wasser gemischt. Zusätzlich wurden zu dem Ansatz 0,875 ml vierfacher Trenngelpuffer, 10 µl TEMED sowie 25 µl 10%iges APS zugefügt. Nach Zugabe des APS wurde der Ansatz kurz geschwenkt, um die Komponenten zu vermischen, und direkt in die vorbereiteten Formen überführt. Danach wurden diese mit 70%igem Ethanol übergossen, um einen luftdichten Abschluss zu gewährleisten. Nach etwa 10 bis 15 Minuten war die Polymerisation abgeschlossen und das Sammelgel konnte aus 650 µl 30 % Acrylamid, 3 ml H₂O, 1,25 ml 4 x Sammelgelpuffer, 10 µl TEMED und 25 µl 10 % APS pro Gel angesetzt werden. Dieses wurde in die Kammern der Gelformen gefüllt und mit dem entsprechenden Kamm verschlossen. Nach ca. zehn Minuten waren die Gele auspolymerisiert und konnten für einen Westernblot genutzt werden.

SDS-PAGE

Zur Durchführung der SDS-Page wurden die zu bestimmenden Proben zuerst im Verhältnis 1:4 (Proben:Puffer) mit Laemmli-Puffer versetzt und fünf Minuten lang auf 95 °C erhitzt. Als nächstes wurde die Laufkammer für den Blot entsprechend den Herstellerangaben mit Laufpuffer aufgefüllt. Bei einer Spannung von 60 V wurde solange gewartet, bis die Proteine durch das Sammelgel gewandert waren. Hiernach wurde die Spannung solange auf 110-130 V erhöht, bis der verwendete Marker anfang, aus der Unterseite des Gels auszulaufen.

Transfer („Blotting“)

Für den Transfer wurden die Gele aus der Glasform entfernt, das Sammelgel wurde verworfen und das Trenngel kurz in eine Kunststoffschale mit Blotting-Puffer gelegt, um zu äquilibrieren. Hiernach wurden Nitrocellulose-Membranen und Blottingpapier mit Blottingpuffer befeuchtet.

Mittels einer Rolle wurden vorhandene Luftblasen entfernt. Für den Transfer erfolgte eine Schichtung, die Abbildung 7 zeigt.

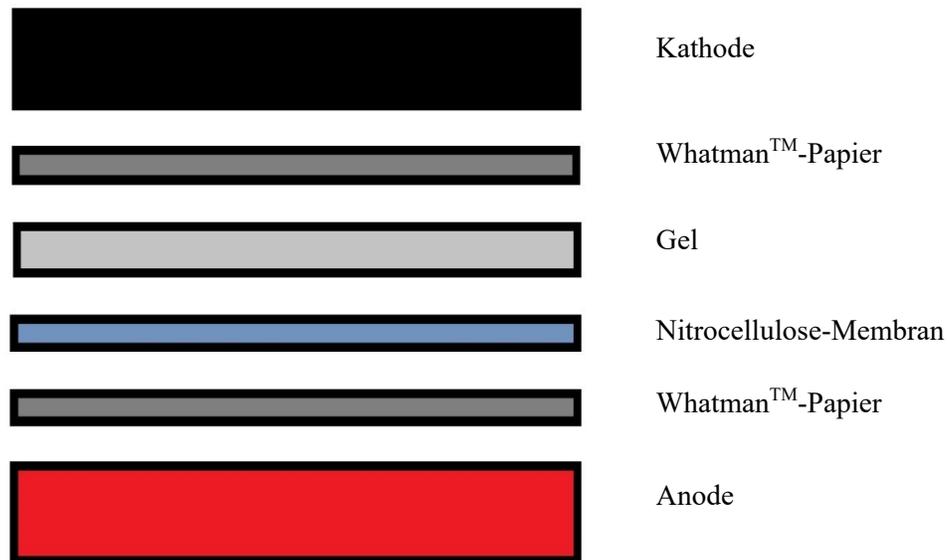


Abbildung 7: Aufbau der Blotting-Apparatur für den Westernblot, schematisch

Der Transfer erfolgte gemäß Herstellerangaben bei 23 V für etwa 2 bis 2,5 Stunden. Nach dem Transfer konnte die Nitrozellulose-Membran mittels Ponceau S-Färbung kontrolliert werden. Hierfür wurde die Membran in eine Plastikschiene mit der Färbelösung gegossen. Nach Kontrolle der Banden wurde die Membran durch Waschen mit Wasser und danach mit TBS/0,1 % Tween 20 entfärbt.

Antikörpermarkierung

Um die nun entfärbte Membran zu markieren, wurde diese zuerst eine Stunde lang bei Raumtemperatur mit TBS / 0,1 % Tween 20 (TBS/T) und 5 % Milchpulver oder 5 % BSA abhängig vom verwendeten Antikörper (oder über Nacht bei 4 °C) auf dem Taumelroller in einem Falcon™-Gefäß geblockt. Nach der Stunde (oder am nächsten Tag) erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in TBS / 0,1 % Tween 20 (TBS/T) mit BSA oder 1–5 % Milchpulver, abhängig vom verwendeten Antikörper für zwei Stunden bei Raumtemperatur

(oder über Nacht bei 4 °C). Nach der Inkubation wurde die Membran dreimal für fünf Minuten mit TBS/T (Waschpuffer) im Falcon™-Röhrchen auf dem Taumelroller gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper in TBS/T für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln auf dem Taumelroller. Nach erneutem dreimaligem Waschen für je fünf Minuten mit Waschpuffer im Dunkeln erfolgte die Detektion der gefärbten Banden mit dem im Labor zur Verfügung stehenden ChemiDoc™ MP-System. Das im Rahmen der hier durchgeführten Westernblots als *housekeeping gene* gewählte Protein ist bei allen durchgeführten Westernblots α -Tubulin mit einer Größe von 50 kDa.

TUNEL

Das TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling) Assay dient zur Identifikation von DNS-Doppelstrangbrüchen und ermöglicht so eine quantitative Bestimmung des apoptotischen Potentials einer Behandlung an einer vitalen Probe. (Gavrieli et al. 1992) Der Assay wurde an Paraffinschnitten durchgeführt. Hierfür wurden die Proben mittels Gewebeeinbettautomat in einer Alkohol-, Xylol- und Paraffin-Reihe paraffiniert. Der Vorgang selbst läuft automatisch ab, die gewählten Einwirkzeiten finden sich in Tabelle 10.

Tabelle 10: Fixieren und Einbetten der Proben (TUNEL-Assay)

Position	Wirkstoff	Dauer (h)
1	Formalin	2
2	Formalin	2
3	Alkohol 70 %	1
4	Alkohol 90 %	1
5	Alkohol 100 %	1
6	Alkohol 100 %	2
7	Alkohol 100 %	2
8	Xylol	1
9	Xylol	1,5
10	Xylol	1,5
11	Wachs	2
12	Wachs	3

Als Nächstes wurden die Schnitte in Wachs eingebettet und mittels Mikrotom zugeschnitten, um als 3-5µm dicke Schnitte mittels Wasserbad auf Glasobjektträger aufgezogen zu werden.

Zur Deparaffinierung wurden die Objektträger zunächst für 5 Minuten bei 100 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Behandlung in Xylol, Ethanol, NaCl und PBS bei Raumtemperatur über die jeweiligen Zeiten und Konzentrationen, die in Tabelle 11 zu finden sind.

Tabelle 11: Deparaffinierung der Proben (TUNEL-Assay)

Position	Wirkstoff	Dauer (min)
1	Xylol	5
2	Xylol	5
3	Ethanol 100%	5
4	Ethanol 100%	3
5	Ethanol 95%	3
6	Ethanol 85%	3
7	Ethanol 70%	3
8	Ethanol 50%	3
9	NaCl 0,85%	5
10	PBS	5

Als Nächstes erfolgte die Fixierung der Proben bei Raumtemperatur für 15 Minuten in 4%iger Formaldehydlösung (gepuffert in methanolfreiem PBS). Anschließend wurden die Proben zweimal fünf Minuten lang bei Raumtemperatur in PBS gewaschen.

Nun wurde Proteinase K-Stocklösung angesetzt: 10 mg Proteinase K wurden in 1 ml Pufferlösung gelöst (100 mM Tris-HCl (pH 8.0) + 50 mM EDTA). Die Ausgangslösung wurde im nächsten Schritt auf eine Konzentration von 20 µg/ml mit PBS verdünnt. Von der verdünnten Lösung wurden 100 µl auf jede Probe gegeben und es erfolgte acht bis zehn Minuten lang eine Inkubation bei Raumtemperatur. Danach wurden die Proben einmal für fünf Minuten bei Raumtemperatur mit PBS gewaschen und anschließend mit 4%igem Formaldehyd fünf Minuten lang nachfixiert. Anschließend wurde erneut fünf Minuten lang mit PBS gewaschen. Als Positivkontrolle wurden nun 100 µl DNase-Puffer auf einen Schnitt gegeben und fünf Minuten inkubiert. Anschließend wurde der Puffer entfernt und durch zehn Einheiten

DNase in 100 µl DNase-Puffer ersetzt. Nach zehn Minuten wurde der Schnitt viermal mit destilliertem Wasser gewaschen. Nun wurden alle Schnitte gleich weiter behandelt, im folgenden Schritt wurden 100 µl Äquilibriumspuffer für zehn Minuten auf die Schnitte gegeben. Im Anschluss wurde dieser durch 50 µl Inkubationspuffer (45 µl Äquilibriumspuffer, 5 µl Nucleotiden-Mix und 1µl eTdT-Enzym) ersetzt. Für eine Negativkontrolle wurde der gleiche Inkubationspuffer verwendet, jedoch mit einem Microliter destilliertem Wasser. Dieser Schritt wurde im Dunkeln durchgeführt. Anschließend wurden die Schnitte mit Plastik-Deckgläsern abgedeckt und für 60 Minuten bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nun wurde SSC-Puffer angesetzt. Hierfür wurde die 20fach konzentrierte Stocklösung des Kits mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnt. Der nun zweifach konzentrierte Puffer wurde in einen Coplin-Färbetrog gefüllt. Nun wurden die Deckplättchen der Proben entfernt und die Proben für 15 Minuten in dem SSC bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben dreimal mit PBS gewaschen. Zuletzt wurden die Proben mit Vectashield-Einbettungsmedium und DAPI eingebettet und in einer Dunkelkammer mittels Fluoreszenzmikroskop mikroskopiert.

2.2.3.5 Apoptose-Nachweis

MTT

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) ist ein leicht gelblicher wasserlöslicher Farbstoff (ein Tetrazoliumsalz), der in Mitochondrien, vermittelt über die Succinat-Dehydrogenase und auch in anderen Zellkompartimenten durch Mitbeteiligung von NADH/NADPH, in ein wasserunlösliches violettes Salz (ein Formazan) umgewandelt wird. Auf diese Weise gibt der Farbstoff Auskunft über das Reduktionspotenzial einer Zelle beziehungsweise deren Vitalität. (Mosmann 1983) (Berridge and Tan 1993)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit dem Farbstoff ein Vitalitätstest sowohl an Episkin als auch an Fibroblastenkulturen durchgeführt. Für Episkin wurden gemäß den Herstellerangaben der Firma SkinEthics die Hautstücke nach der Behandlung in einer MTT-Lösung mit einer Endkonzentration von 1 mg/ml in "Maintainance medium" (geliefert durch SkinEthics zusammen mit den Gewebeproben) für drei Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Bevor der Farbstoff in Isopropanol mit 1 % HCl über Nacht bei 4 °C rückgelöst wurde, wurden

Rückstände des nicht umgewandelten Farbstoffes an dem Hautpräparat gründlich mit PBS abgespült. Am nächsten Tag wurde mittels Vortexmixer sichergestellt, dass sich der Farbstoff gleichmäßig verteilt hatte und darauf geachtet, dass die Hautpräparate sich vollständig entfärbt hatten. Nun erfolgte die Untersuchung im Multiplattenlesegerät (VICTOR 3™), bei der die Absorption bei 570 nm gemessen wurde. Für Fibroblasten wurde eine MTT-Lösung mit derselben Endkonzentration in Fibroblastenkulturmedium verwendet. Die Inkubation erfolgte über drei Stunden im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂. Der Farbstoff wurde im nächsten Schritt in Isopropanol ebenfalls über 1,5 Stunden ausgewaschen und die Absorption wurde im Multiplattenlesegerät (VICTOR 3™) bei 570 nm gemessen.

2.2.3.6 Entzündungsmarker

IL-1 α ELISA

Vorgegangen wurde nach dem Datenblatt des Herstellers (R&D Systems). Begonnen wurde mit dem Ansatz der Reagenzien. Hierfür wurde gewartet, bis alle Reagenzien sich auf Raumtemperatur erwärmt hatten und danach entsprechend der Anleitung verdünnt. Im nächsten Schritt wurden 100 μ l der Arbeitskonzentration des Fängerantikörpers in jedes Well einer 96-Well-Platte gegeben, diese mit Frischhaltefolie versiegelt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am Folgetag wurde der Flüssigkeitsüberstand aspiriert und jedes Well dreimal mit 400 μ l Waschpuffer gewaschen. Um den letzten Flüssigkeitsüberstand zu entfernen, wurde die Platte nun umgedreht und vorsichtig auf Cellulose-Papier geklopft. Als Nächstes wurden 300 μ l Reagent-Diluent in jedes Well gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach wurde der letzte Überstand wie bereits der Wasch-Puffer entfernt. Nun wurden in jedes vorbereitete Well 100 μ l Probe oder normierter Standard der Verdünnungsreihe (Konzentrationen: 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,3 pg/ml, 15,6 pg/ml, 7,81 pg/ml) gegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben erneut wie vor der Probenzugabe gewaschen. Als Nächstes wurden pro Well 100 μ l Working-Solution hinzugegeben und die Proben für 20 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Die Inkubation wurde mit 50 μ l Stop-Solution pro Well gestoppt. Nun wurden die Platten im Multiplattenlesegerät (VICTOR 3™) ausgelesen. (Tornier, Amsellem et al. 2010) (Kandarova, Liebsch et al. 2006)

2.2.4 Plasmabehandlung

Alle Plasmabehandlungen in dieser Arbeit wurden mit den von der Ruhr-Universität Bochum bestimmten Konfigurationen 14 kV und 120 Hz (Trigger-Frequenz) unter einer Sterilbank bei Raumluft durchgeführt. Trotz verschiedener Behandlungsparameter, die anfangs nötig waren, um optimale Behandlungsparameter zu finden, musste der Abstand von Plasmasonde zu Probe stets niedrig gehalten werden, um zu gewährleisten, dass es zu elektrischen Entladungen im Feld der Plasmasonde kommt. Hierfür wurde bei jeder Behandlung ein Abstand von etwa 1 mm zwischen Plasmasonde und Behandlungsmedium bzw. Probe gewählt. Unter den Proben befand sich eine geerdete Metallplatte, durch die der gesamte Boden der Wellplatte Kontakt zur Erdung hatte. Nach einer Reihe von Etablierungsversuchen zeigte sich, dass ein Behandlungsvolumen, bei dem es zu keiner Zellschädigung durch Austrocknungseffekte kommt, bei etwa 225 µl liegt und eine Behandlungszeit von etwa fünf Minuten dennoch einen toxischen Effekt auf die Zellen hat. Die validierten Behandlungsprotokolle der Firma SkinEthics sind für Flüssigkeiten ausgelegt. Die entsprechenden Protokolle wurden im Rahmen dieser Arbeit so angeglichen, dass die Zeit, in der Plasma über den Proben erzeugt wurde, der vorgesehenen Einwirkzeit flüssiger Testsubstanzen entsprach.

Nekrotisierende Wirkung von DBD – Haut-Korrosion

Dieser Assay dient dazu, irreversiblen Schaden an der Haut nachzuweisen. Hierfür wurden Proben über fünf Minuten mit DBD behandelt. Nach der Behandlungszeit wurden die Proben direkt mit 300 µl MTT Färbelösung (1 mg/ml) für drei Stunden inkubiert. Danach wurden die Proben bei Raumtemperatur zwei Stunden in 1,5 ml Isopropanol entfärbt und die optische Dichte des Alkohols bei 570 nm mittels Photometer bestimmt. Um eine qualitative Aussage darüber zu treffen, ob ein Stoff als korrosiv gilt, wird die optische Dichte einer behandelten Probe in Relation zur Negativkontrolle gesetzt. Sie gilt als korrosiv, sollte die Viabilität nach dreiminütiger Behandlung um mehr als 50 % vermindert sein. Die Viabilität wird analog zum Protokoll der Firma SkinEthics mittels MTT Assay überprüft.

Reizende Wirkung von DBD – „Skin-Irritation“

Dieser Test soll zeigen, ob ein Stoff in der Lage ist, irritativ auf menschliche Haut zu wirken. Hierfür wurden die EpiSkin-Proben 15 Minuten lang mit DBD behandelt und danach für 42 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation erfolgte analog zum Skin Corrosion Assay eine MTT-Färbung und es wurde die IL-1 α Konzentration im Inkubationsmedium bestimmt.

Behandlungsprotokolle für humane Haut (analog zur Behandlung von EpiSkin)

Um zu überprüfen, ob generell die Möglichkeit besteht, den Versuch analog mit chirurgisch gewonnenen Proben aus humaner Haut durchzuführen, wurde eine Behandlung analog zur Behandlung von EpiSkin mit Spalthaut (0,7 mm) durchgeführt. Hierfür wurden im ersten Schritt aus dieser Spalthaut Stanzen mit einem Durchmesser von 8 mm gewonnen. Diese wurden in Kulturmedium für ca. 24 Stunden im Inkubator gelagert.

Zur Behandlung wurden die Hautbiopsien in Zweier-Paaren in PBS (1 ml) in eine 12-Well-Platte überführt. Es erfolgte die Behandlung von einer der beiden Biopsien eine Stunde lang mit DBD. Hiernach wurden die Hautbiopsien in eine Resazurin-Assay-Lösung überführt (Lösungsvolumen: 1 ml) und für drei Stunden im Inkubator kultiviert. Als Positivkontrolle wurde eine Biopsie für eine Stunde in 8 M NaOH-Lösung inkubiert und im Anschluss ebenfalls für drei Stunden mittels Resazurin-Assay ausgewertet. Es erfolgte die Messung der Resazurin-Proben im Multiplattenlesegerät (VICTOR 3™) nach den o.g. Spezifikationen für das CellTiter Blue Assay.

Behandlung von Zellen in Kultur

Zur Behandlung wurden Zellen in der Größenordnung 80.000 Zellen pro Well einer 24-Well-Platte ausgesät, sofern nicht anders beschrieben. Nach Erreichen der Adhärenz (etwa einer Stunde) der Zellen wurden diese mit 250 μ l PBS gewaschen und nach Zugabe von 250 μ l PBS in diesem Volumen behandelt.

Einfluss von Plasmabehandlung auf das verwendete Resazurin-Assay

Um festzustellen ob die Plasmabehandlung Einfluss auf die Stoffwechselaktivität der Zellen und damit auf die Farbstoffumsetzung hat, wurde mittels Neubauer-Zählkammer die Zellzahl der jeweiligen behandelten Zellen bestimmt und das gemessene Resazurin-Signal durch die Zellzahl geteilt, um so einen Rückschluss auf die Stoffwechselaktivität pro Zelle zu erhalten. Der so ermittelte Wert (Signalintensität/Zelle) wurde mit dem von unbehandelten Kulturen verglichen, welcher auf die gleiche Weise ermittelt wurde, jedoch ohne die vorherige Plasmabehandlung der Zellkultur.

Intrazellulärer oxidativer Stress

Zur Bestimmung, ob Plasma zu intrazellulärem oxidativem Stress führt, wurden Fibroblasten mit DCH₂FDA inkubiert. Um sicherzustellen, dass die hierbei entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies auch an den Zellen am Boden eines Wells ankommen, wurde die Kultur nach Inkubation und vor der fünfminütigen Plasmabehandlung mit PBS gewaschen. Nach der Behandlung wurden die Zellen lysiert. Die so erhaltene Suspension wurde spektrometrisch ausgewertet (Absorption bei 490 nm).

2.2.5 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde das Programm Prism 5 der Firma Graphpad eingesetzt. Zur Überprüfung auf Normalverteilung wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test verwendet. In Abhängigkeit von der Verteilung wurde der unter der jeweiligen Auswertung genannte Test auf Signifikanz durchgeführt. Die jeweilig verwendeten Tests finden sich in der Beschriftung der Auswertungen.

3 Ergebnisse

3.1 Physikalische Effekte / Grundlegende physikalische Wirkungen

3.1.1 Austrocknung bei Behandlung einer Zellkultur

Bei Etablierungsversuchen zur Behandlung von Zellkulturen fiel auf, dass Volumina unterhalb eines bestimmten Wertes dazu führten, dass relativ unabhängig von der Behandlungszeit ein kreisförmiges Areal in der Mitte der Well-Platte nach der Behandlung plötzlich keinen Flüssigkeitsüberstand mehr aufwies. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist bereits in der Literatur beschrieben: Plasma verändert die Oberflächenspannung und dadurch den Kontaktwinkel von Flüssigkeiten in einem Gefäß. (Alisoy and Koseoglu 2013)



Abbildung 8: Well-Platte mit eingefärbtem PBS. Mittig zeigt sich nach Plasmabehandlung ein trockener Bereich.

Abbildung 8 zeigt exemplarisch den Effekt bei Plasmabehandlung von gefärbter PBS-Lösung. Sobald der Versuch mit einer Zellkultur durchgeführt wurde, zeigte eine FDA bzw. PI Färbung eine Toxizität, welche sich mit dem ausgetrockneten Areal deckt. Abbildung 9 zeigt die Viabilitäts-Färbungen nach Plasmabehandlung unter verschiedenen Volumina. Die zentrale Toxizität in der FDA-Färbung bei 200 μ l entspricht einer Fläche innerhalb des Wells, die nach der Behandlung nicht mehr von Flüssigkeit bedeckt ist.

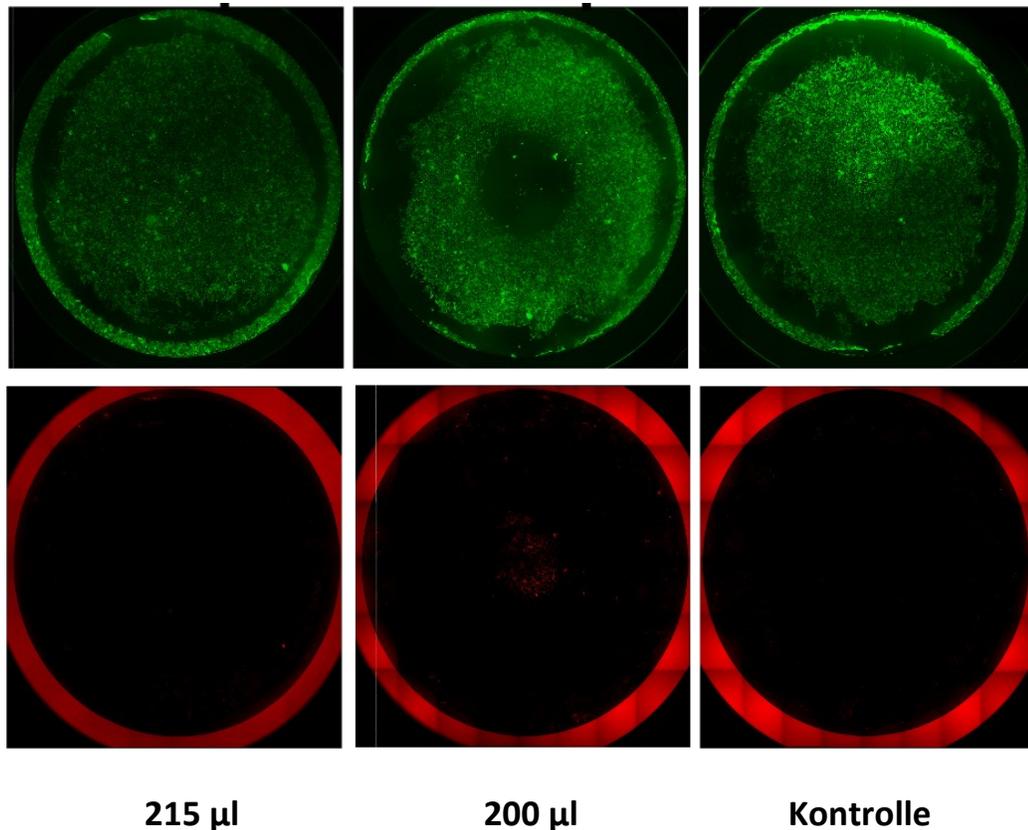


Abbildung 9: Übersichtsbilder von den Böden der Wells einer 24-Well-Platte nach einminütiger Plasmabehandlung unter einem PBS-Volumen von 215 µl oder 200 µl bzw. ohne Plasmabehandlung. Gefärbt wurde mit FDA (oben) und PI (unten).

Ab einem Grenzwert von 215 µl trat dieses Phänomen nicht mehr auf. Daher wurde als sicheres Behandlungsvolumen 250 µl in einer 24-Well-Platte gewählt, da in diesem Volumen auch die anderen im Folgenden aufgeführten physikalischen Effekte minimiert werden konnten.

3.1.2 Plasma-induzierte pH-Wert-Änderung

Hierfür wurden verschiedene Volumina (1000 µl, 500 µl, 250 µl, 100 µl) des verwendeten Behandlungsmediums (PBS) über unterschiedliche Zeiten (0/30/60/120/300/600 s) mit Plasma behandelt. Es zeigt sich, dass lediglich bei 100 µl die Pufferkapazität des Mediums erschöpft ist und es zum pH-Wert-Abfall kommt (vgl. Abb. 10).

Ähnliches kann auf der Oberfläche menschlicher Haut bei direkter DBD-Behandlung beobachtet werden. Hier zeigt sich ein Abfall des Oberflächen-pH-Wertes auf einen Wert von ca. 2 (vgl. Abb. 11). Wie außerdem gezeigt werden konnte, verhält sich der gemessene pH-

Wert antiproportional zur gemessenen Nitrit- und Nitratkonzentration (NOD) (vgl. Abb. 12).
(Balzer, Heuer et al. 2015)

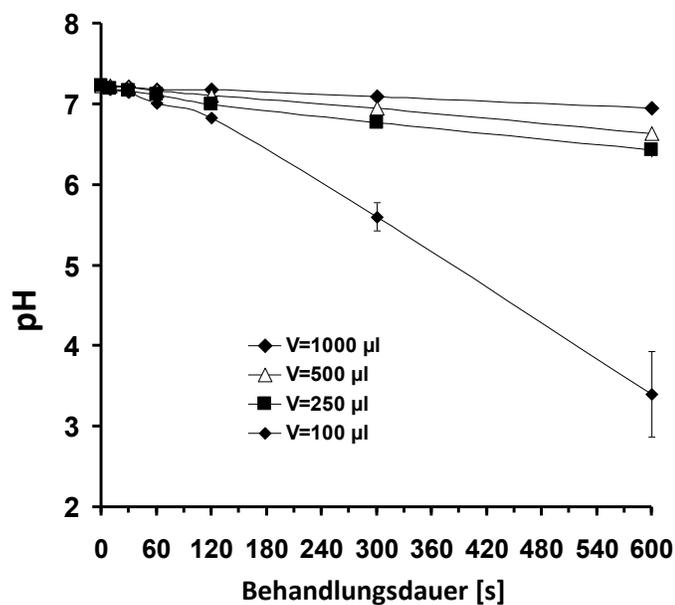


Abbildung 10: Plasmabehandlung mit verschiedenen Volumina und verschiedenen Behandlungszeiten (0-600 s). Es zeigt sich lediglich bei 100 µl ein signifikanter Abfall des pH-Wertes ($n=8$, $p < 0,05$, T-Test).

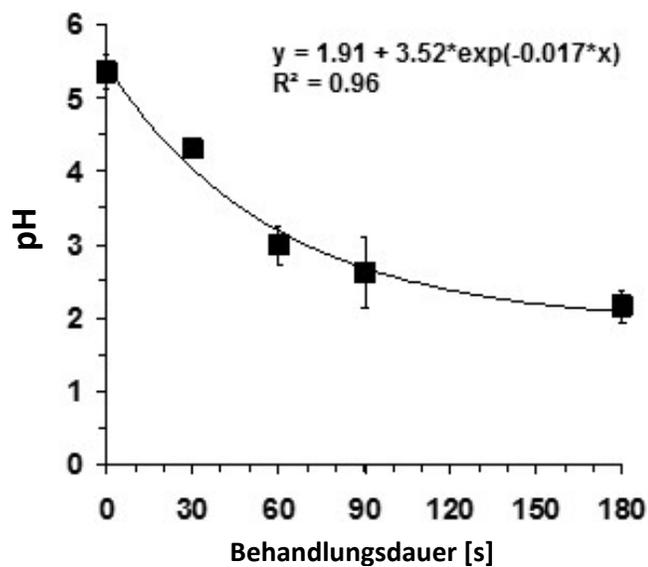


Abbildung 11: Haut-pH-Wert bei Plasma-Behandlung. Änderung des Oberflächen-pH-Wertes einer Hautprobe bei Plasmabehandlung ($n=3-5$).

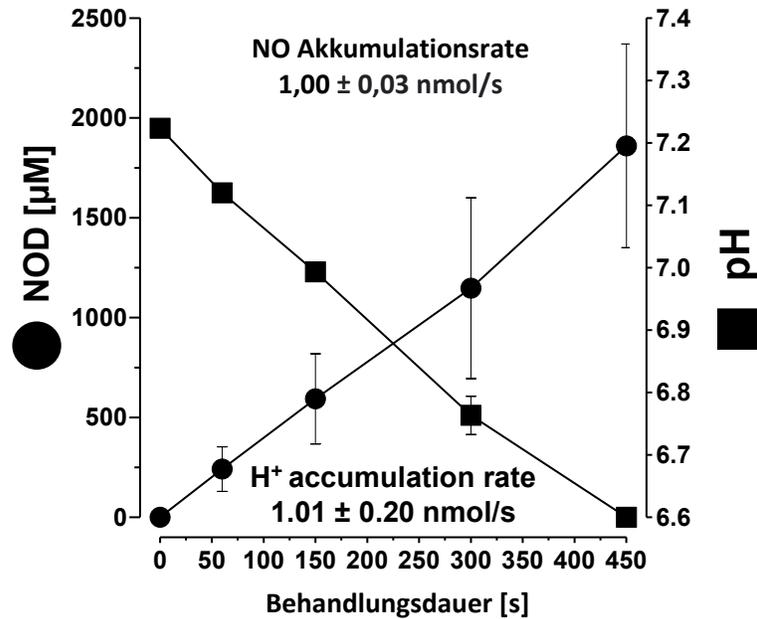
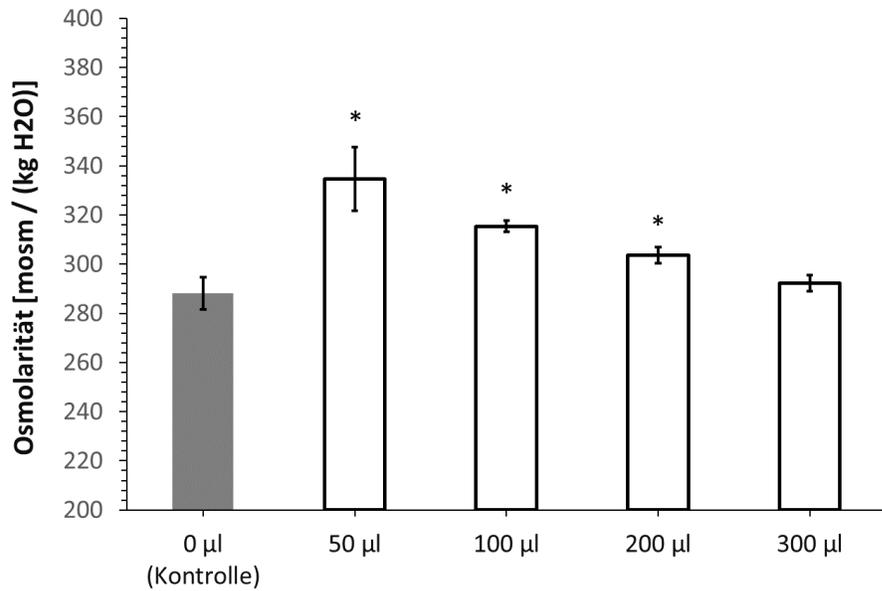


Abbildung 12: Menge der NOD (Nitrit und Nitrat) sowie der pH-Wert nach Plasma-Behandlung der angegebenen Dauer. Gezeigt werden die Mittelwerte sowie die SD (n=6).

3.1.3 Osmolarität

Ein weiterer Faktor, der Einfluss auf die Viabilität und Proliferation von Zellen hat, ist die Osmolarität des extrazellulären Mediums. (Wayne Zundel 1998, Schwering 2016) Da der Einfluss dieser Faktoren nicht primär im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden sollte, wurde zur Etablierung das reine Behandlungsmedium PBS mit DBD behandelt. Es wurde nun nach Behandlungszeiten und

-volumen gesucht, mit denen signifikante Osmolaritätsänderungen im Behandlungsmedium vermieden werden konnten. Um keinen verfälschten Wert durch Zelluntergang zu erhalten, wurde zur Etablierung ohne Zellen gearbeitet. Verschiedene Volumina wurden für die maximale Behandlungsdauer der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche behandelt. Bei den 10minütig behandelten Proben zeigte sich ein signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle in der Osmolarität bis zu einem Behandlungsvolumen von 200 μl (vgl. Abb. 13). Bei dem zuvor ermittelten Behandlungsvolumen von 250 μl konnte so folglich eine signifikante Änderung der Osmolarität der Probe durch eine fünfminütige Plasmabehandlung ausgeschlossen werden (vgl. Abb. 14).



10 Min Plasma-Behandeltes Volumen

Abbildung 13: Osmolaritätsmessungen nach Plasmabehandlung (10 min) von Proben unterschiedlichen Volumens. Ein signifikanter Unterschied der Osmolarität zeigt sich in den Probengrößen von 50-200 µl. Bei einer 300 µl großen Probe war die Osmolarität nach 10minütiger Behandlung nicht signifikant unterschiedlich (n=4, p<0,05, T-Test).

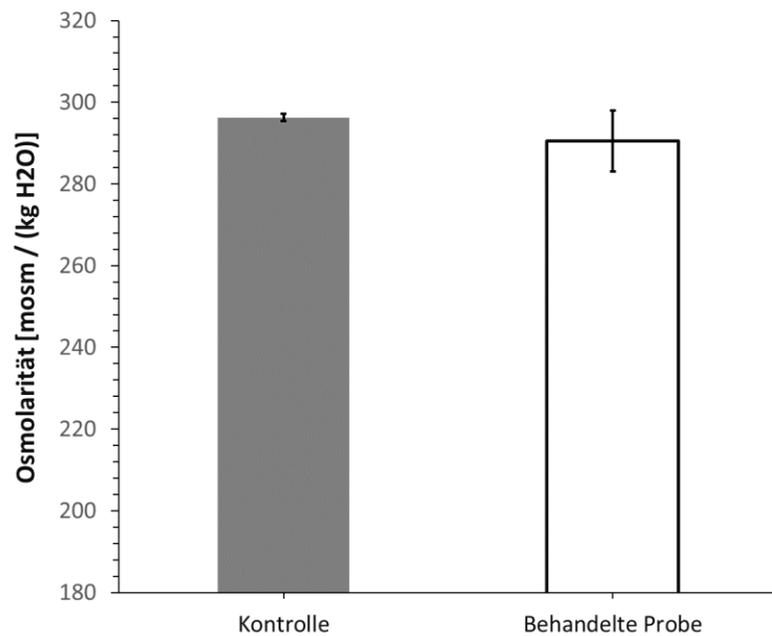


Abbildung 14: Osmolaritätsmessung nach Plasmabehandlung (5 min) von 250µl PBS. Ein statistisch signifikanter Unterschied der Osmolarität liegt nach erfolgter Plasmabehandlung nicht vor (n=4, p<0,05, T-Test).

3.1.4 Einfluss von Plasma auf dermale Fibroblasten

3.1.4.1 Plasmawirkung auf die Stoffwechselaktivität

Da es sich bei dem verwendeten Plasmagenerator um ein Gerät handelt, das Plasma direkt über der Probe erzeugt, galt es auch festzustellen, ob das erzeugte Plasma und die Art der Plasmagenerierung Einfluss auf die Zell-Viabilität hatte. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied der beiden Versuchsreihen ($p=0,4$) nach fünfminütiger Behandlungsdauer der Zellkulturen (Abb. 15).

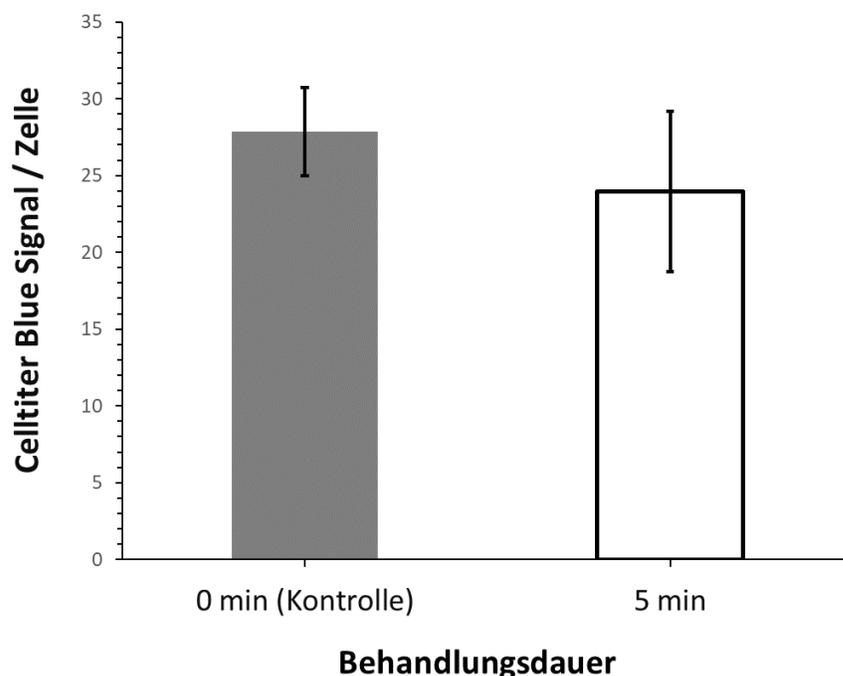


Abbildung 15: Einfluss von vorheriger Plasmabehandlung auf die Zell-Viabilität: Resazurin-Assay (Gemessenes Signal / Ein signifikanter Unterschied im Viabilitätssignal pro Zelle konnte nicht festgestellt werden ($n=8$, $p<0,05$, T-Test).

3.1.4.2 Messung des intrazellulären oxidativen Stresses

Im nächsten Schritt wurde mit einem selektiv für radikale Sauerstoffspezies spezifischen Farbstoff gearbeitet. Der Hintergrund des Versuchs war, die intrazelluläre Erhöhung radikaler Sauerstoffspezies nachzuweisen. Es gab in der Untersuchung keinen Unterschied zwischen ungefärbten behandelten oder gefärbten unbehandelten Zellen, sodass der Mittelwert dieser Untersuchungen als Hintergrundrauschen angenommen wurde und von den Messwerten der

gefärbten Zellen abgezogen wurde. Nach der Behandlung zeigten sich die behandelten und gefärbten Zellen signifikant unterschiedlich zu den gefärbten unbehandelten Zellen (Abb. 16).

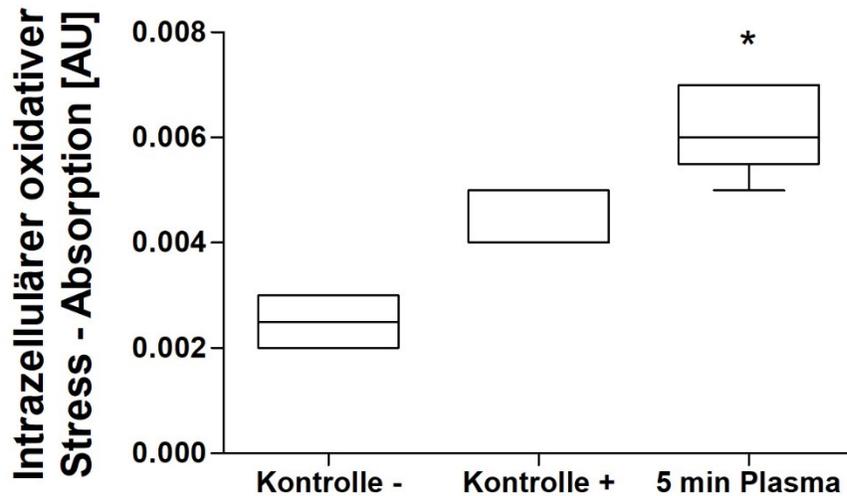


Abbildung 16: Plasmabehandlung von mit DCH2FDA gefärbten Zellen. Verglichen wurden ungefärbte Zellen (Kontrolle -) und gefärbte unbehandelte (Kontrolle +) mit gefärbten behandelten Zellen (fünfminütige Plasmabehandlung). Gemessen wurde die Absorption bei 490 nm ($N=5$, $p < 0,05$, Mann Whitney Test).

3.1.4.3 Direkte / Indirekte Plasmatoxizität

Um zu differenzieren, ob die bislang beobachteten Effekte durch die Einwirkung der direkten Plasmaerzeugung über der Probe zustande kommen oder eventuell auf indirektem Weg (z.B. über eine Veränderung des Mediums durch Plasmabehandlung) zustande kommen können, wurden in diesem Versuch sowohl Zellen in Kultur direkt behandelt, während andere Zellen mit behandeltem Medium inkubiert wurden. Die Messung erfolgte mittels Resazurin Essay (CellTiter Blue) 24 Stunden nach Behandlung. Zudem wurden Zellen mit einem Puffer inkubiert, der Nitrit ($300 \mu\text{M}$), Nitrat ($1,0 \text{ mM}$) und Wasserstoffperoxid ($200 \mu\text{M}$) in den Konzentrationen enthielt, die bei fünfminütiger Plasmabehandlung gemessen werden können. In diesem Experiment zeigte sich eine signifikante Reduktion der Zell-Viabilität nach 24stündiger Inkubation in allen Gruppen (z.B: ca. 55 % nach fünfminütig behandeltem Medium). Die Zugabe von Ascorbat konnte in diesem Experiment zu einer signifikanten Reduktion des durch DBD vermittelten Schadens führen. Eine Behandlung mit Nitrit, Nitrat und Wasserstoffperoxid allein konnte keine signifikante Reduktion der Zell-Viabilität

hervorrufen. Die direkte Plasmabehandlung führte ab einer Behandlungsdauer von 60 Sekunden zu einer signifikanten Reduktion des Signals des verwendeten Resazurin-Assays (Abb. 17). Nach einer fünfminütigen Plasmabehandlung lag die gemessene Aktivität nur noch bei ca. 66 % der unbehandelten Kontrollprobe. Unter Anwesenheit von Ascorbat als Antioxidans wurde die toxische Wirkung zwar vermindert, der schützende Effekt war jedoch nicht signifikant. Um zu bestimmen, ob die toxischen Effekte der Plasmabehandlung allein auf kurzlebige radikale Sauerstoffspezies zurück zu führen sein können, wurde im Weiteren die Viabilität von Zellen bestimmt, die mit DBD behandeltem Medium inkubiert wurden. Hier zeigte sich ebenfalls nach 24stündiger Inkubation mit dem DBD behandelten Medium eine signifikante Reduktion der Zell-Viabilität bereits nach einer Behandlungsdauer des Mediums von 60 Sekunden. Im Gegensatz zu der direkt behandelten Gruppe konnte der durch das plasmabehandelte Medium vermittelte Schaden durch Ascorbat signifikant reduziert werden.

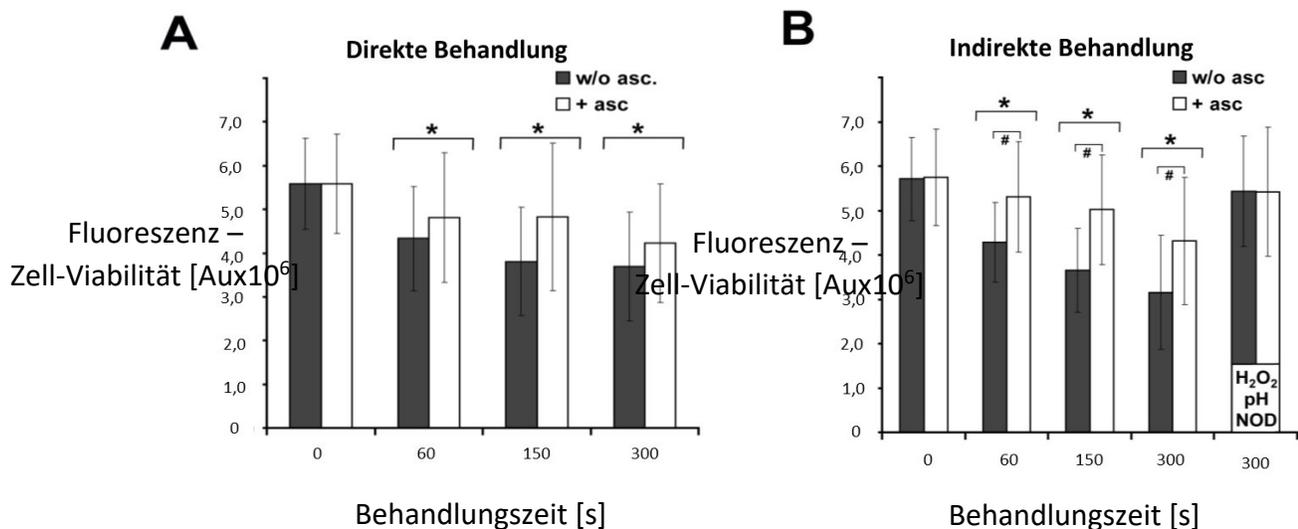


Abbildung 17: Direkte und Indirekte Plasmabehandlung: **A:** Fibroblastenbehandlung mittels DBD (60-300 s) \pm Ascorbat (asc; 1,0 mM) – Viabilitätsmessung 24 Stunden nach Behandlung mittels Resazurin Assay (CellTiter Blue) **B:** fünfminütige Behandlung in mit DBD behandeltem Puffer (0-300 s) bzw Pufferansatz mit Nitrit (300 μ M), Nitrat (1 mM) sowie H₂O₂ (200 μ M) (n=5, T-Test, * p < 0,05 im Vgl. mit der Kontrolle, # p < 0,05 im Vgl. mit der Behandlung ohne asc.).

3.2 Haut-Korrosion

Gemäß der OECD-Richtlinie 431 handelt es sich bei Haut-Korrosion um einen irreversiblen Schaden an Epidermis/Dermis, der durch diese Richtlinie nicht, wie bislang üblich, an Versuchstieren, sondern auch an künstlich gezüchteter Haut nachgewiesen werden kann.

3.2.1 EpiSkin

Für die Bewertung, ob Plasma korrosiv auf intakte Epidermis wirkt (Untersuchung der direkten Toxizität), wurde das validierte System EpiSkin von der Firma SkinEthics verwendet (künstlich gezüchtete humane Epidermis). Es zeigt sich, dass die mittels MTT gemessene Viabilität der behandelten Proben nicht signifikant unterschiedlich von den durchgeführten Kontrollen ist (Abb. 18).

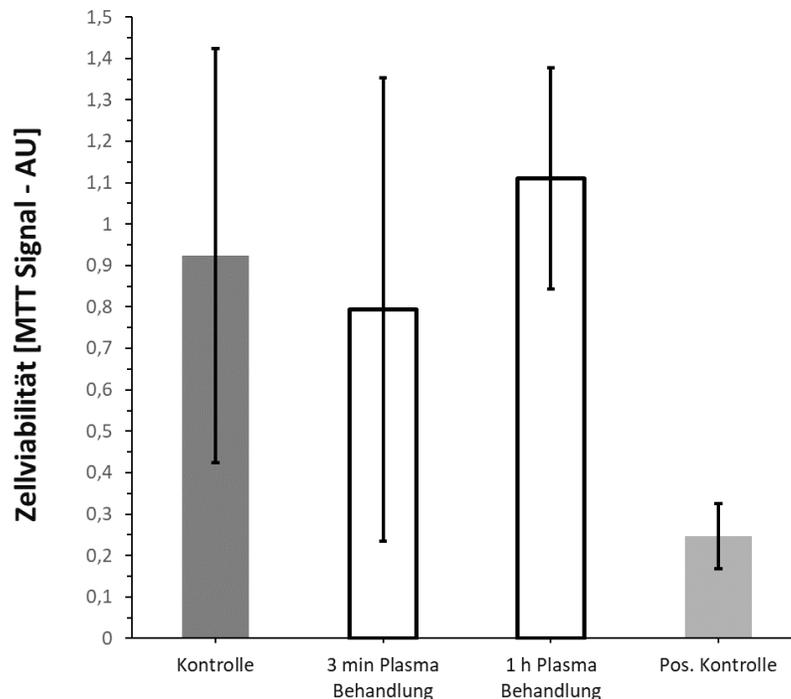


Abbildung 18: Gemessene Absorption der MTT-Färbelösungen der Proben ($n=8$, $p<0,05$, One Way Anova – Signifikanz der Positivkontrolle nicht eingezeichnet).

3.2.2 Plasmaeffekte auf humane Spalthaut

Um sicherzustellen, dass sich das Ergebnis der künstlich gezüchteten Epidermis nicht von humaner Haut unterscheidet, wurde im Anschluss an die EpiSkin-Versuche eine analoge Behandlung von Spalthaut (0,7 mm) durchgeführt. Die mittels Resazurin-Assay bestimmten Viabilitätswerte zeigten zwar einen Abwärtstrend, jedoch gab es auch hier keine Signifikanz zwischen behandelter Probe und Kontrolle. Die Positivkontrolle zeigte einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle, sodass davon ausgegangen werden kann, dass eine Veränderung der Viabilität von Spalthaut im Resazurin-Assay nachgewiesen werden kann ($p=0,0008$). Eine Schädigung durch Plasmabehandlung konnte jedoch auch auf diese Weise an humaner Epidermis nicht nachgewiesen werden (Abb. 19).

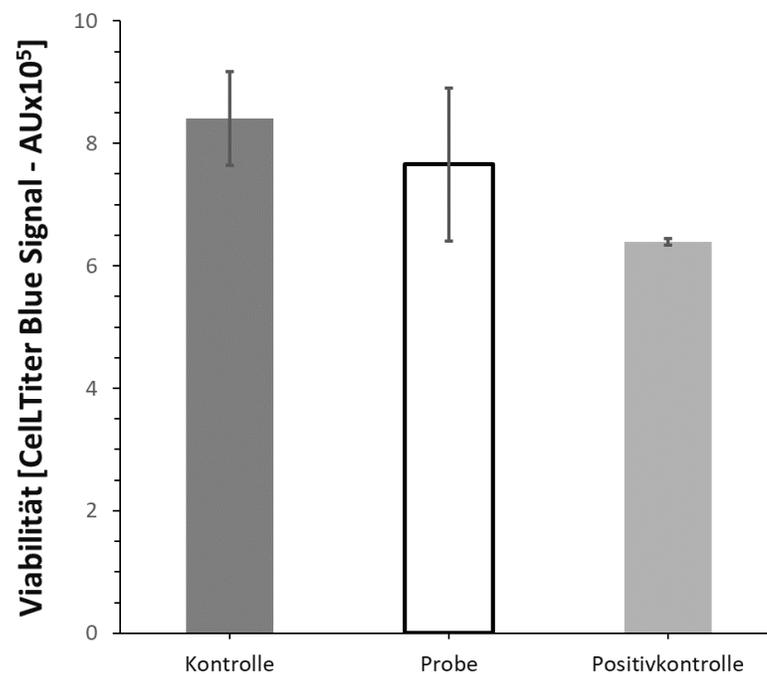


Abbildung 19: Haut-Korrosion mit Spalthaut (0,7 mm): Spalthautstücke wurden analog zur EpiSkin (eine Stunde Plasma-Behandlung) und die Positivkontrolle mit 8M NaOH behandelt. Die Auswertung erfolgte mittels Resazurin-Assay (CellTiter Blue) ($n=6$, One-Way Anova).

3.3 Haut-Reizung

Nachdem die Plasmabehandlung von EpiSkin gemäß den OECD-Kriterien nicht als korrosiv einzustufen ist, wurde im nächsten Schritt überprüft, ob eine Plasmabehandlung reizend wirkt. Verwendet wurde wieder ein durch die OECD-Richtlinien anerkanntes Behandlungsprotokoll (OECD 439).

3.3.1 EpiSkin

Analog zum Herstellerprotokoll erfolgte eine 15minütige Plasmabehandlung mit einer anschließenden 42stündigen Inkubation und anschließender Messung der direkten Hautschädigung sowie der IL-1 α Spiegel. Die hierbei erhobenen Messwerte zeigten keinen signifikanten Unterschied, weder im MTT-Zytotoxizitäts-Assay (vgl. Abb. 20), noch in der Höhe des messbaren IL-1 α Spiegels (vgl. Abb. 21).

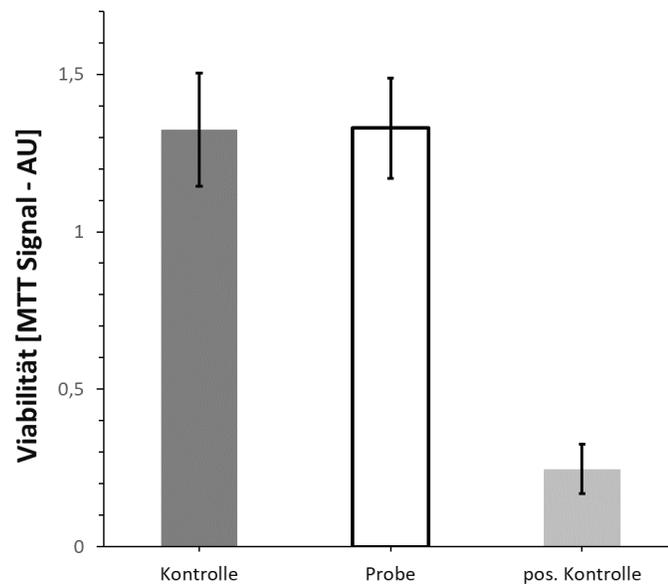


Abbildung 20: Gemessene Absorption der MTT-Färbelösungen der nach dem Skin Irritation Protokoll der Firma SkinEthics behandelten EpiSkin-Stücke. Ein signifikanter Unterschied zwischen behandelter Probe und jeweiliger Kontrolle ist nicht gegeben ($n = 9$, T-Test – Signifikanz der Positivkontrolle nicht eingezeichnet).

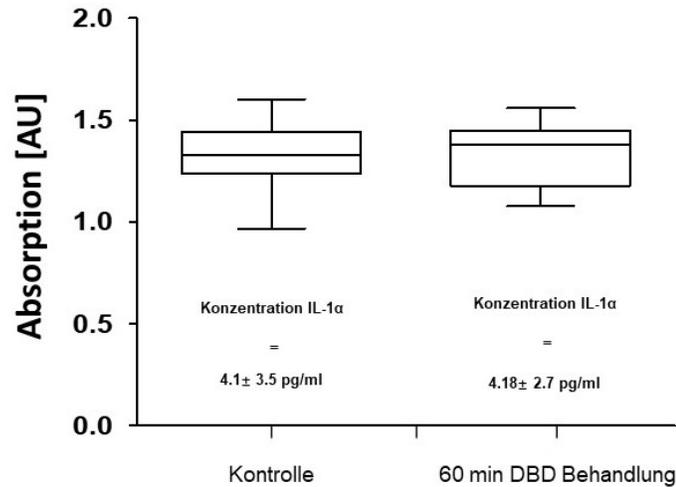


Abbildung 21: Gemessen IL-1 α Konzentration der behandelten Probe und Kontrolle. Gemessen wurde die Absorption bei 570 nm und mittels Eichkurve die Konzentration ermittelt. Ein statistisch signifikanter Unterschied liegt nicht vor ($n = 9$, T-Test).

3.3.2 Plasmaeffekte auf humane Spalthaut

Die Behandlung der Spalthaut erfolgte identisch zum Skin Irritation Assay der EpiSkin. Jedoch wurde die Auswertung mittels Resazurin-Assay durchgeführt und es erfolgte keine IL-1 α Messung. Hierbei zeigte sich jedoch auch ein anderes Ergebnis. So konnte eine signifikante Abnahme der Viabilität 42 Stunden nach erfolgter Behandlung zwischen behandelter Probe, Kontrolle und Positivkontrolle nachgewiesen werden (Abb. 22).

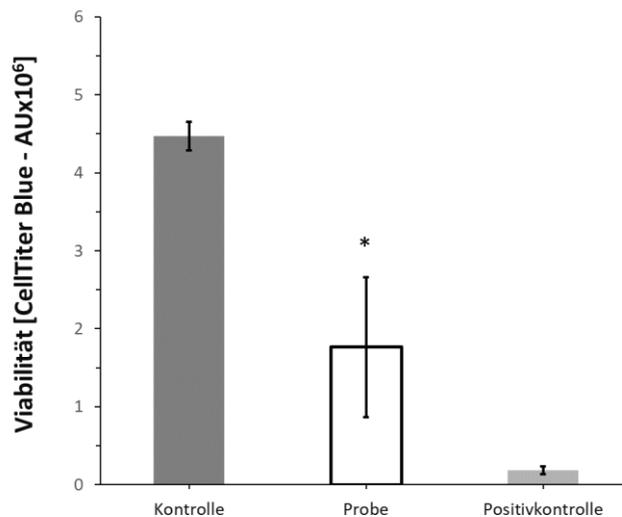


Abbildung 22: Mittels Hautstanze gewonnene Spalthautproben wurden analog zum Skin Irritation Assay mit DBD behandelt (15 min). Die Auswertung erfolgte mittels Resazurin-Assay. Die Probe war zur Kontrolle und Positivkontrolle signifikant unterschiedlich ($n=6$, one-way-ANOVA, $p < 0,05$ – Signifikanz der Positivkontrolle nicht eingezeichnet).

3.4 Plasmawirkung in einer Wunde

3.4.1 Etablierung der Behandlungsdauer

Da in einer Wunde keine intakte Epidermis über Bindegewebszellen liegt, stellt sich die Frage, wie sich DBD auf die eigentliche Wunde, also auf die dort freiliegenden Zellen auswirkt. Da der Hersteller des Plasmagenerators eine Behandlungszeit von 60-90 Sekunden empfiehlt, wurde nach der niedrigsten Behandlungsdauer gesucht, die eine signifikante Reduktion der Zell-Viabilität vermitteln kann. Hierfür wurden aufsteigende Behandlungszeiten getestet, bis bei 5 Minuten eine signifikante Reduktion erzielt wurde (Abb. 23).

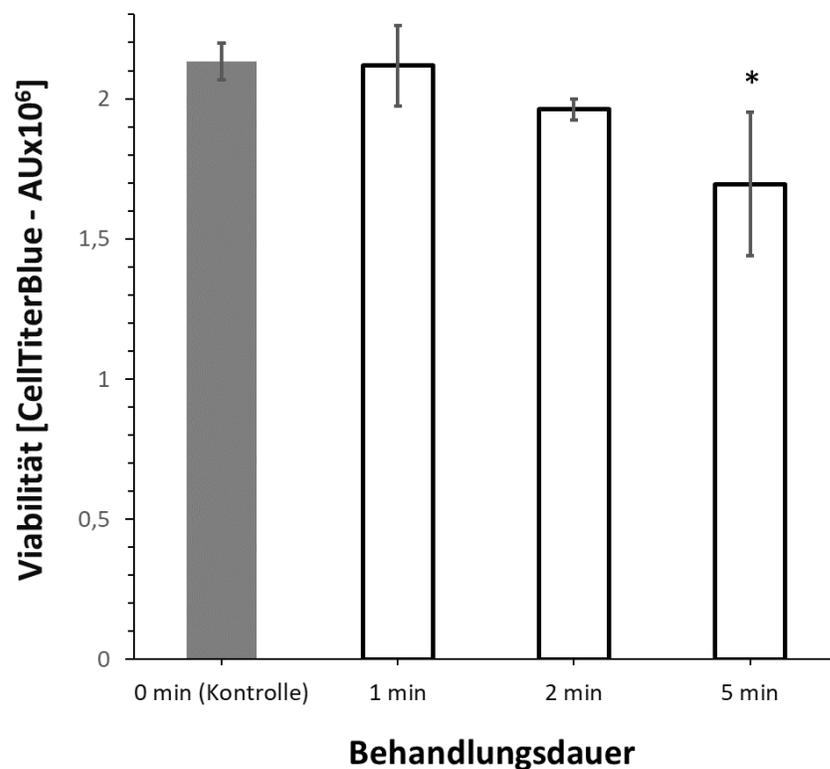


Abbildung 23: Plasmabehandlung von 80.000 Fibroblasten mit 250 μ l PBS Behandlungsmedium. Auswertung mittels Resazurin-Assay ($n = 8$, $p < 0,001$ – ANOVA).

3.5 Plasmainduzierter Zelltod

3.5.1 Apoptosemarker PARP

Um nachzuweisen, welche Art des akuten Zelltodes durch Plasmabehandlung von Fibroblasten auftritt, wurde der Apoptose-Marker PARP (Poly ADP ribose polymerase) nach Plasmabehandlung mittels Westernblot bestimmt. Es zeigte sich, dass die Positivkontrolle mit dem Apoptose-Induktor Staurosporin zwar nicht signifikant unterschiedlich zur Negativkontrolle mit unbehandelten Fibroblasten war, jedoch war eine Tendenz erkennbar. Vor allem war auch die behandelte Probe (fünfminütige Plasmabehandlung in 250 μ l PBS) im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht (Abb. 24).

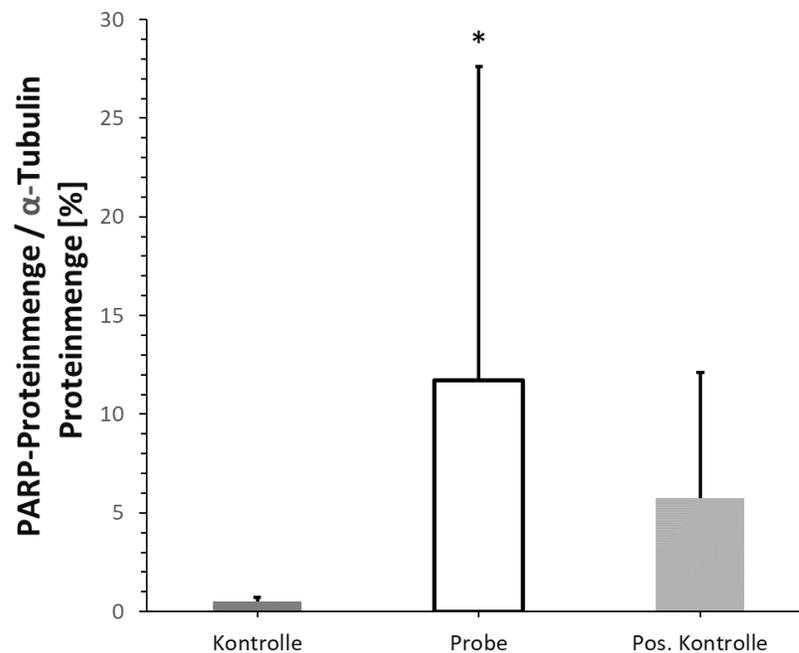


Abbildung 24: Zum Nachweis von Apoptose als Ursache des zuvor beschriebenen Zelltodes wurde eine PARP-Bestimmung mittels Westernblot vorgenommen. Positivkontrolle mit 0,2 μ M Staurosporin ($n = 4$, $p < 0,05$, Kruskal-Wallis Test).

3.5.2 TUNEL

Mit den verbliebenen EpiSkin-Stücken wurde probeweise ein TUNEL Assay (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) durchgeführt. Zur Positivkontrolle wurde EpiSkin 30 Minuten mit UVA bestrahlt beziehungsweise als Probe für 60 Minuten mit Plasma behandelt. Grund für diese Durchführung war lediglich die Etablierung der Apoptose-Analyse.

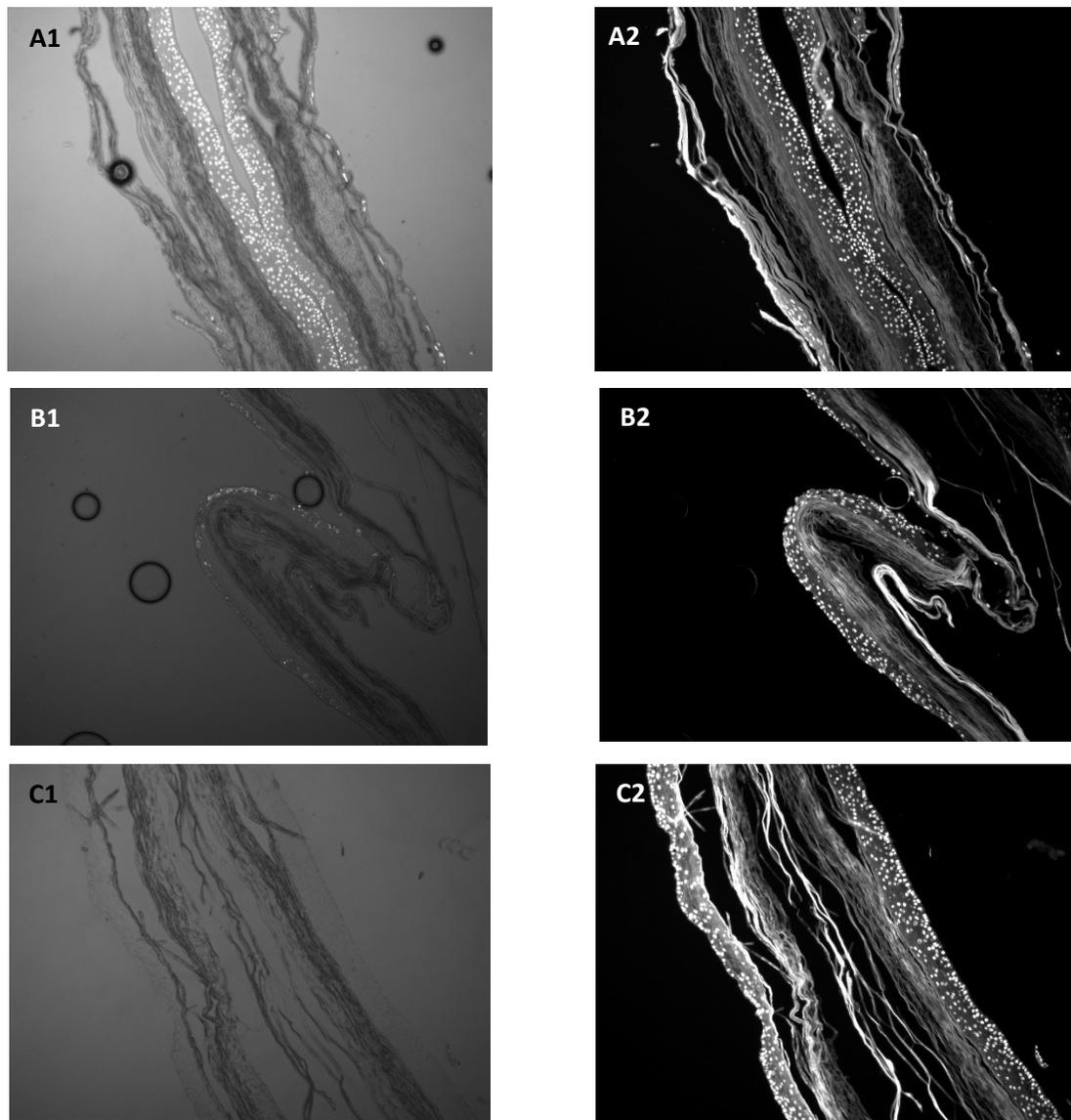


Abbildung 25: Fluoreszenzmikroskopisch ausgewerteter TUNEL-Assay zur Apoptose-Bewertung von DBD behandelte künstlich gezüchteter Epidermis (EpiSkin). **A1**: Positivkontrolle nach 30 Minuten UVB-Behandlung, dargestellt mit FITC-Filter. **A2**: Positivkontrolle nach 30 Minuten UVB-Behandlung, dargestellt mit DAPI-Filter. **B1**: Probe nach 60 Minuten Plasma-Behandlung, dargestellt mit FITC-Filter. **B2**: Probe nach 60 Minuten Plasma-Behandlung, dargestellt mit DAPI-Filter. **C1**: Kontrolle ohne Behandlung, dargestellt mit FITC-Filter. **C2**: Kontrolle ohne Behandlung, dargestellt mit DAPI-Filter.

Eine Färbung mit nachweisbarem Ergebnis ist möglich und wie sich anhand der Bilder einer 60minütig behandelten Probe zeigt ebenfalls sinnvoll, da im Gegensatz zur Kontrolle angefärbte DNA-Doppelstrangbrüche erkennbar sind (Vgl. Abb. 25). Eine Versuchsanzahl, die eine statistische Auswertung erlaubt, war auf Grund der zur Verfügung stehenden Ressourcen nicht möglich.

3.5.3 Wirkung von Antioxidantien

Als letzter Nachweis der Ursache von oxidativem Stress als Apoptose-Auslöser nach DBD-Behandlung wurde die Behandlung erneut unter Zugabe von Antioxidantien durchgeführt. Da es im Rahmen dieser Arbeit um den Einfluss radikaler Sauerstoffspezies geht, lag die Versuchsplanung nahe, entsprechende Effekte über spezifische Radikalfänger zu inaktivieren. Hierfür wurden verschiedene Stoffe gewählt und als Positivkontrolle eine Behandlung ohne Radikalfänger durchgeführt. Die Konzentrationen der verwendeten Antioxidantien, sowohl für die Kontrolle als auch die behandelte Probe, waren für Ascorbat: 1 mM, für Mannitol: 10 mM und für NAC: 1 mM.

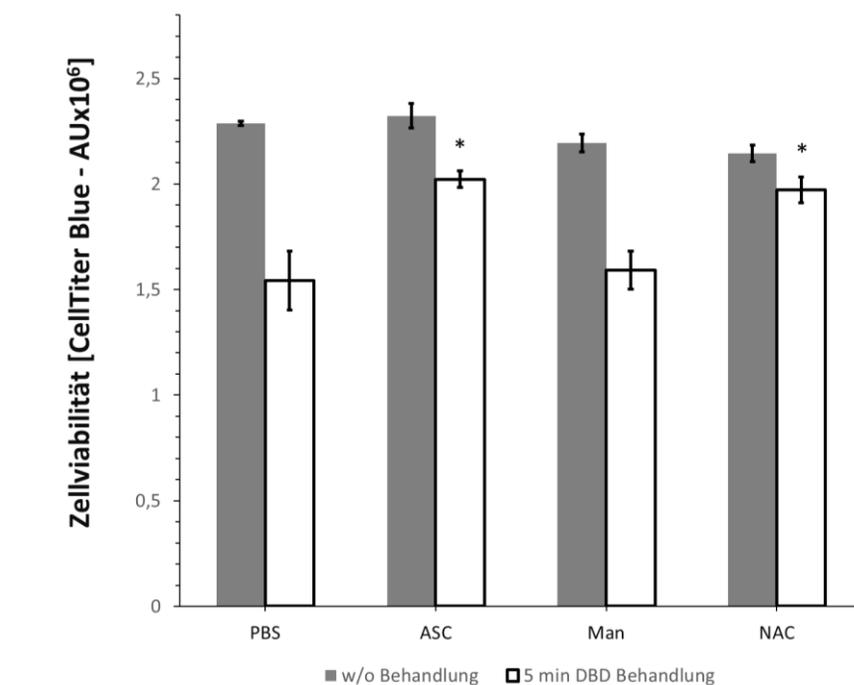


Abbildung 26: Plasmabehandlung mit Radikalfängern. Die verwendeten Konzentrationen der Antioxidantien waren für Ascorbat (ASC): 1 mM, für Mannitol (Man): 10 mM und für NAC: 1 mM (N = 6, p < 0,05, 1-way-Anova).

In dieser Versuchsreihe mit den oben aufgeführten Konzentrationen gelang es nicht, die mittels Resazurin gemessene Viabilitätsminderung positiv zu beeinflussen. Alle behandelten Proben unterschieden sich signifikant von den unbehandelten Kontrollen (nicht im Diagramm eingezeichnet). Unter Anwesenheit der Antioxidantien Ascorbat sowie NAC unterschieden sich zwar die behandelten Proben signifikant von den unbehandelten mit Antioxidantien versetzten Kontrollen, jedoch unterschieden sich die behandelten Proben ebenfalls signifikant von der lediglich in PBS ohne Antioxidantien behandelten Kontrolle (Abb. 26).

4 Diskussion

Die Arbeit im Labor folgte einer Reihe Überlegungen zur Plasmabehandlung. Initial wurden zur Versuchsetablierung verschiedene physikalische Effekte untersucht, die einen Einfluss auf die gemessene Zell-Viabilität haben können und prinzipiell nicht als Plasma-spezifisch angesehen werden können. Für die weitere Versuchsplanung spielten die möglichen Wirkungsorte von DBD die maßgebende Rolle. Vorgegangen wurde von oberflächlichen zu tiefen Schichten, sodass mit einem Modell intakter Haut (EpiSkin™) begonnen wurde und im nächsten Schritt die Wirkung auf frei liegende Zellen, die Art des Zelluntergangs und Sauerstoffradikale als Toxizitätsvermittelnde Faktoren untersucht wurden.

Der Ablauf der Versuche stellt die Behandlung von der oberflächlichen Epidermis sowie die Wirkung bei etablierten, feuchten Wunden mit frei liegenden Fibroblasten dar. Um die Unbedenklichkeit der Anwendung der Plasmasonde zu etablieren, wurde zuerst mit EpiSkin-Proben der Firma SkinEthics gearbeitet und diese entsprechend den Protokollen der Firma behandelt. Hiermit wurde die Wirkung auf unverletzte Haut untersucht, um eine generelle Aussage zur Verträglichkeit der Methode ohne vorliegende Wunde zu erhalten. Mit dem übrig gebliebenen EpiSkin-Material wurde zuletzt ein TUNEL Assay durchgeführt, um Hinweise auf den Zelluntergang durch Apoptose zu erhalten. Zur Etablierung eines heterogeneren Modells wurden Spalthautproben zum Vergleich nach den gleichen Protokollen wie die künstlich gezüchtete Epidermis behandelt.

Da die Anwendung von Plasma jedoch nicht an intakter Haut, sondern insbesondere bei der Behandlung von Wunden erfolgt, in denen die Gewebezellen nicht durch eine Schicht aus abgestorbenen Keratinozyten geschützt werden, war der nächste Schritt, die Versuche und Behandlungsmodi auf eine Zellkultur auszuweiten, um Effekte auf frei liegende Zellen zu untersuchen. Aus der zur Verfügung stehenden Spenderhaut wurden Fibroblasten isoliert und als einfaches Wundmodell mit DBD behandelt. Hierbei wurde zuerst eine Behandlungsdauer etabliert, die einen signifikant messbaren Effekt auf die Viabilität der Zellkulturen hatte, um dann weitere Untersuchungen zur Wirkung des Plasmas und der Art des induzierten Zelltodes durchzuführen. Um sicherzustellen, dass die Effekte, wie initial postuliert, durch Sauerstoffradikale vermittelt wurden, wurde nun versucht, den zytotoxischen Effekt mit Antioxidantien zumindest teilweise zu antagonisieren.

4.1 Einfluss physikalischer Effekte auf die Zellkultur

Es wurden zu Beginn physikalische Auswirkungen untersucht, um mögliche Einflussfaktoren auf die Viabilität von Zellen (pH-Wert und Osmolarität etc.) bei den Versuchen dieser Arbeit exkludieren zu können. *In vivo* kann davon ausgegangen werden, dass durch die Matrixstruktur der Haut dünnere Flüssigkeitsfilme auf Zellen liegen als im experimentellen Setting. Hierdurch ist keine gute Durchmischung eines großen Volumens möglich und es kann mit extremeren Gradienten und folglich stärkeren Effekten dieser Parameter gerechnet werden. Nicht zuletzt ist dies jedoch ein Grund, weshalb diese Parameter bedacht werden sollten. Bekannt ist, dass Schwankungen der bestimmten Parameter außerhalb des physiologischen Bereichs toxisch wirken. (Sharma et al. 2015; Leroy et al. 2000)

In welchem Ausmaß ein Einfluss *in vivo* oder auch *in vitro* möglich ist, kann aus den Versuchen jedoch nicht erschlossen werden, da keine toxische Wirkung durch die durch Plasma veränderten Parameter untersucht wurden. Es wurde lediglich getestet, welche Behandlungszeiten noch zu keinen signifikanten Unterschieden der Parameter führen.

Behandlungsmedium

Die Versuche zur direkten Schädigung durch Plasma wurden mit PBS als Versuchsmedium durchgeführt. Grund hierfür war die bewusste Vermeidung indirekt vermittelter Toxizität, um den direkten Einfluss von Plasma und hierbei erwartete Sauerstoffspezies zu untersuchen. Vermieden werden sollte hierdurch z.B. durch veränderte extrazelluläre Lipide vermittelter Zelluntergang (Joshi, Cooper et al. 2011), um in einem möglichst standardisierten Setting vermittelte Effekte nachzuweisen. Hierbei handelt es sich jedoch um kein adäquates Wundmodell. Die o.g. potenziell vermittelnden Faktoren, die schlussendlich einen Toxizitätsvermittelnden oder protektiven Effekt auf Zellen haben können, werden in der hier dargestellten Behandlung vernachlässigt. So wurde die Behandlung bewusst in PBS durchgeführt, um einen einzelnen Aspekt der Plasmawirkung untersuchen zu können.

Austrocknung

Bei der Behandlung der Zellen fiel auf, dass bei geringem Volumen ein kleiner Bereich in der Mitte des behandelten Wells keinen sichtbaren Flüssigkeitsüberstand mehr enthielt und hier direkt den elektrischen Entladungen des Plasmagenerators ausgesetzt war. Die initiale Festlegung des Behandlungsvolumens auf 250 µl bei der Plasma-Behandlung von Fibroblasten wurde zwar systematisch ermittelt, um den genannten Effekt zu vermeiden (vgl. Abb. 8+9 Seite 48+49), jedoch ohne Erklärung für den beobachteten Effekt festgelegt. Zwar ist bekannt, dass die Beschaffenheit der Gegenelektrode die Wirkung von Plasma verändert (Anaghizi et al. 2015) und es wurden verschiedene Reihen der Plasmabehandlung von Wells sowohl mit als auch ohne Zellen durchgeführt, jedoch ohne eine statistische Auswertung des Austrocknungseffektes durchzuführen. Im Verlauf konnte die Bildung von zentralen trockenen Stellen vermieden werden. Die direkte Plasmawirkung über Zellen ohne Flüssigkeitsüberstand scheint jedoch den toxischen Effekt von DBD zu steigern. Als Rückschluss aus diesem beobachteten Effekt kann auch diskutiert werden, dass ein Flüssigkeitsüberstand nicht die Art der Toxizitätsvermittlung ändert, jedoch die Zellen in besonderem Maße schützt, indem plasmainduzierte Noxen in einem größeren Volumen verdünnt werden bzw. die entstehende UV-Strahlung abfangen. Zumindest weisen die in der Etablierung durchgeführten Versuche auf eben dieses Phänomen hin. Als Ursache für die Toxizität kann weiterhin ein direkter Stromfluss durch die entstandenen Mikrofilamente durch die behandelten Zellen angenommen werden. Normalerweise sollten Wunden für einen guten Verheilungsverlauf in der Granulationsphase nicht austrocknen. (Gillitzer 2002) Dies spiegelt sich auch in den hier beobachteten Ergebnissen wider, bei denen trocken liegende Zellen sich offensichtlich vulnerabler für toxische Schädigung durch Plasma zeigen.

pH-Wert

Ein entscheidender Faktor für Zell-Viabilität ist das die Kultur umgebende Milieu. So führen niedrige pH-Werte zum Zelltod. (CARREL 1923, Sharma et al. 2015) Bei der Plasmabehandlung von Flüssigkeiten werden saure Valenzen (wahrscheinlich NO₂) in die

Flüssigkeiten eingebracht (Balzer et al. 2015), folglich nimmt bei der Plasmabehandlung von Zellen der pH-Wert des Behandlungsmediums ab (vgl. Abb. 10-12 Seite 50+51) und dies wirkt nun toxisch auf die zu behandelnden Zellen. Je kleiner das Behandlungsvolumen, desto größer ist die Veränderung des pH-Wertes des Behandlungsmediums bei gleicher Behandlungszeit, da dessen Pufferkapazität schneller erschöpft ist. Eine solche Änderung konnte in dem gewählten Volumen gering gehalten werden.

Da die Grundidee der Arbeit war, die Wirkung radikaler Sauerstoffspezies zu untersuchen, lag es nahe, eine pH-Wert-Veränderung als mögliche „Störvariable“ auszuschließen. Hierfür wurden verschiedene Messreihen durchgeführt und es zeigte sich, dass das minimal nötige Behandlungsvolumen, um Austrocknungseffekte zu vermeiden, ebenfalls ausreichend für einen stabilen pH-Wert der behandelten Probe für den gewählten Behandlungszeitraum war (maximal 5 Minuten). Dennoch kann in der Plasmabehandlung die Ansäuerung ein entscheidender Faktor sein, der das Wundmilieu und Gewebe aufgrund der anzunehmenden kleinen Flüssigkeitsvolumina im Wundbereich nachhaltig beeinflussen kann.

Angemerkt werden muss, dass verschiedene Sauerstoffspezies wie z.B. Wasserstoffperoxid zu einer pH-Wert-Veränderung führen können. Jedoch sind die bekannten zytotoxischen Konzentrationen in der Größenordnung von ~3 % bei Desinfektionsmitteln und 0,3 % in desinfizierenden Mundspüllösungen. Da 3%ige Wasserstoffperoxid-Lösung bei Raumtemperatur einen pH-Wert von 6 hat, ist nach pH-Messung im behandelten Volumen von einer Änderung dieser Größenordnung nicht auszugehen. (Balzer et al. 2015)

Osmolarität

Gleiches gilt für das Verhalten der Osmolarität. (vgl. Abb. 13+14 Seite 52) Insbesondere werden andere zytotoxische Effekte durch eine hyperosmolare Umgebung verstärkt. (Galvez et al. 2001; Burg et al. 2007)

Bei dem gewählten Behandlungsvolumen war das Ziel, eine physikalische Änderung des Milieus so gering wie möglich zu halten und dennoch ein Setting zu schaffen, in dem die im Plasma entstehenden radikalen Sauerstoffspezies einen toxischen Effekt auf die zu behandelnden Zellen haben. Bei einer 10minütigen Behandlung zeigte sich bis zu einem

Behandlungsvolumen von 200 µl und darunter eine signifikante Änderung der Osmolarität nach Plasmabehandlung. Dieser Effekt war bei den im Verlauf zur Behandlung gewählten Behandlungsparametern nicht mehr nachzuweisen. Auch hier kann neben der Ansäuerung die erhöhte Plasma-induzierte Osmolarität ebenfalls das Wund-Milieu und Hautzellen beeinflussen.

Plasmawirkung auf die Resazurin-Umsetzung in mit Plasma behandelten Fibroblasten

Auch wenn eine Viabilitätsfärbung der Zellen lichtmikroskopisch qualitativ eine Viabilität von Zellen anzeigen kann, so stellt sich die Frage, ob eine Behandlung von Zellen eine Wirkung auf die Stoffwechselrate bzw. den Farbstoffumsatz einer Viabilitätsfärbung von Zellen haben kann. Dieser Effekt wurde exemplarisch mit der am häufigsten verwendeten Färbung, nämlich dem Resazurin-Assay, ausgeschlossen. Hierfür wurde der Quotient aus Viabilität und Zellzahl gebildet. Diese Werte unterschieden sich nicht signifikant bei behandelten und nicht behandelten Zellen, sodass von einer Veränderung der Resazurin-Umsetzung durch plasmabehandelte Zellen nicht ausgegangen werden kann (vgl. Abb. 15 Seite 53). Dieser Effekt wurde unmittelbar nach der Plasmabehandlung ausgeschlossen. Rückschlüsse über eine veränderte Stoffwechselaktivität können, insbesondere für den langfristigen Verlauf, hieraus nicht abgeleitet werden. Bei langfristigen Proliferationsuntersuchungen konnte zudem eine Hemmung der Zellteilung nach Plasmabehandlung nachgewiesen werden. (Balzer et al. 2015)

4.2 Wirkung auf oberflächliche / intakte Haut

Untersuchung plasmainduzierter Korrosion am EpiSkin-Modell

Bei der Plasmabehandlung bezüglich Haut-Korrosion konnte kein signifikanter Unterschied in der mittels MTT-Assay bestimmten Toxizität der behandelten und der Kontroll-Proben nachgewiesen werden. Folglich konnte die verwendete Behandlungszeit von 60 min keinen akuten korrosiven Schaden im EpiSkin-Modell verursachen (vgl. Abb. 18 Seite 56). Das etablierte Behandlungsprotokoll ist für den Nachweis einer Haut-Korrosion, also eines tiefgreifenden Hautschadens, für Cremes validiert. Diese können theoretisch von der Probe entfernt werden. Für durch Plasma erzeugte Noxen gestaltet sich dies ggf. schwieriger, da weder

die Kontaktfläche noch die Menge der erzeugten Noxen sichtbar ist. Eine Gasbehandlung oder physikalische Einwirkungen werden weder im Protokoll noch in der OECD-Richtlinie erwähnt. Dennoch entsprechen die verwendeten Wirkzeiten des Plasmas, also der Plasmaerzeugung über der Probe, den Einwirkzeiten, die im Protokoll angegeben sind. Sollte eine entsprechende Behandlung zum Hautschaden führen, sollte dies durch ein Toxizitäts-Assay nachweisbar sein, da der verwendete Test einen Zellschaden unabhängig von der wirkenden Noxe detektieren kann. Da kein signifikanter Unterschied der Proben erzeugt werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass unabhängig von der Erzeugung des zu bewertenden Effekts kein Schaden an der biologischen Probe zustande gekommen ist. Berücksichtigt werden hierbei allerdings keine potenziellen Schäden, die durch Inhomogenität in den Zellen vermittelt werden könnten.

Ein ausbleibender korrosiver Schaden der Haut ist kein Hinweis auf die Unbedenklichkeit einer Plasmabehandlung. Es kann lediglich kein akuter unmittelbar nachweisbarer Schaden der Haut durch die Plasmabehandlung gemessen werden. Langfristige Schäden wie z.B. potenzielle Kanzerogenität werden hierdurch nicht erfasst und auch ein eventuell zeitverzögerter Zelluntergang wird durch diese Messung nicht dargestellt.

Untersuchung plasmainduzierter Korrosion an humaner Spenderhaut

Die nun durchgeführte Messung erfolgte nicht mehr an auf Kollagenmatrix gezüchteten homogenen Zellkulturen, sondern an Hautexplantaten von menschlichen Spendern. Diese weisen eine deutlich heterogene Zellstruktur auf. Effekte durch eine Plasmabehandlung auf in EpiSkin nicht vorhandene Zelltypen können nicht vorhergesagt werden. Die Art der mitbehandelten Zellen kann von Probe zu Probe variieren, da z.B. unterschiedliche Mengen an Fett- oder Nervenzellen an den einzelnen Proben vorhanden sein können. Zudem wurden die Proben nicht in einem Plastik-Inlay, sondern frei im Behandlungsmedium behandelt. Trotz dieser Überlegungen konnte mit dem verwendeten Resazurin-Assay kein signifikanter Unterschied zwischen plasmabehandelten Hautstücken und unbehandelten Kontrollen gefunden werden (vgl. Abb. 19 Seite 57).

Anders als in den Versuchen mit EpiSkin wurde in diesem Setting jedoch kein Toxizitätsnachweis verwendet, sondern mit dem Resazurin-Assay ein Viabilitätsnachweis. Vereinzelte Zelluntergänge könnten hierdurch ggf. nicht auffallen, wenn die durch Plasma vermittelten Effekte nur einen kleinen Teil der behandelten Zellen betreffen. Dieser Effekt passt zu den im Verlauf erstellten TUNEL-Ergebnissen (vgl. Abb. 25 Seite 64).

Auch diesem Test fehlt jedoch bis zu einem gewissen Grad die Vergleichbarkeit mit der Wirkung *in vivo*. So werden verschiedene Aspekte des lebenden Organismus nicht berücksichtigt, zum Beispiel kann eine indirekte Wirkung über das Behandlungsmedium angenommen werden, die, sofern sie signifikant wird, im Organismus durch Kreislaufaktivität vermieden würde.

Untersuchung plasmainduzierter Irritation am EpiSkin-Modell

Analog zur Untersuchung einer chemischen Substanz erfolgte die Plasmabehandlung über die im Hersteller-Assay angegebene Einwirkzeit. Anders als bei der chemischen Substanz erfolgte dies jedoch außerhalb des Inkubators für die Dauer der Einwirk-/Behandlungszeit.

Da es im Rahmen dieses Versuches ebenfalls keinen signifikanten Unterschied im MTT-Assay gab (vgl. Abb. 20+21 Seite 58+59), wird folglich davon ausgegangen, dass keine toten Zellen zur vermehrten Generierung von IL-1 α beigetragen haben. Dies wird durch die gemessenen IL-1 α Spiegel bestätigt und zeigt zudem, dass von einer Reizung der vitalen Zellen nicht auszugehen ist.

Wie beim Korrosions-Assay muss auch hier gelten: Ein Rückschluss auf eine Verträglichkeit im Wundmodell oder einer Wunde ergibt sich aus diesem Versuch nicht. Es kann hiernach lediglich festgehalten werden, dass eine reizende Wirkung der Plasma-Anwendung bei intakter Haut nicht nachgewiesen werden konnte.

Sowohl beim Korrosions- als auch beim Irritations-Assay muss noch auf die für das Assay notwendigen Behandlungszeiten eingegangen werden, da diese weit über dem liegen, was für die Anwendung *in vivo* am Stück angedacht ist beziehungsweise *in vitro* in einer Zellkultur einen Schaden hervorrufen kann (90 Sekunden in der klinischen Anwendung vs. bis zu 60

Minuten im experimentellen Setting). Ob eine entsprechende Anwendungszeit generell sinnvoll ist sei dahingestellt, hat jedoch bei einer intakten oberen Hautschicht zumindest nach den hier angesetzten Maßstäben keinen nachweisbaren korrosiven/schädigenden oder reizenden Effekt.

Offensichtlich spielen viele Faktoren bei der letztendlichen Wirkung von DBD eine Rolle. Da es sich um *in vitro* Versuche handelt, ist die Übertragbarkeit auf den komplexen Organismus Mensch bezüglich vieler Wirkungen limitiert. Korrosion und Hautreizung konnten mit den validierten Assays ausgeschlossen werden. Bei intakter Haut ist folglich bei einer Anwendung nicht mit einem Schaden im Sinne von Korrosion und Reizung auszugehen, jedoch kann kein Rückschluss auf Faktoren wie subjektive Verträglichkeit gezogen werden. Eine Schmerzwirkung oder Nervenreizung kann durch die Versuche nicht ausgeschlossen werden. Auch eine spezifische Wirkung auf Hautanhangsgebilde oder eine Veränderung der Durchblutung z.B. durch vasoaktive Stoffe mit konsekutiver Schwellung, welche von Nachteil für die Wundheilung wäre, kann hierdurch nicht abgeleitet werden. (Bowler 2002)

Untersuchung plasmainduzierter Irritation an humaner Spenderhaut

Die Behandlung von humaner Spenderhaut erfolgte analog zur Behandlung von EpiSkin. Zur Auswertung wurde jedoch auch ein Resazurin-Assay verwendet. Hierbei kam es zu unterschiedlichen Ergebnissen, so konnte eine signifikante Viabilitätsreduktion der behandelten humanen Spenderhaut erreicht werden (vgl. Abb. 22 Seite 60).

Die Auswertungen sind jedoch nicht vergleichbar. Auch wenn die Behandlung analog durchgeführt wurde, so war das Setting für die jeweiligen Hautstücke ein anderes. Die verwendeten EpiSkinTM-Proben befanden sich in Plastik-Inlays, sodass die Plasmaerzeugung lediglich über der künstlichen Haut erfolgte und das Behandlungsmedium durch eine Plastikschiicht von der Plasmaquelle isoliert war. Im Gegensatz hierzu lagen die Spalthautstücke frei im Behandlungsmedium, sodass eine über das Medium vermittelte Toxizität angenommen werden könnte.

Jedoch kann festgehalten werden, dass durch die Behandlung nach dem gleichen Protokoll wie für die Haut-Korrosionstests signifikant unterschiedliche Werte für die Zell-Viabilität generiert werden konnten.

4.3 Wirkung auf frei liegende Fibroblasten

Etablierung der Behandlungsdauer

Gesucht wurde nicht nach einer sinnvollen Behandlungsdauer für eine klinische Anwendung, sondern nach einer kritischen Behandlungszeit, die zum Zelluntergang führt, sodass Ursachen für die toxischen Effekte untersucht werden können. Es konnte eine signifikante Viabilitätsminderung von ca. 25 % in einem Volumen von 250 µl nach einer fünfminütigen Behandlung erreicht werden (vgl. Abb. 23 Seite 61).

Generell sollte beachtet werden, dass die hier etablierten Zeiten keinerlei Hinweise auf mögliche/notwendige Behandlungszeiten geben.

Eine Untersuchung z.B. auf das mögliche Keimspektrum einer Wunde hat ebenfalls nicht stattgefunden. Dies bedeutet, dass aus den Ergebnissen der Versuche keine Rückschlüsse auf die Wirkung/Sinnhaftigkeit der Anwendung im Wundsetting zur Dekontamination gezogen werden können. Zudem gibt es keinerlei Hinweise darauf, ob die verwendeten Behandlungszeiten im Rahmen einer medizinischen Anwendung überhaupt wirksam wären. Um einen toxischen Effekt festzustellen, wurden in dieser Arbeit Behandlungszeiten von 5 Minuten genutzt. Verglichen mit dem auf dem Markt vorhandenen Plasmaderm (Behandlungszeit 90s) ist diese Zeit deutlich länger.

Intrazelluläre Induktion von oxidativem Stress

Um radikale Sauerstoffspezies als Ursache des gemessenen Zelluntergangs zurückführen zu können, muss auch sichergestellt sein, dass die durch DBD gebildeten Sauerstoffradikale tatsächlich an den behandelten Zellen ankommen bzw. intrazellulären Stress induzieren. Hierfür wurde mit einem selektiv durch intrazelluläre Sauerstoffradikale aktivierten Farbstoff gearbeitet. Hierbei konnte zwar, wie erwartet, nachgewiesen werden, dass das Signal eines intrazellulären Farbstoffes signifikant stärker umgesetzt wird, wenn die Probe mittels DBD behandelt wurde, die Dimension der ermittelten Messerwerte war jedoch relativ gering. Die ermittelte Signifikanz steht jedoch durchaus im Einklang mit den zuvor ermittelten Werten und

der nachgewiesene Zelluntergang kann durchaus auf intrazelluläre Erhöhung von Sauerstoffradikalen zurückzuführen sein (vgl. Abb. 16 Seite 54).

Direkte/Indirekte Toxizität

Im Rahmen der Versuchsetablierung wurde ebenfalls getestet, ob die indirekte Behandlung von Zellen über plasmabehandeltes Medium zu einem toxischen Effekt führt und ob Ascorbat die vermittelte Toxizität mindern kann. Hierbei konnte festgestellt werden, dass eine signifikante Viabilitätsreduktion der Zellen ebenfalls durch plasmabehandelte Pufferlösung erreicht werden konnte. Dieser Effekt war durch Ascorbat signifikant antagonisierbar (vgl. Abb. 17 Seite 55).

Hieraus kann geschlossen werden, dass das direkte Erreichen der Zellen von Sauerstoffradikalen durch die Art der Plasmaerzeugung nicht der maßgeblich toxizitätsvermittelnde Effekt ist. Zudem kann daraus geschlossen werden, dass Sauerstoffspezies, die eine Halbwertszeit im Mikrosekundenbereich haben, nicht unmittelbar an der Effektvermittlung beteiligt sind. Hingegen liegt die Halbwertszeit von Wasserstoffperoxid deutlich höher (Peđziwiatr et al. 2018), sodass eine Veränderung der Viabilität durch eine Erhöhung der Wasserstoffperoxidkonzentration im Behandlungsmedium der Probe erklärbar wäre. Dies wäre im Einklang mit der im Vorfeld durch Dichloro-Dihydro-Fluoreszein-Diacetat nachgewiesenen signifikanten Signalerhöhung nach Plasmabehandlung. Zudem ist der Effekt teilweise durch Ascorbat abschwächbar. Dieses kann durch sein Reduktionspotential Wasserstoffperoxid zu Kohlenstoffdioxid und Wasser abbauen. (Kvernberg et al. 1994)

Die Tatsache, dass indirekt behandeltes Plasma ebenfalls zu einer Abnahme der Viabilität führt, sowie die Tatsache, dass unter Verwendung von verschiedenen Antioxidantien keine vollständige Aufhebung des durch DBD vermittelten Zellschadens möglich ist, legt jedoch auch den Schluss nahe, dass weitere Mechanismen eine Rolle in der Vermittlung der Toxizität spielen dürften. Alternativ ist es möglich, dass die Größenordnung, in der Radikale entstehen die Schutzwirkung der verwendeten Antioxidantien übersteigt und folglich deren Konzentrationen nicht ausreichend waren.

Art des Zelluntergangs

Ein Zelluntergang durch oxidativen Stress ist schon länger bekannt und wird durch Lipidperoxidation, oxidative Proteinmodifikationen und DNA-Schädigung vermittelt. (Schmidt 2011) Der durch Apoptose beobachtete Zelluntergang entspricht also den Erwartungen bei durch zu großen oxidativen Stress verursachtem Zelluntergang. Entsprechend konnte eine signifikante PARP-Protein-Erhöhung in behandelten Kulturen nachgewiesen (vgl. Abb. 24 Seite 62) werden und auch der durchgeführte TUNEL-Assay weist Apoptose durch Plasmabehandlung nach (vgl. Abb. 25 Seite 64), wenn auch aufgrund der geringen Versuchszahl keine statistische Auswertung durchgeführt werden konnte.

Im Apoptosenachweis mittels Westernblot und PARP-Bestimmung zeigte sich die Positivkontrolle unerwartet nicht signifikant. Dies kann verschiedene Ursachen haben, so kann entweder die verwendete Konzentration von Staurosporin nicht ausgereicht haben, um eine entsprechend hohe Anzahl von Zellen zur Apoptose zu zwingen, es kann ein Messfehler vorgelegen haben oder die verwendeten Substanzen können fehlerhaft gewesen sein.

Im TUNEL-Assay zeigte sich an den durchgeführten Schnitten das erwartete Bild. So waren mittels verwendeter Färbung nach einstündiger Behandlung DNA-Doppelstrangbrüche nachweisbar, augenscheinlich mehr als auf der unbehandelten Probe und deutlich weniger als bei der mittels UV-Strahlung behandelten Positivkontrolle. Hier sind jedoch weitere Untersuchungen und weitere Versuchsdurchführungen zur quantitativen Auswertung und Signifikanzermittlung notwendig.

Schützender Effekt durch Antioxidantien

Um die Beteiligung von Sauerstoffradikalen für den durch DBD vermittelten Zelluntergang zu untersuchen, wurde nun versucht, den beobachteten toxischen Effekt mittels Antioxidantien zu antagonisieren. Hierfür wurden verschiedene Antioxidantien vor der DBD-Behandlung zur biologischen Probe gegeben und die Behandlung unter Anwesenheit dieser Stoffe durchgeführt. Von allen verwendeten Stoffen waren sowohl Ascorbat als auch NAC in der Lage, die zytotoxische Wirkung deutlich zu reduzieren. In der Untersuchung zeigte sich nach Behandlung eine signifikant geringere Toxizität/höhere Viabilität, wenn Antioxidantien anwesend waren.

Dennoch waren die gemessenen Viabilitätswerte stets signifikant geringer, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle (vgl. Kapitel 3.5.3 Seite 65).

Dennoch kann hieraus ein toxischer Effekt abgeleitet werden, der zu einer Zellschädigung führt und durch Antioxidantien zumindest teilweise reversibel ist. Daraus erschließt sich, dass oxidativer Stress für die Induktion der Apoptose zumindest mitverantwortlich ist.

Da die verwendeten Antioxidantien und Farbstoffe auf Wasserstoffperoxid reagieren und die Beobachtung, dass eine indirekte Toxizität induziert werden kann, liegt der Schluss nahe, dass Wasserstoffperoxid zumindest einen Teil der Toxizität ausmacht.

Die Tatsache, dass der toxische Effekt durch die DBD-Behandlung nicht vollständig durch Antioxidantien reversibel ist, legt nahe, dass zum einen die Konzentration der verwendeten Antioxidantien nicht ausgereicht haben könnte, um den induzierten oxidativen Stress vollständig auszugleichen. Zum anderen könnte ein weiterer Radikal-unabhängiger Mechanismus die übrige Toxizität vermitteln.

Eine Anwendung bei vitalem Gewebe wird durch das verwendete Setting in diesem Fall nicht aussagekräftig wiedergegeben, da Wasserstoffperoxid einen hohen Eiweißfehler ausweist, also durch hohe Eiweißkonzentrationen inaktiviert wird. (J.T. Walker 2014) Dieser wurde zur Effektsicherung durch PBS als verwendetes Behandlungsmedium bewusst ausgeblendet. Folglich ist eine Übertragung lediglich der Mechanismen, nicht jedoch der Behandlungszeiten und Effektstärke auf ein *in vivo* Setting möglich.

5 Schlussfolgerungen

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch bei längeren Anwendungszeiten der hier genutzten DBD-Quelle keine Schädigung an intakter Epidermis zu erwarten ist. Weder findet sich ein Zelluntergang, noch werden Entzündungsmediatoren ausgeschüttet.

Es gibt aber Hinweise darauf, dass eine Verminderung der Viabilität bzw. Stoffwechselaktivität durch Plasma in nicht intakter Haut möglich ist.

In den Zellkulturversuchen mit Fibroblasten kommt es z.B. nach einer fünfminütigen Behandlung zu einer signifikanten Reduktion der Zell-Viabilität. Des Weiteren konnten auch direkte toxische Effekte in bestimmten Bereichen des Zellrasens festgestellt werden, die ein Hinweis sind, dass die Flüssigkeitsschicht eine entscheidende Rolle spielt. Neben einer Plasma-induzierten Ansäuerung und Erhöhung der Osmolarität, wahrscheinlich durch Anreicherung von Nitrit/Nitrat, scheint neben plasmagenerierten kurzlebigen Radikalen insbesondere auch die Akkumulation des längerlebigen Wasserstoffperoxids entscheidend für zelluläre Effekte wie Zelltod und intrazellulären oxidativen Stress zu sein.

Daher ist davon auszugehen, dass in einer Wunde, bei der die epidermale Barriere fehlt, eine Plasmabehandlung mannigfaltige Effekte zeigen könnte. Ob negative Effekte auf die Zell-Viabilität mögliche positive Effekte, z.B. Keimreduktion übersteigen, kann mit dieser Arbeit nicht geklärt werden und ist Gegenstand aktueller Studien der Plasmamedizin.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vereinfachte schematische Darstellung der Erzeugung von DBD. Im elektrischen Wechselfeld werden Elektronen beschleunigt und ionisieren weitere Atome und Moleküle.....	12
Abbildung 2: Nahaufnahme mit einer Hochgeschwindigkeitskamera von DBD-Entladungen über humaner Dermis. Es zeigen sich elektrische Entladungen in Form von Filamenten. (Bilder mit freundlicher Genehmigung der Ruhr-Universität Bochum).....	12
Abbildung 3: „Plasmaderm“ von CINOGY.....	13
Abbildung 4: Aufbau der menschlichen Haut, Querschnitt der Haut (Skin Care Forum Ausgabe 27, www.scfonline.com, Cognis, Deutschland GmbH & Co. KG, modifiziert).....	15
Abbildung 5 A : Verwendete Plasmaquelle über einer 24-Well-Platte B : Schema der die durch ein Dielektrikum isolierten Elektrode der Plasmaquelle über einem Flüssigkeit enthaltenden Zellkulturschale mit Fibroblasten (Balzer, J., et al. 2015).....	20
Abbildung 6 A : Arbeitsumgebung unter einer Sterilbank für die Arbeit mit Episkin. Gearbeitet wurde stets auf einem sterilen Tuch, um die Kontaminationsgefahr der Proben so gering wie möglich zu halten. B : Die Episkin-Stücke wurden unter sterilen Bedingungen von der Kollagenmatrix, in der sie vom Hersteller geliefert wurden, in eine 12-Well-Platte mit Kulturmedium überführt. C : Episkin in Kulturmedium.	29
Abbildung 7: Aufbau der Blotting-Apparatur für den Westernblot, schematisch.....	37
Abbildung 8: Well-Platte mit eingefärbtem PBS. Mittig zeigt sich nach Plasmabehandlung ein trockener Bereich.	45
Abbildung 9: Übersichtsbilder von den Böden der Wells einer 24-Well-Platte nach einminütiger Plasmabehandlung unter einem PBS-Volumen von 215 µl oder 200 µl bzw. ohne Plasmabehandlung. Gefärbt wurde mit FDA (oben) und PI (unten).	46
Abbildung 10: Plasmabehandlung mit verschiedenen Volumina und verschiedenen Behandlungszeiten (0-600 s). Es zeigt sich lediglich bei 100 µl ein signifikanter Abfall des pH-Wertes (n=8, p < 0,05, T-Test).	47
Abbildung 11: Haut-pH-Wert bei Plasma-Behandlung. Änderung des Oberflächen-pH-Wertes einer Hautprobe bei Plasmabehandlung (n=3-5).	47
Abbildung 12: Menge der NOD (Nitrit und Nitrat) sowie der pH-Wert nach Plasma-Behandlung der angegebenen Dauer. Gezeigt werden die Mittelwerte sowie die SD (n=6).	48
Abbildung 13: Osmolaritätsmessungen nach Plasmabehandlung (10 min) von Proben unterschiedlichen Volumens. Ein signifikanter Unterschied der Osmolarität zeigt sich in den Probengrößen von 50-200 µl. Bei einer 300 µl großen Probe war die Osmolarität nach 10minütiger Behandlung nicht signifikant unterschiedlich (n=4, p<0,05, T-Test).	49
Abbildung 14: Osmolaritätsmessung nach Plasmabehandlung (5 min) von 250µl PBS. Ein statistisch signifikanter Unterschied der Osmolarität liegt nach erfolgter Plasmabehandlung nicht vor (n=4, p<0,05, T-Test).	49
Abbildung 15: Einfluss von vorheriger Plasmabehandlung auf die Zell-Viabilität: Resazurin-Assay (Gemessenes Signal / Ein signifikanter Unterschied im Viabilitätssignal pro Zelle konnte nicht festgestellt werden (n=8, p<0,05, T-Test).	50
Abbildung 16: Plasmabehandlung von mit DCH2FDA gefärbten Zellen. Verglichen wurden ungefärbte Zellen (Kontrolle -) und gefärbte unbehandelte (Kontrolle +) mit gefärbten behandelten Zellen (fünfminütige Plasmabehandlung). Gemessen wurde die Absorption bei 490 nm (N=5, p < 0,05, Mann Whitney Test).	51

<i>Abbildung 17: Direkte und Indirekte Plasmabehandlung: A: Fibroblastenbehandlung mittels DBD 60-300 s) ± Ascorbat (asc; 1,0 mM) – Viabilitätsmessung 24 Stunden nach Behandlung mittels Resazurin Assay (CellTiter Blue) B: fünfminütige Behandlung in mit DBD behandeltem Puffer (0-300 s) bzw Pufferansatz mit Nitrit (300 µM), Nitrat (1 mM) sowie H₂O₂ (200 µM) (n=5, T-Test, * p < 0,05 im Vgl. mit der Kontrolle, # p < 0,05 im Vgl. mit der Behandlung ohne asc.)</i>	52
Abbildung 18: Gemessene Absorption der MTT-Färbelösungen der Proben (n=8, p<0,05, One Way Anova – Signifikanz der Positivkontrolle nicht eingezeichnet)	53
Abbildung 19: Haut-Korrosion mit Spalthaut (0,7 mm): Spalthautstücke wurden analog zur EpiSkin (eine Stunde Plasma-Behandlung) und die Positivkontrolle mit 8M NaOH behandelt. Die Auswertung erfolgte mittels Resazurin-Assay (CellTiter Blue) (n=6, One-Way Anova).....	54
Abbildung 20: Gemessene Absorption der MTT-Färbelösungen der nach dem Skin Irritation Protokoll der Firma SkinEthics behandelten EpiSkin-Stücke. Ein signifikanter Unterschied zwischen behandelter Probe und jeweiliger Kontrolle ist nicht gegeben (n = 9, T-Test – Signifikanz der Positivkontrolle nicht eingezeichnet).....	55
Abbildung 21: Gemessen IL-1α Konzentration der behandelten Probe und Kontrolle. Gemessen wurde die Absorption bei 570 nm und mittels Eichkurve die Konzentration ermittelt. Ein statistisch signifikanter Unterschied liegt nicht vor (n = 9, T-Test).	56
Abbildung 22: Mittels Hautstanze gewonnene Spalthautproben wurden analog zum Skin Irritation Assay mit DBD behandelt (15 min). Die Auswertung erfolgte mittels Resazurin-Assay. Die Probe war zur Kontrolle und Positivkontrolle signifikant unterschiedlich (n=6, one-way-ANOVA, p < 0,05 – Signifikanz der Positivkontrolle nicht eingezeichnet).	56
Abbildung 23: Plasmabehandlung von 80.000 Fibroblasten mit 250µl PBS Behandlungsmedium. Auswertung mittels Resazurin-Assay (n = 8, p < 0,001 – ANOVA).....	57
Abbildung 24: Zum Nachweis von Apoptose als Ursache des zuvor beschriebenen Zelluntergangs wurde eine PARP-Bestimmung mittels Westernblot vorgenommen. Positivkontrolle mit 0,2 µM Staurosporin (n = 4, p<0,05, Kruskal-Wallis Test).	58
Abbildung 25: Fluoreszenzmikroskopisch ausgewerteter TUNEL-Assay zur Apoptose-Bewertung von DBD behandelter künstlich gezüchteter Epidermis (EpiSkin). A1 : Positivkontrolle nach 30 Minuten UVB-Behandlung, dargestellt mit FITC-Filter. A2 : Positivkontrolle nach 30 Minuten UVB-Behandlung, dargestellt mit DAPI-Filter. B1 : Probe nach 60 Minuten Plasma-Behandlung, dargestellt mit FITC-Filter. B2 : Probe nach 60 Minuten Plasma-Behandlung, dargestellt mit DAPI-Filter. C1 : Kontrolle ohne Behandlung, dargestellt mit FITC-Filter. C2 : Kontrolle ohne Behandlung, dargestellt mit DAPI-Filter.	59
Abbildung 26:Plasmabehandlung mit Radikalfängern. Die verwendeten Konzentrationen der Antioxidantien waren für Ascorbat (ASC): 1 mM, für Mannitol (Man): 10 mM und für NAC: 1 mM (N = 6, p<0,05, 1-way-Anova).....	60

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Risikofaktoren für Wundheilungsstörungen (Avishai et al. 2017)	17
Tabelle 2: Einwegmaterialien	22
Tabelle 3: Antikörper	22
Tabelle 4: Medien, Chemikalien und Reagenzien	22
Tabelle 5: Verwendete technische Geräte	24
Tabelle 6: verwendete Software	25
Tabelle 7: Volumina der verwendeten Kulturgefäße	27
Tabelle 8: Verwendete Trypsinmengen zur Zellpassagierung	28
Tabelle 9: Für Westernblot verwendete Materialien	35
Tabelle 10: Fixieren und Einbetten der Proben (TUNEL-Assay)	38
Tabelle 11: Deparaffinierung der Proben (TUNEL-Assay)	39

8 Literatur- und Quellenverzeichnis

Alisoy, H. Z. and M. Koseoglu (2013). "The changes in electrical and interfacial properties of polyimide exposed to dielectric barrier discharge in SF(6) medium." ScientificWorldJournal **2013**: 890454.

Anaghizi, Saeed Javadi; Talebizadeh, Pouyan; Rahimzadeh, Hassan; Ghomi, Hamidreza (2015): The Configuration Effects of Electrode on the Performance of Dielectric Barrier Discharge Reactor for NO_x Removal. In *IEEE Trans. Plasma Sci.* 43 (6), pp. 1944–1953. DOI: 10.1109/TPS.2015.2422779.

Aon, Miguel A.; Cortassa, Sonia; Marbán, Eduardo; O'Rourke, Brian (2003): Synchronized whole cell oscillations in mitochondrial metabolism triggered by a local release of reactive oxygen species in cardiac myocytes. In *The Journal of biological chemistry* 278 (45), pp. 44735–44744. DOI: 10.1074/jbc.M302673200.

Arjunan, K. P., et al. (2012). "Non-thermal dielectric barrier discharge plasma induces angiogenesis through reactive oxygen species." J R Soc Interface **9**(66): 147-157.

Aubin, Francois (2003): Mechanisms involved in ultraviolet light-induced immunosuppression. In *European journal of dermatology : EJD* 13 (6), pp. 515–523.

Avishai, Eden; Yeghiazaryan, Kristina; Golubnitschaja, Olga (2017): Impaired wound healing: facts and hypotheses for multi-professional considerations in predictive, preventive and personalised medicine. In *The EPMA journal* 8 (1), pp. 23–33. DOI: 10.1007/s13167-017-0081-y.

Balzer, Julian; Heuer, Kiara; Demir, Erhan; Hoffmanns, Martin A.; Baldus, Sabrina; Fuchs, Paul C. et al. (2015): Non-Thermal Dielectric Barrier Discharge (DBD) Effects on Proliferation and Differentiation of Human Fibroblasts Are Primary Mediated by Hydrogen Peroxide. In *PLoS one* 10 (12), e0144968. DOI: 10.1371/journal.pone.0144968.

Bekeschus, S., et al. (2014). "Hydrogen peroxide: A central player in physical plasma-induced oxidative stress in human blood cells." Free Radic Res **48**(5): 542-549.

Berridge, M. V. and A. S. Tan (1993). "Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction." Arch Biochem Biophys **303**(2): 474-482.

Bertoldi, S., et al. (2015). "Exploiting novel sterilization techniques for porous polyurethane scaffolds." J Mater Sci Mater Med **26**(5): 182.

Bibinov, N., et al. (2011). "Spectroscopic characterization of an atmospheric pressure μ -jet plasma source." Journal of Physics D: Applied Physics **44**(34): 345204.

Bowler, Philip G. (2002): Wound pathophysiology, infection and therapeutic options. In *Annals of medicine* 34 (6), pp. 419–427. DOI: 10.1080/078538902321012360.

Brehmer, F., et al. (2015). "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 **29**(1): 148-155.

Burg, Maurice B.; Ferraris, Joan D.; Dmitrieva, Natalia I. (2007): Cellular response to hyperosmotic stresses. In *Physiological reviews* 87 (4), pp. 1441–1474. DOI: 10.1152/physrev.00056.2006.

CARREL, A. (1923). "A METHOD FOR THE PHYSIOLOGICAL STUDY OF TISSUES IN VITRO." THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE XXXVIII: 407-418.

Doran, T. I.; Vidrich, A.; Sun, T. T. (1980): Intrinsic and extrinsic regulation of the differentiation of skin, corneal and esophageal epithelial cells. In *Cell* 22 (1 Pt 1), pp. 17–25. DOI: 10.1016/0092-8674(80)90150-6.

Eckert, R. L. (1989): Structure, function, and differentiation of the keratinocyte. In *Physiological reviews* 69 (4), pp. 1316–1346. DOI: 10.1152/physrev.1989.69.4.1316.

Emmert, S., et al. (2013). "Atmospheric pressure plasma in dermatology: Ulcus treatment and much more." Clinical Plasma Medicine 1(1): 24-29.

Fentem, J. H., et al. (1998). "The ECVAM International Validation Study on In Vitro Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team." Toxicol In Vitro 12(4): 483-524.

FINTER, N. B. (1969). "Dye Uptake Methods for Assessing Viral Cytopathogenicity and their Application to Interferon Assays." J. gen. ViroL 5: 419-427.

Fridman, A. (2008). Plasma Chemistry, Cambridge University Press.

Galvez, A.; Morales, M. P.; Eltit, J. M.; Ocaranza, P.; Carrasco, L.; Campos, X. et al. (2001): A rapid and strong apoptotic process is triggered by hyperosmotic stress in cultured rat cardiac myocytes. In *Cell and tissue research* 304 (2), pp. 279–285. DOI: 10.1007/s004410100358.

Gavrieli, Y.; Sherman, Y.; Ben-Sasson, S. A. (1992): Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. In *The Journal of cell biology* 119 (3), pp. 493–501. DOI: 10.1083/jcb.119.3.493.

Gillitzer, R. (2002): Modern wound management. In *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete* 53 (2), 130-45; quiz 146-7. DOI: 10.1007/s00105-001-0335-3.

Gorynia, S., et al. (2013). "In vitro efficacy of cold atmospheric pressure plasma on *S. sanguinis* biofilms in comparison of two test models." GMS Hyg Infect Control 8(1): Doc01.

Haake, A. R.; Holbrook, K. (1999): The Structure and Development of Skin. *Dermatology in General Medicine*, 70–114: McGraw Hill, New York.

Isbary, G., et al. (2012). "Successful and safe use of 2 min cold atmospheric argon plasma in chronic wounds: results of a randomized controlled trial." Br J Dermatol 167(2): 404-410.

Ishida, C., et al. (2016). "Non-thermal plasma prevents progression of endometriosis in mice." Free Radical Research: 1-9.

Jablonski, L., et al. (2016). "Removal of naturally grown human biofilm with an atmospheric pressure plasma jet: An in-vitro study." J Biophotonics.

J.T. Walker (Ed.) (2014): *Decontamination in Hospitals and Healthcare*: Woodhead Publishing.

Jimbow, K.; Quevedo, W. C., JR; Fitzpatrick, T. B.; Szabo, G. (1976): Some aspects of melanin biology: 1950-1975. In *The Journal of investigative dermatology* 67 (1), pp. 72–89. DOI: 10.1111/1523-1747.ep12512500.

- Joshi, S. G., et al. (2011). "Nonthermal dielectric-barrier discharge plasma-induced inactivation involves oxidative DNA damage and membrane lipid peroxidation in *Escherichia coli*." Antimicrob Agents Chemother **55**(3): 1053-1062.
- Kandarova, H., et al. (2006). "Assessment of the human epidermis model SkinEthic RHE for in vitro skin corrosion testing of chemicals according to new OECD TG 431." Toxicol In Vitro **20**(5): 547-559.
- Kogelschatz, U., et al. (1997). "Dielectric-Barrier Discharges. Principle and Applications." Le Journal de Physique IV **07**(C4): C4-47-C44-66.
- Krams, Matthias; Frahm, Sven Olaf (2013): *Kurzlehrbuch Pathologie*. 2. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Kvernberg, Per; Pedersen, Bjørn; Nikonova, Irina; Zhivich, Alexander; Ostrovskii, Vladimir; Napoli, Anna et al. (1994): Oxidation of L-Ascorbic Acid with Hydrogen Peroxide in Aqueous Solution. In *Acta Chemica Scandinavica - ACTA CHEM SCAND* **48**, pp. 646–651. DOI: 10.3891/acta.chem.scand.48-0646.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." Nature **227**: 680-685.
- Lee, H. W.; Park, G. Y.; Seo, Y. S.; Im, Y. H.; Shim, S. B.; Lee, H. J. (2011): Modelling of atmospheric pressure plasmas for biomedical applications. In *J. Phys. D: Appl. Phys.* **44** (5), p. 53001. DOI: 10.1088/0022-3727/44/5/053001.
- Leroy, C.; Colmont, C.; Pisam, M.; Rousselet, G. (2000): Different responses to acute or progressive osmolarity increases in the mIMCD3 cell line. In *European journal of cell biology* **79** (12), pp. 936–942. DOI: 10.1078/0171-9335-00119.
- Li, Jianze; Lee, Brenda; Lee, Amy S. (2006): Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53. In *The Journal of biological chemistry* **281** (11), pp. 7260–7270. DOI: 10.1074/jbc.M509868200.
- M.K. Robinson, C. Cohen, A. de Brugerolle de Fraissinettec, and E. W. M. Ponced, J.H. Fenteme (2002). "Non-animal testing strategies for assessment of the skin corrosion and skin irritation potential of ingredients and finished products." Food and Chemical Toxicology **40**.
- Mohd Nasir, N., et al. (2016). "Cold plasma inactivation of chronic wound bacteria." Arch Biochem Biophys **605**: 76-85.
- Morfill, G. E., et al. (2009). "Nosocomial infections—a new approach towards preventive medicine using plasmas." New Journal of Physics **11**(11): 115019.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." J Immunol Methods **65**(1-2): 55-63.
- Nast, A.; Griffiths, C. E. M.; Hay, R.; Sterry, W.; Bolognia, J. L. (2016): The 2016 International League of Dermatological Societies' revised glossary for the description of cutaneous lesions. In *Br J Dermatol* **174** (6), pp. 1351–1358. DOI: 10.1111/bjd.14419.
- Neiger, M.; Liu, S. (2001): Excitation of Dielectric Barrier Discharges by Unipolar, Submicrosecond, Square Pulses. In : Tagungsband / 10. Bundesdeutsche Fachtagung Plasmatechnologie, 28.02. - 02.03.2001, Greifswald. Ed.: G. Babucke: Inst. für Niedertemperatur-Plasmaphysik.

- Oh, S., et al. (2016). "Ablation of residual gastric tumor by argon plasma coagulation after endoscopic resection." Surgical Endoscopy: 1-8.
- Opländer, C. (2009). Biologische Aspekte der nicht-enzymatischen Stickstoffmonoxid-Generierung durch UVA-induzierten Nitritzerfall in humanen Hautfibroblasten. Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften, RWTH Aachen: 103.
- Oplander, C., et al. (2011). "Effects of blue light irradiation on human dermal fibroblasts." J Photochem Photobiol B **103**(2): 118-125.
- P. R. MUSSINI, T. M. A. S. R. (1997). "REFERENCE VALUE STANDARDS AND PRIMARY STANDARDS FOR pH MEASUREMENTS IN D2O AND AQUEOUS-ORGANIC SOLVENT MIXTURES: NEW ACCESSIONS AND ASSESSMENTS " Pure & Appl. Chem **69**(5): 1007-1014.
- Pędziwiatr, Paulina; Mikołajczyk, Filip; Zawadzki, Dawid; Mikołajczyk, Kinga; Bedka, Agnieszka (2018): Decomposition of hydrogen peroxide - kinetics and review of chosen catalysts. In *Acta Innovations*, pp. 45–52. DOI: 10.32933/ActaInnovations.26.5.
- Pollock, S. V. (2008). Dermatology, Mosby.
- Quevedo, W. C., JR; Fleischmann, R. D. (1980): Developmental biology of mammalian melanocytes. In *The Journal of investigative dermatology* 75 (1), pp. 116–120. DOI: 10.1111/1523-1747.ep12521335.
- Rineke H.G. Steenbergen a, Gregor P.C. Drummen a, Jos A.F. Op den Kamp a, Jan A. Post b (1997). "The use of cis-parinaric acid to measure lipid peroxidation in cardiomyocytes during ischemia and reperfusion." Biochimica et Biophysica Acta: 127-137.
- Robinson, V. (1934). The Modern Home Physician: A New Encyclopedia of Medical Knowledge : Illustrated with Two Hundred and Thirty-two Photographs and Nearly Seven Hundred Drawings Made Expressly for this Work, W.H. Wise.
- Roguet, R., et al. (1994). "The use of in vitro reconstituted human skin in dermatotoxicity testing." Toxicol In Vitro **8**(4): 635-639.
- Rüdiger Kramme, K.-P. H., Robert S. Pozos (2011). Handbook of Medical Technology, Springer.
- Schmidt, R. F. L., Florian; Heckmann, Manfred (2011). Physiologie des Menschen. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag.
- Scholtz, V., et al. (2015). "Nonthermal plasma--A tool for decontamination and disinfection." Biotechnol Adv **33**(6 Pt 2): 1108-1119.
- Schwering, N. (2016). Der Einfluss der Osmolarität des Kulturmediums sowie unterschiedlicher Kationenkanalblocker auf die Migration von Oligodendrozytenvorläuferzellen. Fakultät für Chemie Ruhr-Universität Bochum
- Senegal, P. (1976): Morphogenesis of skin: Cambridge University Press. In *7(1)*, pp. 1–10.
- Sharma, Vishal; Kaur, Ramandeep; Bhatnagar, Archana; Kaur, Jagdeep (2015): Low-pH-induced apoptosis: role of endoplasmic reticulum stress-induced calcium permeability and mitochondria-dependent signaling. In *Cell stress & chaperones* 20 (3), pp. 431–440. DOI: 10.1007/s12192-014-0568-6.

- STENN KS (1983): The Skin. In *Histology. Cell and Tissue Biology* 5th edn. (ed. L. Weiss), pp. 569-605.
- TERRI SUNDQUIST m.s. (2006): Timing your apoptosis assays. In *CELL NOTES* (16), pp. 18–21.
- Tornier, C., et al. (2010). "Assessment of the optimized SkinEthic Reconstructed Human Epidermis (RHE) 42 bis skin irritation protocol over 39 test substances." *Toxicol In Vitro* **24**(1): 245-256.
- Wardman, P. (2007). "Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects." *Free Radic Biol Med* **43**(7): 995-1022.
- Wardman, P. (2008). "Methods to measure the reactivity of peroxynitrite-derived oxidants toward reduced fluoresceins and rhodamines." *Methods Enzymol* **441**: 261-282.
- Watt, B. E., et al. (2004). "Hydrogen peroxide poisoning." *Toxicol Rev* **23**(1): 51-57.
- Wayne Zundel, A. G. (1998). "Inhibition of the anti-apoptotic PI(3)K/Akt/Bad pathway by stress." *GENES & DEVELOPMENT* **12**: 1941-1946.
- Wild, Thomas; Auböck, Josef (2007): *Manual der Wundheilung. Chirurgisch-dermatologischer Leitfaden der modernen Wundbehandlung*. Vienna: Springer-Verlag/Wien. Available online at <http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10217689>.
- Wolff, K. (1973): Melanocyte-keratinocyte interactions in vivo: the fate of melanosomes. In *Yale J Biol Med* **46** (5), pp. 384–396. Available online at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4779127>.

9 Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Suschek und Herrn Professor Dr. Windolf für die Möglichkeit bedanken, meine Dissertation im Forschungslabor der Unfall- und Handchirurgie anfertigen zu dürfen.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Christian Opländer, der meine Arbeit mehrere Jahre betreute und dabei nicht nur ein Kollege war sondern ein Freund wurde.

Frau Dr. Grotheer und der gesamten Arbeitsgruppe, allen voran den Technischen Assistentinnen Samira Seghrouchni, Christa Wilkens und Jutta Schneider danke ich für eine lehrreiche Zeit und insbesondere die technische Hilfe im Labor. Außerdem danke ich Frau Dr. Benita Sahlender, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, die mich motiviert und immer unterstützt haben.