

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

Die Effekte der dielektrischen Barriereentladung (DBD) auf die Vitalität von humanen Fibroblasten

Dissertation

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

vorgelegt von
Stephanie Martina Schöpe

2023

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

Gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachter: PD Dr. rer. nat. Csaba Mahotka

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben und mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. rer. nat. Christoph Suschek und PD Dr. rer. nat. Christian Opländer für die Betreuung der Arbeit. Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Joachim Windolf und dem gesamten Forschungsteam für ihre Unterstützung bedanken.

Ein großes Dankeschön gilt außerdem meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere meinen Eltern, meiner Schwester und meinem Verlobten. Danke, dass ihr immer für mich da seid.

I. Zusammenfassung

Plasma ist ein energiereiches Gasgemisch, welches auch als der vierte Aggregatzustand bezeichnet wird. Mit der Entwicklung des kalten Atmosphärendruckplasmas (CAP) ist das Interesse an dem energiereichen Gasgemisch insbesondere im medizinischen Bereich deutlich gestiegen, da neue Möglichkeiten im Hinblick auf die Behandlung von menschlichem Gewebe eröffnet werden. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden die Effekte einer Kaltplasmaquelle, der sogenannten *Dielectric Barrier Discharge* (DBD), auf humane dermale Fibroblasten (HDF) untersucht. Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Effekte der Variation der Behandlungsdauer (30–600 s) und -frequenz (120–600 Hz) auf die Entstehung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RONS) sowie hinsichtlich der Viabilität von humanen dermalen Fibroblasten genauer zu definieren. Die Erhöhung der Behandlungsdauer und -frequenz geht mit einem vermehrten Abfall des pH-Wertes sowie einem stärkeren Anstieg der Plasma-induzierten RONS einher. Die Effekte der RONS sind konzentrationsabhängig. In niedriger Dosis wirkt die Plasma-behandlung auf Fibroblasten wachstumsfördernd, während höhere Dosierungen toxische Effekte haben. Die Toxizität des Plasmas lässt sich jedoch nicht alleine durch die Entstehung von RONS begründen. Die klinische Anwendung von CAP ist insbesondere im Hinblick auf die Behandlung von chronischen Wunden von großem Interesse. Die antibakterielle Wirksamkeit des Plasmas ist bereits nachgewiesen. Weiterhin kann durch diese Arbeit belegt werden, dass eine kurze CAP-Behandlung (30 s) mit einer niedrigen Behandlungsfrequenz (120 Hz) proliferationsfördernd auf HDF wirkt. Diese Effekte können sich positiv auf die Wundheilung auswirken. Auf Grund der Toxizität auf HDF scheint die klinische Anwendung einer Behandlungsfrequenz von 600 Hz mit einer Behandlungsdauer von 10 min nicht empfehlenswert. Es sind weitere Untersuchungen notwendig, um die Toxizität und Art des Zelltodes durch das Plasma genauer zu definieren. Neben den RONS kommen hierfür weitere Faktoren wie beispielsweise elektromagnetische Strahlung oder UV-Licht in Betracht. Weiterhin sollten die Effekte einer sehr kurzen Behandlungsdauer (< 30 s) bei hoher Behandlungsfrequenz untersucht werden. Möglicherweise könnten trotz hoher Behandlungsfrequenz die positiven Eigenschaften des Plasmas, wie die proliferationsfördernden und antibakterielle Effekte, bei geringer Toxizität genutzt werden.

II. Summary

Plasma is an energy-rich gas mixture, which is also referred to as the fourth state of matter. With the development of cold atmospheric pressure plasma (CAP), interest in the high-energy gas mixture has increased significantly, especially in the medical field, as new possibilities are opened up with regard to the treatment of human tissue. In this dissertation, the effects of a cold plasma source, the so-called Dielectric Barrier Discharge (DBD), on human dermal fibroblasts (HDF) were investigated. The aim of this work is to define more precisely the effects of varying the treatment duration (30–600 s) and frequency (120–600 Hz) on the development of reactive oxide and nitrogen species (RONS) and on the viability of human dermal fibroblasts. The increase in treatment duration and frequency is accompanied by an enhanced decrease in pH and a higher increase in plasma-induced RONS. The effects of the RONS are concentration dependent. At low doses, plasma treatment has a growth-promoting effect on fibroblasts, whereas higher doses have toxic effects. However, plasma toxicity cannot be explained by the generation of RONS alone. The clinical application of CAP is of major interest, especially with regard to the treatment of chronic wounds. The antibacterial efficacy of the plasma has already been proven. Furthermore, this work demonstrates that a short CAP treatment (30 s) with a low treatment frequency (120 Hz) has a proliferation-promoting effect on HDF. These effects may have a positive impact on wound healing. Due to toxicity to HDF, clinical use of a treatment frequency of 600 Hz with a treatment duration of 10 min seems not to be recommended. Further studies are necessary to define more precisely the toxicity and type of cell death caused by the plasma. In addition to the RONS, other factors such as electromagnetic radiation or UV light should be considered. Furthermore, the effects of a very short treatment duration (< 30 s) at high treatment frequency should be investigated. It is possible that the positive properties of the plasma, such as proliferation-promoting and antibacterial effects, could be used with low toxicity despite the high treatment frequency.

III. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APP	Atmosphärendruckplasma
α-SM-Aktin	<i>Alpha-Smooth Muscle Actin/ Alpha-Actin</i> der glatten Muskulatur
CAP	<i>Cold Atmospheric Plasma/ kaltes</i> Atmosphärendruckplasma
ca.	Circa
CTGF	<i>Connective tissue growth factor</i>
C°	Grad Celsius
DBD	<i>Dielectric Barrier Discharge/ dielektrische</i> Barriereentladung
DBE	Dielektrisch behinderte Entladung
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid-Lösung
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
et al.	<i>et alii/ und andere</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FDA	<i>Fluorescein diacetate</i>
FE-DBD	<i>Floating Electrode Dielectric Barrier</i> <i>Discharge</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor/ Fibroblasten-</i> Wachstumsfaktor
H	Hoechst

HCIO	Hypochlorige Säure
HEKa	Humane epidermale Keratinozyten, adult
HNO₂	Salpetersäure
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
Hz	Frequenz in Hertz
IL	Interleukin
iNOS	Induzierte NO-Synthase
kV	Spannung in Kilovolt
m	Meter
m²	Quadratmeter
mm	Millimeter
OH[•]	Hydroxyl-Radikal
PI	Propidiumiodid
PDS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NO[•]	Stickstoffmonoxid mit einem ungepaarten Elektron
NO₂⁻	Nitrit-Ion
N₂O₃	Distickstofftrioxid
nNOS	Neuronale NO-Synthase
O₂	Sauerstoff
O₂⁻	Radikal Superoxidanion
ONOO⁻	Peroxinitrit-Ion
O₂NOO-	Peroxinitrat-Ion
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>

Pen	Penicillin
ROS	<i>Reactive oxide species/</i> Reaktive Sauerstoffspezies
RONS	<i>Reactive oxide and nitrogen species/</i> Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies
RNS	<i>Reactive nitrogen species/</i> Reaktive Stickstoffspezies
s	Sekunden
SOD	Superoxiddismutase
Strep	Streptomycin
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

IV. Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Haut des Menschen	1
1.1.1	Aufbau der Haut	1
1.1.2	Der Wundheilungsprozess mit speziellem Fokus auf den Einfluss der Fibroblasten	4
1.1.3	Einfluss der Myofibroblasten auf die Entstehung pathologischer Narben	8
1.2	Plasma	8
1.2.1	Plasmaklassifikation	10
1.2.2	Kaltes Atmosphärendruckplasma	12
1.2.3	Dielektrische Barriereentladung	14
1.3	Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies	16
1.3.1	Stickstoffmonoxid	16
1.3.2	Entstehung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies	19
1.3.3	Effekte reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies	20
1.3.4	Plasma und reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies	22
1.4	Anwendungsmöglichkeiten von Plasma	24
1.4.1	Antibakterielle Effekte des CAP	26
1.4.2	Effekte des CAP auf Tumorzellen	27
1.4.3	Einfluss des CAP auf die Wundheilung	28
1.4.4	Anwendung von Plasma in der Klinik	30
1.5	Herausforderungen in der klinischen Anwendung	32
1.6	Ziele und Fragestellung	33
2	Material und Methoden	34
2.1	Material	34
2.1.1	Zellen	34
2.1.2	Geräte	34
2.1.3	Materialien	36
2.1.4	Substanzen	37
2.1.5	Software	39
2.2	Methoden	40
2.2.1	Zellisolation	40
2.2.2	Zellkultivierung der Fibroblasten	42
2.2.3	Passagieren der Zellen	42
2.2.4	Kryokonservierung	43
2.2.5	Zellviabilitätsmessung	44

2.2.6	Fluoreszenzmikroskopie	44
2.2.7	Wasserstoffperoxid-Photometrie	45
2.2.8	Messung des pH-Werts	45
2.2.9	Reduktive Gasphasen-Chemilumineszenz	46
2.2.10	Experimenteller Aufbau	47
2.2.11	Dielektrische Barriereentladung	48
2.2.12	Statistische Analyse	49
3	Ergebnisse	50
3.1	Physikochemische Effekte der CAP-Behandlung	50
3.1.1	Einfluss des CAP auf den pH-Wert	50
3.1.2	Akkumulation von Nitrit und Nitrat	51
3.1.3	Einfluss der Plasmaparameter auf die Wasserstoffperoxid-Akkumulation	54
3.2	Proliferation von humanen dermalen Fibroblasten (HDF)	56
3.2.1	Viabilität von HDF nach direkter Plasmabehandlung	56
3.2.2	Effekte der direkten und indirekten CAP-Behandlung auf die Viabilität von HDF	66
3.3	CAP-induzierte H₂O₂-Akkumulation und HDF	74
3.4	<i>Life-Cell-Imaging</i> von HDF nach CAP-Behandlung	76
4	Diskussion	80
4.1	Entstehung von RONS nach der Behandlung mit CAP	80
4.2	Zellviabilität	83
4.2.1	Effekte einer direkten Behandlung mit CAP	83
4.2.2	Effekte der RONS auf HDF nach direkter CAP-Behandlung	85
4.2.3	Vergleich zwischen direkter und indirekter CAP-Behandlung und die Effekte von Katalase	86
4.2.4	Toxizität des CAP und Wasserstoffperoxidkonzentration	88
4.3	Klinische Anwendung von Plasma	89
4.4	Empfehlungen für die Wahl der Behandlungsdauer und der Behandlungsfrequenz	90
4.5	Schlussfolgerung	91
5	Literatur- und Quellenverzeichnis	

1 Einleitung

Neben dem festen, flüssigen und gasförmigen Aggregatzustand gibt es einen weiteren Aggregatzustand, das Plasma. Hierbei handelt es sich um ein energiereiches Gasgemisch, welches auch als der vierte Aggregatzustand bezeichnet wird (Heinlin et al., 2011). Die Behandlung von menschlichem Gewebe wurde durch die Entwicklung von kaltem Atmosphärendruckplasma möglich. Hiermit wuchs in den letzten Jahren das Interesse an dem ionisierten Gasgemisch, insbesondere im Hinblick auf seine antibakterielle Wirksamkeit und die Anwendung zur Behandlung von chronischen Wunden (Helmke, 2016).

Im Rahmen dieses Forschungsprojektes wurde eine Kaltplasmaquelle, die DBD (*Dielectric Barrier Discharge*), verwendet. Die Variation von Behandlungsparametern, wie der Behandlungsdauer und -frequenz, wurden auf die Entstehung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RONS) sowie ihre Effekte auf die Viabilität von humanen dermalen Fibroblasten hin untersucht. Diese Grundlagenforschung soll zum besseren Verständnis der Wirkungsmechanismen sowie zur weiteren Verifikation von Behandlungseinstellungen bei der Verwendung von CAP beitragen.

1.1 Die Haut des Menschen

1.1.1 Aufbau der Haut

Die Haut ist das größte Organ des Körpers. Sie umfasst eine Fläche von etwa 2 m² und hat durchschnittlich eine Dicke von ca. 2,5 mm. Insgesamt macht das Gewicht der Haut ungefähr 6 % des menschlichen Körpergewichtes aus (Tobin, 2006). Die Haut besteht hauptsächlich aus drei Schichten: Der Epidermis, der Dermis und der Subkutis (Held et al., 2015). Sie stellt eine wichtige physikalische Barriere dar und schützt den Körper vor äußeren Einflüssen wie Hitze, Kälte, UV-Strahlung und Austrocknung. Des Weiteren spielt die Haut eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Bakterien und der Temperierung des Körpers (Tobin, 2006; Baum und Arpey, 2005; Hirobe, 2014).

Die Epidermis ist die äußere Schicht und hat eine Dicke von 75–150 µm. Im Bereich der Handflächen und Fußsohlen kann die Epidermis bis zu 600 µm dick sein. Es

handelt sich um ein mehrschichtiges, verhornendes Plattenepithel, das nicht vaskularisiert ist, jedoch Nervenfasern enthält. Hauptsächlich besteht die Epidermis aus Keratinozyten, die Keratin produzieren (Tobin, 2006; Held et al., 2015). Das Protein Keratin ist maßgeblich für die Stabilität der Keratinozyten verantwortlich. Neben der Stabilisierung haben die Keratinozyten zudem die Funktion des Schutzes vor Pathogenen, UV-Strahlung und Austrocknung (Halprin, 1972; Hirobe, 2014).

Die Epidermis lässt sich von außen nach innen, wie in Abbildung 1 dargestellt ist, in verschiedene Schichten unterteilen: Das *Stratum corneum*, das *Stratum granulosum*, das *Stratum spinosum* und das *Stratum basale* (Tobin, 2006; Aumüller, 2007).

Im *Stratum basale* befinden sich undifferenzierte, epidermale Stammzellen. Reifere Zellen werden von den neusynthetisierten Keratinozyten ins *Stratum spinosum* gedrückt. Die Zellen im *Stratum spinosum* und *Stratum basale* sind mitotisch aktiv. Die im *Stratum spinosum* befindlichen Zellen haben allerdings ein größeres Volumen. Keratinozyten im *Stratum granulosum* flachen ab, verhornen und verlieren ihren Zellkern. Sobald die Keratinozyten ihren Zellkern verloren haben, befinden sie sich meist im *Stratum corneum*, der obersten Hautschicht. Die Differenzierung der Keratinozyten dauert vier bis sechs Wochen (Halprin, 1972; Tobin, 2006; Held et al., 2015).

Neben den Keratinozyten befinden sich in der Epidermis weitere Zellen, wie Melanozyten, Langerhans-Zellen und Merkel-Zellen. Die Langerhans-Zellen gehören zum Immunsystem, die Merkel-Zellen fungieren als Druckrezeptoren. Die Melanozyten sind in der Lage, Melanin zu produzieren, welches das Eindringen von UV-Strahlung in tiefere Hautschichten verhindert (Quevedo und Fleischmann, 1980; Tobin, 2006; Held et al., 2015).

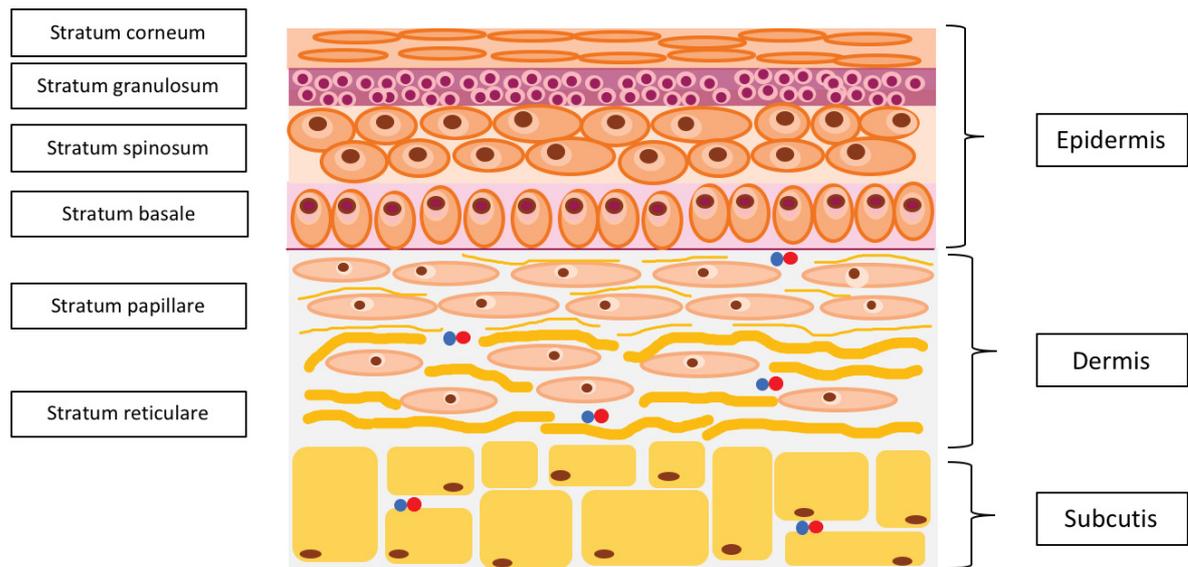


Abb. 1: Schichten der menschlichen Haut. Die Haut lässt sich in drei Schichten gliedern: Die Epidermis, die Dermis und die Subcutis. Die Epidermis gliedert sich in weitere Schichten: *Stratum corneum*, *Stratum granulosum*, *Stratum spinosum*, *Stratum basale*. Auch die Dermis besteht aus zwei Schichten. Dem *Stratum papillare*, mit lockerem Bindegewebe und Fibroblasten, und dem *Stratum reticulare* mit starken Kollagenfaserbündeln (eigene Darstellung in Anlehnung an (Aumüller, 2007)).

Die Dermis (auch Corium oder Lederhaut) misst etwa 2 mm, kann jedoch beispielsweise am Rücken eines Erwachsenen auch bis zu 4 mm dick sein. Trotz ihres größeren Volumens enthält die Dermis weniger Zellen als die Epidermis. Hauptbestandteile der Dermis sind Fibroblasten und Bindegewebe, welche in eine gelartige Substanz, die Extrazellulärmatrix, eingebettet sind. Diese besteht aus verschiedenen Proteoglykanen wie dem Hyaluron und macht den Großteil der Dermis aus. Die extrazelluläre Matrix wird von den Fibroblasten, die histologisch einen länglichen Zellkörper mit einem schmalen Zellkern aufweisen, auf- und abgebaut. Insbesondere in Bezug auf die Wundheilung besteht großes Interesse an ihrer synthetischen sowie proliferativen Aktivität. Neben den Fibroblasten befinden sich in der Dermis Makrophagen und Mastzellen, welche über Histamin allergische Reaktionen induzieren können (Held et al., 2015; Tobin, 2006).

Die Dermis liegt unter der Epidermis und kann in zwei Schichten unterteilt werden. Das subepidermale, schmale *Stratum papillare* und das darunter gelegene, breite *Stratum reticulare*. Diese Schichten können anhand ihrer Zusammensetzung unterschieden werden. Im *Stratum papillare* befinden sich Fibroblasten sowie zahlreiche Kollagenfasern vom Typ III, Kapillar- und Lymphgefäße, Nerven,

Lymphozyten und Makrophagen. Kollagenfasern dienen unter anderem der Elastizität der Haut und sind wichtig für die Haftung zwischen Epidermis und Dermis. Das *Stratum reticulare* liegt zwischen dem *Stratum papillare* und der Subkutis. Es besteht aus Kollagenfasern vom Typ I, Gefäßen, Nervenfasern sowie Hautanhangsgebilden. Zu Letzteren zählen Drüsen, Haarfollikel sowie sensorische Nervenrezeptoren. Diese dickere und tiefer gelegene Schicht dient vor allem der Elastizität sowie der Reißfestigkeit der Haut. Im Vergleich zum *Stratum papillare* sind weniger Fibroblasten enthalten (Tobin, 2006; Held et al., 2015; Bingöl, 2014).

Die Subkutis liegt unterhalb der Dermis und dient ebenfalls der Isolation. Sie kann in Abhängigkeit von Ernährung und Geschlecht bis zu mehreren Zentimetern dick sein und setzt sich aus Adipozyten sowie Bindegewebe zusammen. Das Unterhautfettgewebe dient neben der Wärmeisolation ebenfalls als Energiedepot. Die Adipozyten sind runde, große Zellen mit einem an die Zellmembran gedrückten Zellkern und lagern sich zu Fettgewebsläppchen zusammen, die wiederum durch Bindegewebssepten separiert werden (Tobin, 2006; Held et al., 2015; Bingöl, 2014).

1.1.2 Der Wundheilungsprozess mit speziellem Fokus auf den Einfluss der Fibroblasten

Die Wundheilung lässt sich in verschiedene Phasen unterteilen, die sich überlappen und daher nicht klar voneinander abgegrenzt werden können (Baum und Arpey, 2005).

Die erste Phase der Wundheilung nach einer Verletzung der Haut und Blutgefäße beginnt zunächst mit der Blutstillung, der Hämostase. Innerhalb weniger Sekunden lagern sich Thrombozyten an das defekte Gefäß an. Durch die Ausschüttung von Gerinnungsfaktoren und die Anlagerung von Fibrin kommt es dann zur Ausbildung eines Blutpfropfes, wodurch die Blutung gestoppt wird. Dieser Prozess lässt sich makroskopisch erkennen. Fibrin, Blutplättchen und Blutgefäße sind als Mediatoren an der Hämostase sowie an der Entstehung einer dynamischen Matrix beteiligt, welche zur Blutgerinnung beiträgt und ein vorläufiges Gitter für Entzündungszellen, Fibroblasten und Wachstumsfaktoren bietet. Die Thrombozyten schütten außerdem Wachstumsfaktoren und Zytokine wie das FGF-2, VEGF, PDGF und EGF aus,

welche unter anderem Einfluss auf Fibroblasten, Keratinozyten sowie Endothelzellen haben. Innerhalb der ersten 10 bis 15 min nach der Verletzung ist das Erblassen der Haut nahe der Wunde zu beobachten. Ursache hierfür ist die Vasokonstriktion, die durch die Freisetzung von Thromboxan und Prostaglandinen aus den verletzten Zellen induziert wird. Nach etwa 15 min ist die Hämostase abgeschlossen und der inflammatorische Prozess schließt sich an (Baum und Arpey, 2005; Tiede und Emmert, 2016; Lawrence, 1998).

Neben der Rötung der Haut äußert sich die Inflammation makroskopisch in Überwärmung, Schwellung und Schmerzen. Diese Zeichen sind auf die kapilläre Vasodilatation und die Erhöhung der Permeabilität zurückzuführen, welche die Extravasation von Serumproteinen erleichtert. Zytokine, Wachstumsfaktoren und das Nervensystem sind an diesem komplexen Prozess beteiligt. Auf zellulärer Ebene spielen unter anderem Mastzellen, Granulozyten, T-Lymphozyten und Monozyten eine wichtige Rolle. Die polymorphkernigen Granulozyten sind die ersten Entzündungszellen in der Wunde. Sie schütten Zytokine und Wachstumsfaktoren aus, dienen der Reinigung der Wunde und fördern die Inflammation. Die zu Wundmakrophagen differenzierten Monozyten phagozytieren Zelltrümmer und Bakterien und tragen ebenfalls über Zytokine zum Entzündungsprozess bei. Weiterhin stimulieren die Makrophagen über FGF-2 und TGF- β die Angiogenese sowie die Fibroblasten und regen diese zur Kollagensynthese an. Im weiteren Verlauf werden die Fibroblasten über TGF- β zur Differenzierung in Myofibroblasten angeregt. Ein weiterer Zelltyp der Inflammationsphase sind die T-Zellen, die regulatorische Effekte auf die Wundheilung haben und die Keratinozytenproliferation stimulieren (Baum und Arpey, 2005; Tiede und Emmert, 2016; Bingöl, 2014; Lawrence, 1998).

Der Entzündungsphase schließt sich zwischen dem vierten und siebten Tag posttraumatisch die Proliferationsphase an. Die provisorische Matrix wird durch Granulationsgewebe ersetzt (Baum und Arpey, 2005; Singer und Clark, 1999; Bingöl, 2014). Das granuläre Erscheinungsbild kommt durch das Eindringen von Kapillaren zustande. Darüber hinaus besteht das Granulationsgewebe aus Makrophagen, Fibroblasten und Kollagen. Die Makrophagen schaffen eine Verbindung zwischen der Entzündungs- und Proliferationsphase. Die Migration von Fibroblasten wird durch zahlreiche Zytokine und Wachstumsfaktoren wie unter

anderem PDGF, TGF- β und CTGF gefördert. Fibroblasten repräsentieren den wichtigsten, aus der mesenchymalen Zellreihe stammenden Zelltyp, der an der Wundheilung beteiligt ist. Zu ihren Funktionen gehören die Synthese der EZM, die Beeinflussung der Keratinozytenaktivität, die Stimulation des Einwachsens von Nerven und Gefäßen sowie die Unterstützung der Wundrandadaptation. Die Produktion der EZM ersetzt die vorläufige fibrinbasierte Matrix. Neben dem Kollagen besteht die EZM aus Glykosaminoglykan, Proteoglykanen und Wachstumsfaktoren. Etwa 3 bis 5 Tage nach der Verletzung beginnen die Fibroblasten mit der Kollagenproduktion, die durch verschiedene Wachstumsfaktoren stimuliert wird (Lawrence, 1998; Baum und Arpey, 2005). Das Kollagen dient der Stärkung der Wunde und erleichtert das Einwandern von Zellen wie Makrophagen oder Endothelzellen. Im Rahmen der frühen Wundheilung wird ein höherer Anteil an Kollagen Typ III produziert, welcher etwa bei 30 % liegt. Die unverletzte Haut besteht zu ca. 90 % aus Kollagen Typ I und nur 10 % aus Kollagen Typ III (Baum und Arpey, 2005; Broughton et al., 2006; Bingöl, 2014).

Die Angiogenese wird neben Zytokinen und Wachstumsfaktoren durch einen niedrigen Sauerstoffspiegel, einen erniedrigten pH-Wert sowie einen erhöhten Laktat Spiegel stimuliert. Beschädigte Gefäße werden durch das Einsprossen intakter Kapillaren aus der Umgebung ersetzt (Baum und Arpey, 2005; Lawrence, 1998).

In der Reepithelialisierungsphase spielen die Keratinozyten eine wichtige Rolle. Mit dem Ziel, eine intakte Epidermis über dem Granulationsgewebe auszubilden, bewegen sich die Keratinozyten vom Wundrand aus aufeinander zu. Die Keratinozytenaktivität wird durch FGF2, TGF, IL-6 sowie Stickstoffmonoxid und weitere Faktoren moduliert. In der Regel ist diese Phase der Wundheilung nach 24 bis 48 Stunden abgeschlossen. Dies gilt allerdings nur für flache oder adaptierte Wunden. Makroskopisch kommt es in der Reepithelialisierungsphase zu sichtbaren Veränderungen der Wunde, wie der Ablösung des verbliebenen Schorfs sowie der Wiederherstellung einer intakten Epidermis (Baum und Arpey, 2005; Lawrence, 1998; Broughton et al., 2006). In chronischen Wunden sind die Prozesse der Epithelialisierung gestört, da es zu strukturellen und chemischen Veränderungen der Keratinozyten kommt (Tiede und Emmert, 2016).

Die Reifungsphase einer Wunde kann Wochen bis Jahre dauern. In dieser Phase der Wundheilung kommt es zur Erhöhung der Festigkeit, zur Reduktion der Rötung, zur Verkleinerung der Wunde durch Kontraktion sowie zur Abnahme der Wunddicke und Wundstärke. Vor allem die Fibroblasten und ihre Produkte sind an diesen Prozessen beteiligt. Die anfänglich abgelagerten dünnen Kollagenfasern werden zum Teil resorbiert. Dickere Kollagenbündel organisieren sich entlang der Spannungslinien. Dies führt zu einer erhöhten Zugfestigkeit. Die Rötung der Wunde wird durch die Abnahme der Kapillardichte reduziert. Reife Wunden sind demnach weniger kapillarisiert als frische Wunden (Baum und Arpey, 2005; Broughton et al., 2006; Lawrence, 1998).

Die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten beginnt etwa 5 Tage nach der Verletzung und wird durch Faktoren wie mechanischen Stress, TGF- β und Fibronectin stimuliert. Im Granulationsgewebe werden die Fibroblasten aktiviert und erwerben die Expression von α -SMA (*α -smooth muscle actin*), wodurch sie zu Myofibroblasten differenzieren. Die Ausbildung der kontraktile Eigenschaften, die zur Wundkontraktion führen, scheint mit dem α -SMA in Zusammenhang zu stehen. Die Abnahme der Wunddicke und -stärke wird durch die Abnahme der Kollagenproduktion nach dem 21. Tag bedingt. Im Rahmen der normalen Wundheilung verschwinden die Myofibroblasten, wenn die Epithelialisierung stattgefunden hat, und die Gesamtzahl der Fibroblasten reduziert sich. Hierbei wird vermutet, dass in den Zellen der programmierte Zelltod induziert wird. Die verbleibende Narbe ist frei von Talgdrüsen oder Haaren. Nach Beendigung der Remodellierungsphase kann die Widerstandsfähigkeit der Haut im Vergleich zur gesunden Haut auf bis zu 80 % ansteigen (Bingöl, 2014; Balzer et al., 2015; Baum und Arpey, 2005; Werner und Grose, 2003; Gabbiani, 2003; Darby et al., 2014).

1.1.3 Einfluss der Myofibroblasten auf die Entstehung pathologischer Narben

Myofibroblasten sind eine Zwischenform zwischen den Fibroblasten und den Zellen der glatten Muskulatur (Desmouliere et al., 2005). Sie entstehen aus den Fibroblasten des Granulationsgewebes durch Faktoren wie mechanischen Stress, TGF- β und Fibronectin (Gabbiani, 2003). Die Myofibroblasten haben Eigenschaften von glatten Muskelzellen und exprimieren das α -SMA, das normalerweise in vaskulären glatten Muskelzellen enthalten ist (Desmouliere et al., 2005). Die kontraktile Eigenschaften der Myofibroblasten haben positive und negative Effekte auf die Wundheilung. Ein positiver Effekt ist die Verschmälerung der Wundränder, als nachteilig hingegen ist ihr Einfluss bei der Entstehung von Kontraktionen zu beurteilen (Shin und Minn, 2004). Im Sinne der normalen Wundheilung wird die Kontraktion der Myofibroblasten nach Abschluss der Epithelisierung gestoppt. Die Apoptose der Myofibroblasten wird induziert. Dieser Prozess scheint bei der Entstehung von pathologisch veränderten Narben, wie hypertrophen Narben, inhibiert zu sein. Studien konnten einen Zusammenhang zwischen der Anzahl an α -SMA-exprimierenden Zellen und der pathologischen Bildung hypertropher Narben zeigen. Hypertrophe Wunden, die durch eine Verbrennung entstanden sind, zeigten im Vergleich zur gesunden Haut einen höheren Anteil an Myofibroblasten und Kontraktionen (Desmouliere, 1995; Desmouliere et al., 2005; Darby und Hewitson, 2007; Balzer et al., 2015).

1.2 Plasma

Im gesamten Universum bestehen mehr als 95 % der sichtbaren Materie aus Plasma. Dazu gehören unter anderem Blitze, Sterne, die Sonne und das Polarlicht (Liu und Lu, 2010; Gerling und Weltmann, 2016; Heinlin et al., 2011; Hoffmann et al., 2013).

Neben dem festen, dem flüssigen und dem gasförmigen gibt es, wie in Abbildung 2 dargestellt, einen weiteren Aggregatzustand. Plasma wird auch als der vierte Aggregatzustand bezeichnet. Um Teilchen vom flüssigen in den gasförmigen Aggregatzustand zu überführen, müssen diese energetisch angeregt werden. Die

Energie kann in Form von Wärme zugefügt werden. Zur Entstehung von Plasma aus Gas wird Energie in Form von elektrischen Entladungen benötigt. Durch das starke elektrische Feld können sich aus Atomen und Gasmolekülen freie Elektronen lösen. Die Beschleunigung von freien Elektronen und die Kollision mit Gasmolekülen oder Atomen können zur Entstehung von weiteren Ionen und freien Elektronen führen. Im Gegensatz zu den drei weiteren Aggregatzuständen sind die Ionen im Gasgemisch nicht in der Lage, sich freier zu bewegen. Für die Entstehung des Plasmas scheint demnach die Bildung von freien Elektronen und Ionen für die Änderung des Aggregatzustandes verantwortlich zu sein und nicht die Zunahme der Beweglichkeit (Yan et al., 2017; Heuer et al., 2015; Hoffmann et al., 2013; Haertel et al., 2014; Liu und Lu, 2010; Gerling und Weltmann, 2016; Heinlin et al., 2011).

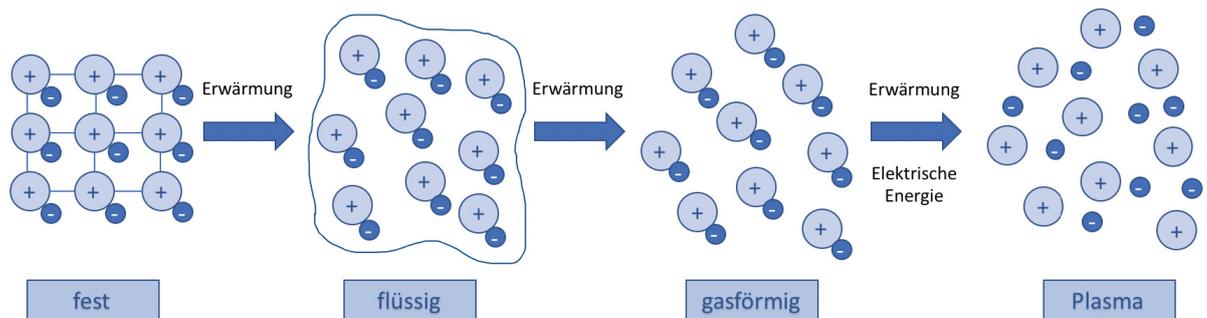


Abb. 2: Schematische Darstellung der Aggregatzustände (eigene Darstellung in Anlehnung an (Liu und Lu, 2010; Gerling und Weltmann, 2016)).

Die Komponenten des vierten Aggregatzustandes sind in Abbildung 3 dargestellt. Das ionisierte Gasgemisch besteht aus Elektronen, Ionen sowie ungeladenen Teilchen. Zu Letzteren zählen freie Radikale, Atome und Moleküle. Reaktive Stickstoff- und Sauerstoffspezies sind ebenfalls Bestandteile des Plasmas. Weiterhin werden UV-Strahlung, elektromagnetische Strahlung sowie Wärmestrahlung emittiert (Heinlin et al., 2011; Haertel et al., 2014; Daeschlein, 2016; von Woedtke et al., 2013; Gerling und Weltmann, 2016).

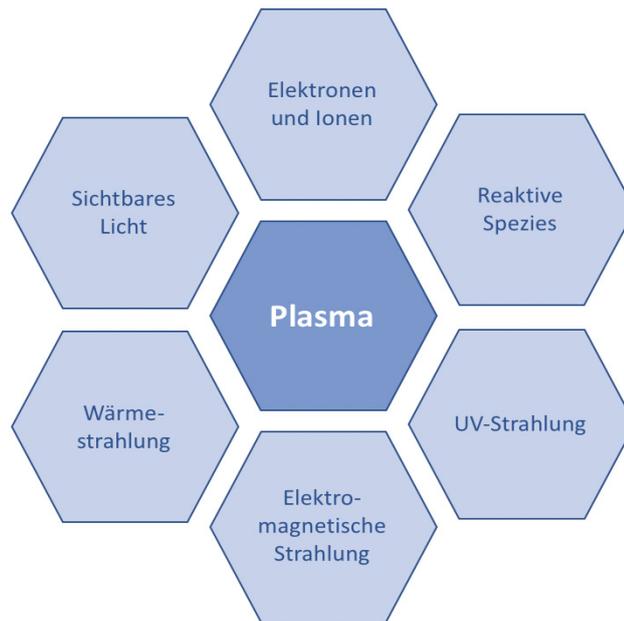


Abb. 3: Komponenten des Plasmas. Zu den verschiedenen Bestandteilen des Plasmas zählen Elektronen und Ionen, reaktive Spezies, UV-Strahlung, elektromagnetische Strahlung, Wärmestrahlung sowie sichtbares Licht (eigene Darstellung in Anlehnung an (Heinlin et al., 2011; Gerling und Weltmann, 2016)).

Die Forschung zum Thema Plasma lässt sich bis ins 17. Jahrhundert zurückverfolgen (Heuer et al., 2015; Liu und Lu, 2010). Im Jahre 1879 wurde Plasma zum ersten Mal von William Crookes beschrieben. Er bezeichnete Plasma als den „strahlenden Aggregatzustand“ (*radiant matter*) (Crookes, 1883). In den späten 20er Jahren etablierte der Nobelpreisträger Irvin Langmuir den Begriff „Plasma“ für den vierten Aggregatzustand (Heinlin et al., 2011; Haertel et al., 2014; Gerling und Weltmann, 2016; Hoffmann et al., 2013).

1.2.1 Plasmaklassifikation

Plasma besteht wie zuvor bereits beschrieben aus Elektronen, Ionen und neutralen Teilchen. Die Zusammensetzung ist unter anderem abhängig von dem Grad der Ionisierung des Gases, der Dichte sowie dem thermodynamischen Gleichgewicht. Der Grad der Ionisation kann über die Temperatur der Elektronen ermittelt werden. Es kann zwischen partieller oder totaler Ionisierung unterschieden werden (Liu und Lu, 2010).

Es existieren viele verschiedene Plasmaarten. Zunächst wurde das thermische Plasma entdeckt, bei dem es sich um ein vollständig ionisiertes Gas handelt. Die Temperatur von leichten Teilchen wie Elektronen ist identisch mit der der schweren Teilchen wie Ionen und Neutronen. Ein Beispiel für das natürliche Vorkommen des thermischen Plasmas ist die Sonne. Thermisches Plasma wird unter anderem zum Schweißen, zur Sterilisation von medizinischem Material und zur Kauterisation genutzt (Hoffmann et al., 2013; Haertel et al., 2014; Heinlin et al., 2011; Liu und Lu, 2010; Metelmann et al., 2016; Metelmann et al., 2018; Bentkover, 2012).

Mit der Entdeckung des nicht thermischen Plasmas in den 90er Jahren erweiterten sich die Anwendungsmöglichkeiten deutlich. Nicht-thermisches Plasma entsteht dadurch, dass sich das Gas in einem Ungleichgewichtszustand befindet. Die Temperatur der Elektronen ist hierbei höher als die der schwereren Ionen und Neutronen, wodurch die Temperatur des Gases gesenkt werden kann. Nicht-thermisches Plasma kann, wie in Abbildung 4 dargestellt, unter anderem zur Dekontamination von Lebensmitteln, zur Sterilisation von labilen Materialien, zur Reinigung von Abwässern sowie zur Aufbereitung von Medizinprodukten eingesetzt werden. Die Behandelbarkeit von labilen Oberflächen eröffnet viele neue Anwendungsmöglichkeiten (Liu und Lu, 2010; von Woedtke et al., 2016; Kramer et al., 2016; Hoffmann et al., 2013).

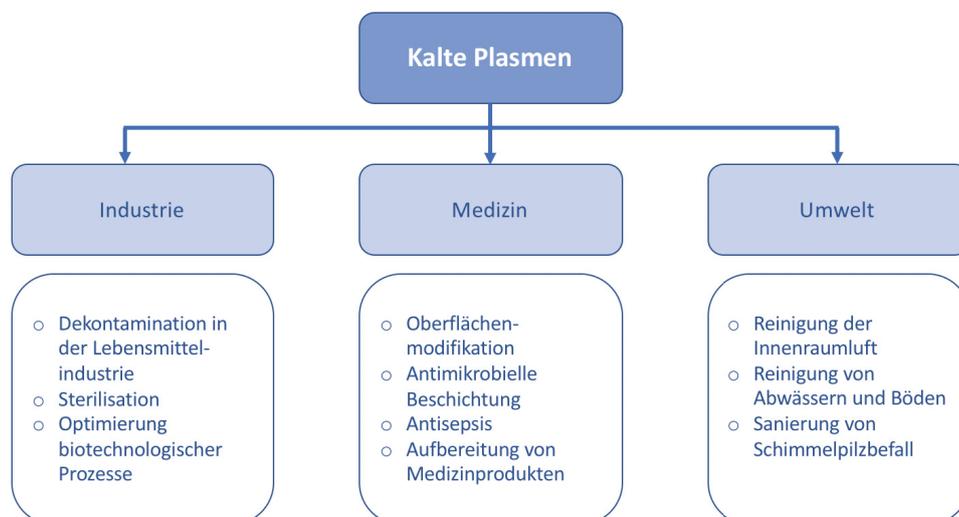


Abb. 4: Anwendungsbereiche kalter Plasmen in der Industrie, Medizin und Umwelt (eigene Darstellung in Anlehnung an (Kramer et al., 2016)).

Des Weiteren kann Plasma anhand der Dichte des Gases klassifiziert werden, wobei zwischen Hochdruck- und Niederdruckplasma unterschieden wird. Hochdruckplasma besteht aus einer großen Anzahl an freien Radikalen und Ionen. Es kommt meist zur Dekontamination oder Produktion von Nanomaterialien zum Einsatz. Beim Niederdruckplasma ist im Vergleich zum Hochdruckplasma die Kollision von freien Elektronen mit Atomen zu vernachlässigen. Die am häufigsten eingesetzte Form des Niederdruckplasmas ist das Atmosphärendruckplasma (APP). Die Gastemperatur des APP liegt bei Raumtemperatur. Es entsteht durch Anlegen einer Spannung zwischen zwei Elektroden. Die geladenen Teilchen zwischen den zwei Elektroden werden vom gasförmigen Aggregatzustand zum vierten Aggregatzustand beschleunigt. Der Energietransfer von den Elektronen auf schwerere Teilchen, wie Atome oder Moleküle, führt zur Entstehung von Ionen und zur Dissoziation von Molekülen (Liu und Lu, 2010; Tendero et al., 2006).

1.2.2 Kaltes Atmosphärendruckplasma

Bei kaltem Atmosphärendruckplasma „*Cold Atmospheric Plasma*“ (CAP) (Heinlin et al., 2010) handelt es sich um Niedertemperaturplasma, das bei Atmosphärendruck erzeugt wird. Die Temperatur der Elektronen ist hierbei höher als die des Neutralgases, die sich nahe der Raumtemperatur befindet (Helmke, 2016). Das CAP führt zu keinen thermischen Schädigungen des Gewebes, wodurch die Anwendungsmöglichkeiten des Plasmas deutlich erweitert werden können. Als ein weiterer Vorteil lässt sich die nur geringe Auswirkung auf das umliegende Gewebe nennen, bei weiterhin effizienter Desinfektion und Sterilisation. Bakterien, Pilze, Viren und Sporen können bereits nach einer kurzen Behandlungsdauer unschädlich gemacht werden. Auch unregelmäßige Oberflächen können problemlos behandelt werden. Nicht-thermisches Plasma bietet die Möglichkeit, auf molekularer Ebene zu wirken, ohne Gabe von Arzneimitteln. Insbesondere im Hinblick auf die sich schnell vermehrenden multiresistenten Keime sollte das CAP als wichtige Alternative bedacht werden (Heinlin et al., 2011; Heinlin et al., 2010; Isbary et al., 2013).

Beim CAP lassen sich drei Untergruppen unterscheiden: Direkte, indirekte und Hybrid-Plasmen (siehe Abb. 5). Direktes Plasma wird zwischen zwei Elektroden erzeugt, wobei der Körper oder das Gewebe als Gegenelektrode fungieren können. Somit fließt Strom durch den Körper oder das behandelte Gewebe.

Es wird kein Trägergas benötigt. Das Plasma entsteht zwischen den beiden Elektroden, indem die Umgebungsluft energetisch angeregt wird. Als Beispiel für eine direkte Plasmaquelle ist die dielektrische Barriereentladung (DBD) zu nennen. Diese Plasmaquelle arbeitet nach dem Prinzip der stillen Entladung, wobei ein energiereiches Gasgemisch zwischen zwei Elektroden unter Atmosphärendruck produziert wird. Hierbei sind die Elektroden von einer nicht leitenden Schicht, einem Dielektrikum umschlossen. Die Entladungen erfolgen in Form von vielen kleinen Mikroentladungen (Heinlin et al., 2010; Helmke, 2016; Isbary et al., 2013).

Indirekte Plasmen, wie der Plasmajet, bilden das Plasma zwischen zwei Elektroden. Hierbei dienen nicht der Körper oder das behandelte Gewebe als Gegenelektrode. Das Plasma wird innerhalb des Gerätes generiert und über ein Trägergas, wie Argon oder Helium, zum Ziel transportiert (Heinlin et al., 2010; Isbary et al., 2013).

Eine Kombination von direktem und indirektem Plasma stellen die Hybrid-Plasmen dar. Plasma wird hierbei wie das direkte Plasma erzeugt. Hybrid-Plasmen haben allerdings durch eine geerdete Gitterelektrode stromfreie Eigenschaften. Ein Beispiel für eine Hybrid-Plasmaquelle ist die Koronarentladung. Zwischen der Barriere und der Gegenelektrode besteht im Gegensatz zu der DBD kein Luftraum (Heinlin et al., 2011; Helmke, 2016; Isbary et al., 2013).

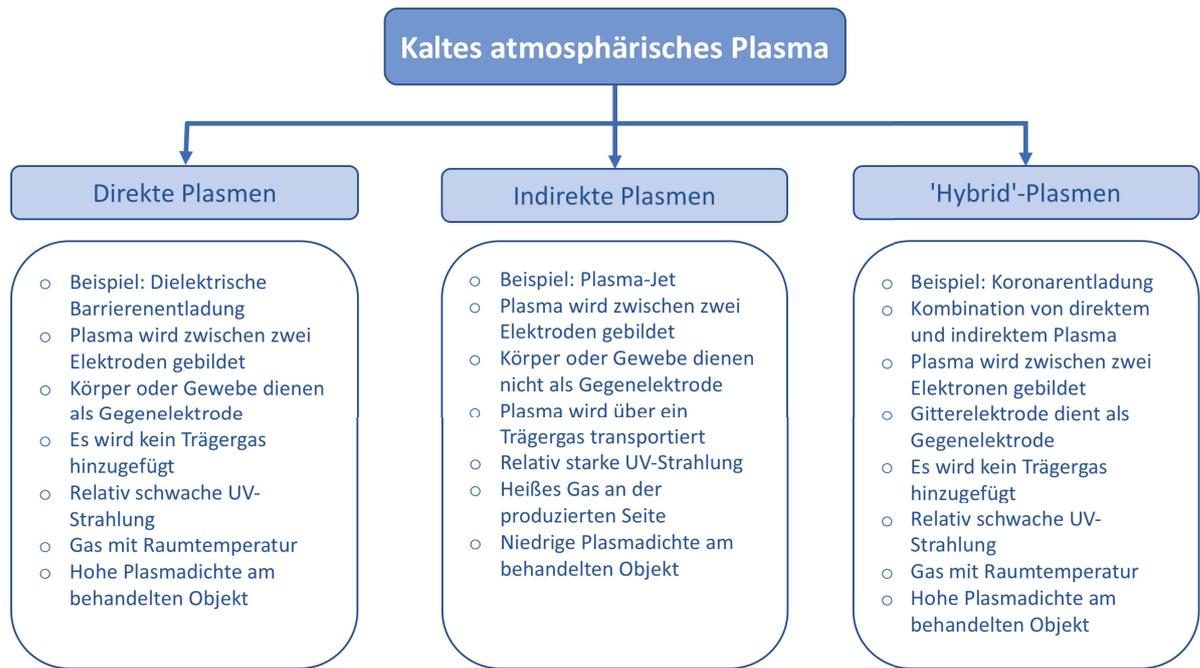


Abb. 5: Untergruppen des nicht-thermischen Atmosphärendruckplasma / „Cold Atmospheric Plasma“ (CAP). Unterteilung des CAP in direkte, indirekte sowie 'Hybrid'-Plasmen (eigene Abbildung in Anlehnung an (Heinlin et al., 2010)).

1.2.3 Dielektrische Barriereentladung

Die dielektrische Barriereentladung („*Dielectric Barrier Discharge*“ (DBD); „dielektrisch behinderte Entladung“ (DBE)) wurde erstmalig im Jahre 1857 von der Firma „Siemens“ für Experimente genutzt (Hoffmann et al., 2013; Helmke, 2016).

Die DBD gehört zu den direkten Plasmen und erzeugt kaltes atmosphärisches Plasma (CAP) ohne Hinzufügen eines Trägergases (Heinlin et al., 2010). Das Plasma wird zwischen zwei Elektroden erzeugt, einer Hochspannungselektrode und einer geerdeten Elektrode (siehe Abb. 6). Mindestens eine Elektrode wird mittels dielektrischer Barriere gegenüber einer anderen elektrisch abgeschirmt. Der Stromfluss wird durch das Dielektrikum reduziert (Helmke, 2016). Als Gegenelektrode können Gewebe, Zellen oder die Haut des Menschen fungieren. Durch Spannungsimpulse wird das Plasma unter Atmosphärendruck erzeugt. Bevorzugt wird der gepulste Betrieb verwendet. Die niedrige Temperatur von unter 40 °C wird durch die Taktung der Zündung erreicht. Die DBD kann über die Frequenz und die Spannung gesteuert werden (Hoffmann et al., 2013; Heuer et al., 2015; Balzer et al., 2015; Helmke, 2016; Kalghatgi et al., 2009).

Zellen können mit der DBD sowohl direkt als auch indirekt behandelt werden. Bei der direkten Behandlung befinden sich die Zellen zwischen der Hochspannungselektrode und der geerdeten Elektrode. Über die Inkubation der Zellen mit einem behandelten Puffer/Medium kann eine indirekte Behandlung der Zellen erfolgen (Kalghatgi et al., 2010).

Die DBD selbst arbeitet bei einem Frequenzspektrum im Bereich von 120–900 Hz. Die angelegte Spannung liegt zwischen 6–19 kV (Kalghatgi et al., 2011; Balzer et al., 2015).

Das ionisierte Gas, das mittels DBD generiert wird, besteht neben Elektronen und Ionen aus elektronisch angeregten Atomen, Molekülen, UV-Photonen und Radikalen. Es sind kurz- oder langlebige, neutrale Atome und Moleküle wie Ozon und Stickstoffmonoxid sowie geladene Teilchen enthalten. Zu den geladenen Teilchen zählen, neben den Elektronen, positiv oder negativ geladene Ionen wie Superoxidradikale (Kalghatgi et al., 2011; Balzer et al., 2015).

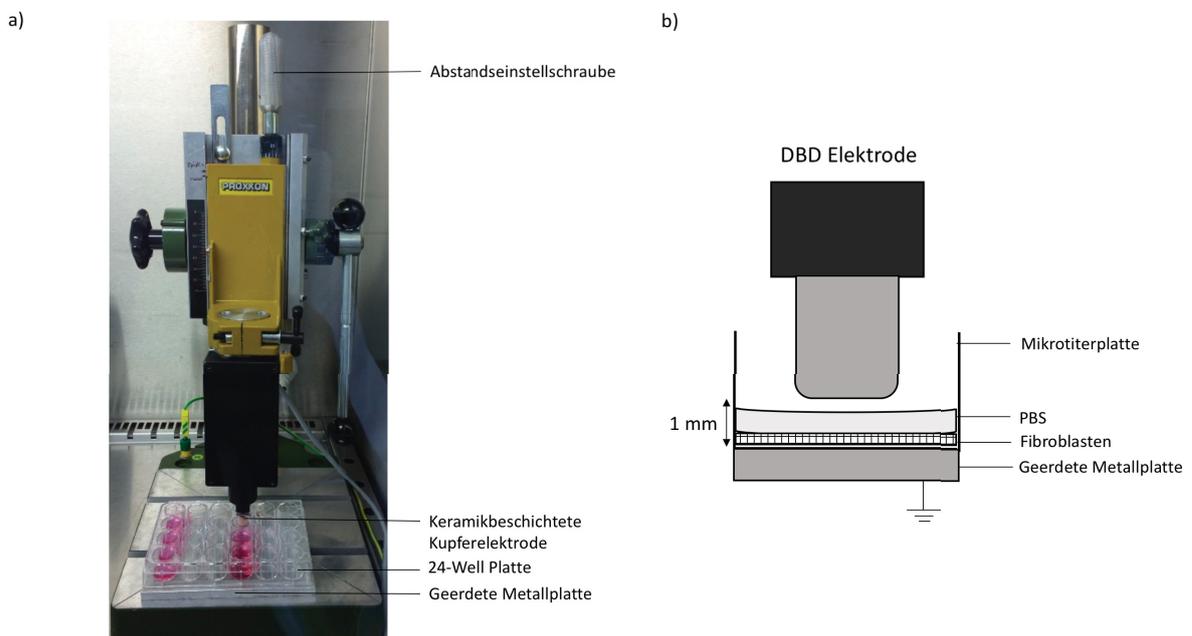


Abb. 6: Darstellung der DBD. a) Eigene Fotografie der DBD. Behandlung von Fibroblasten auf einer 24-Well Platte mit Plasma. b) Erzeugung des Plasmas zwischen der Elektrode, der DBD und Gegenelektrode. Positionierung der Fibroblasten zwischen der geerdeten Metallplatte und der DBD Elektrode, bedeckt mit PBS (eigene Darstellung in Anlehnung (Heuer et al., 2015; Hoffmann et al., 2013)).

Es existieren verschiedene Plasmaquellen. Die Elektroden können flach oder zylindrisch sein, wobei manchmal nur eine Elektrode mit dielektrischem Material überzogen ist (Hoffmann et al., 2013).

Eine modifizierte Variante der DBD ist die *Floating Electrode Dielectric Barrier Discharge* (FE-DBD). Bei dieser Variante wird das Plasma zwischen einer isolierten Hochspannungselektrode und einer aktiven Elektrode gebildet. Die aktive Elektrode ist im Gegensatz zur Gegenelektrode der DBD nicht geerdet. Bei der von Fridman et al. entwickelten FE-DBD kann beispielsweise die Haut des Menschen oder eine Probe direkt als Gegenelektrode dienen. Die FE-DBD wurde bereits in einigen Studien auf ihre sterilisierende Wirkung sowie ihre gewünschten Effekte auf die Blutgerinnung und Wundheilung hin untersucht (Isbary et al., 2013; Fridman et al., 2008; Hoffmann et al., 2013).

1.3 Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies

1.3.1 Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid (NO^\bullet) ist ein labiles Radikal mit einem ungepaarten Elektron. Es ist lipophil und kann sich über freie Diffusion durch biologische Membranen bewegen und somit schnelle transiente Effekte vermitteln. Es hat unter anderem Einfluss auf den programmierten Zelltod, den Gefäßtonus sowie die Signaltransduktion (Lancaster, 1997; Schmidt et al., 2010; Graves, 2012). NO^\bullet kann enzymatisch oder nicht enzymatisch gebildet werden (Abb. 7).

Ausgangsprodukt für die enzymatische Synthese von Stickstoffmonoxid ist die Aminosäure L-Arginin. Die Entstehung von NO kann über Synthesen katalysiert werden, wobei aus dem Ausgangsprodukt L-Arginin NO und L-Citrullin entstehen. Die NO-Synthesen liegen in verschiedenen Isoformen vor. Die endotheliale NO-Synthase (eNOS) katalysiert in den Endothelzellen die Entstehung von NO aus L-Arginin. Sie wird durch hohe Calciumkonzentrationen in den Zellen aktiviert. Thrombin, Bradykinin und Acetylcholin erhöhen unter anderem die Calciumkonzentration in der Zelle. Das Stickstoffmonoxid bewirkt die Relaxation der glatten Muskelzellen und somit die Vasodilatation. Die eNOS wirkt somit regulierend auf den Gefäßtonus, den Blutdruck und die Thrombozytenfunktion (Weller et al.,

1996; Schmidt et al., 2010; Schlossmann et al., 2003; Bredt et al., 1991; Suschek et al., 2006; Graves, 2012).

Die neuronale NO-Synthase (nNOS) befindet sich auf neuronalen Zellen und spielt als Neurotransmitter des zentralen und peripheren Nervensystems eine wichtige Rolle. Die Aktivität der nNOS wird ebenfalls über die Calciumkonzentration in der Zelle reguliert (Bredt et al., 1990; Schmidt et al., 2010).

Die induzierbare NO-Synthase (iNOS) kann von Makrophagen oder glatten Muskelzellen nach Stimulation durch Zytokine oder Endotoxine exprimiert werden. Sie kann verglichen mit den konstitutiven Enzymen eine bis zu 1000-fach erhöhte NO-Menge bilden. Die iNOS ist unabhängig von der Calciumkonzentration. In hohen Konzentrationen kann Stickstoffmonoxid unter anderem durch exzessive Vasodilatation zum septischen Schock beitragen (Schmidt et al., 2010).

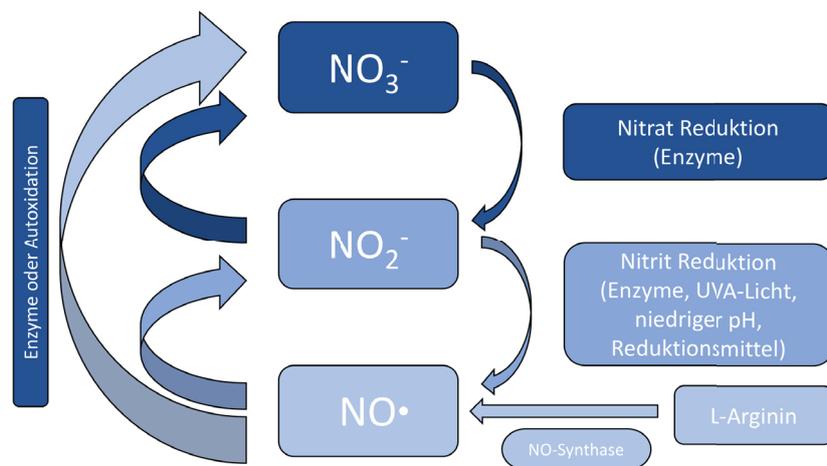


Abb. 7: Umwandlung von Nitrat (NO₃⁻), Nitrit (NO₂⁻) und NO•. Nitrat und Nitrit stammen entweder aus Autoxidation und enzymatischer Oxidation von NO• oder aus der Nahrungsaufnahme nach Synthese durch NO-Synthasen. Nitrat, welches im Speichel vorhanden ist, kann durch Bakterien zu Nitrit reduziert werden. Nitrit kann enzymatisch oder durch Reduktionsmittel wie Vitamin C, UVA-Licht oder niedrigen pH-Wert in NO• umgewandelt werden. Bei NO• handelt es sich um ein Radikal mit einem ungepaarten Elektron. Nitrit dient als eine der Hauptspeicherformen von NO•. NO• kann auch durch NO-Synthasen aus L-Arginin gebildet werden (eigene Darstellung in Anlehnung an (Suschek et al., 2006)).

In der Haut kann Stickstoffmonoxid nicht enzymatisch über Nitrit durch UVA-Strahlung entstehen. Ein weiterer Weg der nicht enzymatischen NO-Bildung ist die Entstehung von Stickstoffmonoxid aus dem Nitrit-Anion bei saurem pH-Wert. Aus

der Nahrung stammendes Nitrat wird bei saurem pH-Wert wie im Speichel oder Magensaft zu Nitrit und anschließend zu NO reduziert (Graves, 2012; Suschek et al., 2006).

NO ist instabil und schwer zu quantifizieren, Nitrat und Nitrit sind stabile Ausgangsstoffe für das Stickstoffmonoxid und erlauben somit Rückschlüsse auf die NO-Konzentration. Nitrit wird auch als die Hauptspeicherform des NO bezeichnet (Suschek et al., 2006; Rachmilewitz et al., 1995).

NO ist an vielen, sowohl physiologischen als auch pathologischen Reaktionen im menschlichen Körper beteiligt. In hohen Konzentrationen kann NO in einer Kombination mit Superoxidanionen zu Schädigungen von gesundem Gewebe beitragen. Eine Übermäßige NO-Produktion wurde im Zusammenhang mit Arthritis sowie dem septischen Schock beobachtet. Des Weiteren wurde bei Erkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa eine erhöhte Aktivität der NO-Synthasen festgestellt (Rachmilewitz et al., 1995; Nathan und Xie, 1994).

NO spielt eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl von entzündlichen, hyperproliferativen und autoimmunen Erkrankungen. In Bezug auf die entzündliche Hautkrankheit Psoriasis wird dem NO in hohen Konzentrationen eine Hemmung der Kreatinozytenproliferation nachgesagt (Bruch-Gerharz et al., 2003).

NO ist zudem an einer Vielzahl regulatorischer Prozesse wie der Peristaltik, Neurotransmission und Blutdruckregulation beteiligt (Nathan und Xie, 1994). Durch seine vasodilatatorische Wirkung schützt es vor Hypoxie. Weiterhin hat NO antibakterielle Effekte und dient der effektiven Abwehr von Krankheitserregern sowie der Zerstörung von Tumorzellen. Dem Radikal wird außerdem eine schützende Wirkung von UVA- oder ROS-induziertem Zelltod nachgesagt (Suschek et al., 2006; Liew und Cox, 1991; Rachmilewitz et al., 1995). Eine reduzierte NO-Verfügbarkeit wurde im Zusammenhang mit Diabetes mellitus und arterieller Hypertonie beobachtet. Weiterhin scheint eine niedrigere NO-Verfügbarkeit zu einer erhöhten Thrombozytenaktivität und Vasokonstriktion sowie verstärkten endothelialen Wachstumsprozessen beizutragen und somit das Risiko für Atherosklerose zu erhöhen (Schmidt et al., 2010).

1.3.2 Entstehung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies

Reaktive Stickstoffspezies (RNS) entstehen hauptsächlich aus der Reaktion von Stickstoffmonoxid und Sauerstoff. Hauptprodukt ist das Peroxynitrit-Anion. Liegt eine größere Konzentration an Sauerstoff als an Stickstoffmonoxid vor, so entstehen vor allem Peroxynitrat oder Nitrit (Graves, 2012). In wässriger Lösung bei ausgeglichenem pH-Wert besteht ein Gleichgewicht zwischen Stickstoffmonoxid und Salpetersäure. Dieses steht wiederum mit Distickstofftrioxid im Gleichgewicht, welches anschließend zu Stickstoffmonoxid und Stickstoffdioxid homolysiert wird (Abb. 8). Stickstoffdioxid besitzt eine hohe Reaktivität. In Anwesenheit von Wasserstoffperoxid können reaktive Stickoxidspezies wie Stickstofftrioxid, Peroxynitrit bzw. andere reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen (Suschek et al., 2006).

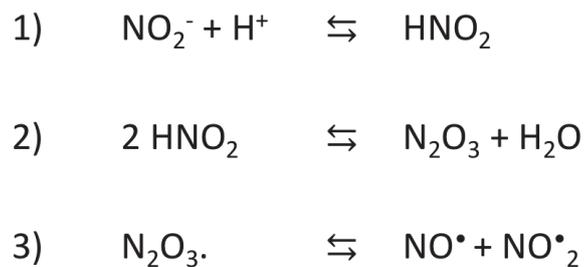


Abb. 8: Die Entstehung von Stickstoffmonoxid (NO) aus Nitrit. Bei ausgeglichenem pH-Wert besteht ein Gleichgewicht zwischen NO- und Salpetersäure (HNO_2), welches mit Distickstofftrioxid (N_2O_3) im Gleichgewicht steht. Dies wird in wässriger Lösung anschließend zu NO^\bullet und Stickstoffdioxid (NO_2^\bullet) homolysiert (eigene Darstellung in Anlehnung an (Suschek et al., 2006)).

Reaktionsbereite Sauerstoffverbindungen und Sauerstoffradikale werden als reaktive Sauerstoffspezies bezeichnet. Radikale sind Moleküle mit ungepaarten Elektronen. Sauerstoff besitzt zwei ungepaarte Elektronen und kann durch die Aufnahme eines Elektrons zu dem Radikal Superoxidanion reduziert werden. Meist entstehen die Superoxidanionen in der Atmungskette und werden u. a. von Mitochondrien gebildet. Ein erhöhter Sauerstoffpartialdruck führt zu einer erhöhten Konzentration von reaktiven Sauerstoffspezies. Eine weitere Quelle für die Entstehung von Superoxidanionen stellen Reaktionen durch NAD(P)H-Oxidasen der NOX-Familie in Zellen der Gefäßwand sowie in Leukozyten dar. NOX-2, das sich in Leukozyten befindet, kann über Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid hyperchlorige Säure bilden, die der Immunabwehr dient (Schmidt et al., 2010).

Die Aufnahme eines weiteren Elektrons des Superoxidanions, die in Mitochondrien über die Superoxiddismutase erfolgt, führt zur Entstehung von Wasserstoffperoxid. Der Abbau des Wasserstoffperoxids erfolgt in Peroxisomen durch die Katalase. Als reaktive Sauerstoffspezies werden Superoxidanion, Wasserstoffperoxid und das besonders reaktive Hydroxyl-Radikal bezeichnet. Reaktive Sauerstoffspezies haben eine Doppelfunktion. Sie dienen als intra- und extrazelluläre Signalmoleküle, können aber auch Zellmembranen schädigen und somit zu Störungen von Rezeptoren und Mitochondrien sowie letztendlich zu Schädigungen der DNA beitragen. Als antioxidative Substanzen werden die Superoxiddismutase, die Katalase und Radikalfänger wie Vitamin E und Vitamin C bezeichnet (Schmidt et al., 2010; Graves, 2012).

Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RONS) zeichnen sich durch ihre hohe Reaktivität sowie ihre begrenzte räumliche Ausdehnung aus. Zudem scheinen die RONS unter anderem an der Entstehung kardiovaskulärer sowie neurodegenerativer Erkrankungen, Autoimmunkrankheiten, Diabetes mellitus sowie Lungenerkrankungen beteiligt zu sein. Durch ultraviolette Sonneneinstrahlung kommt es in der Haut über die Induktion der iNOS zur Entstehung von RONS, welche wiederum im Zusammenhang mit chronischen Hautentzündungen, atopischer Dermatitis, Psoriasis und Hautkrebs stehen (Graves, 2012).

1.3.3 Effekte reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies

Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RONS) werden unter anderem in Makrophagen und Neutrophilen gebildet und dienen der Immunabwehr. Sie spielen in der antimikrobiellen, antimykotischen sowie der antiparasitären Therapie eine zentrale Rolle. RONS fungieren bei der Wundheilung als Schlüsselakteure und können diese beeinflussen. Sie sind wichtig für die Aktivierung der Thrombozyten. Wasserstoffperoxid dient als *second-messenger* für verschiedene Wachstumsfaktoren wie PDGF, TGF β und VEGF (Soneja et al., 2005; Graves, 2012). Darüber hinaus sind die RONS im Rahmen der Wundheilung maßgeblich an Entzündungs- und Abwehrreaktionen beteiligt. Die bakterizide Wirkung von

Antibiotika entfaltet sich ebenfalls über die Entstehung von RONS. Gleiches gilt für die antiparasitäre Therapie (Graves, 2012).

Nathan und Ding sagen den RONS entzündungshemmende als auch entzündungsfördernde Effekte nach (Nathan und Ding, 2010). Thomas et al. beschreiben die konzentrationsabhängigen Effekte der RONS. In niedrigen Konzentrationen können diese das Wachstum fördern und die Apoptose hemmen, während sie in höheren Konzentrationen die Apoptose fördern und den Zellzyklus hemmen (Thomas et al., 2008).

Des Weiteren wird einerseits beschrieben, dass RONS zu Mutationen und der Entstehung von Krebs beitragen können (Harman, 1956; Graves, 2012), andererseits wird postuliert, dass RONS Krebszellen abtöten können. Die Effekte der RONS werden bereits in der Krebstherapie genutzt. In der Strahlentherapie wird die Tumor-DNA neben Photonen auch über sekundär gebildete RONS angegriffen. Chemotherapeutika wirken ebenfalls unter anderem über reaktive Sauerstoff- und Stickstoff-Spezies (Graves, 2012; Mikkelsen und Wardman, 2003).

Einige Ergebnisse deuten darauf hin, dass RONS eine besondere Rolle im Alterungsprozess spielen (Harman, 1956; Graves, 2012; Lapointe und Hekimi, 2010). Ristow und Schmeisser postulieren, dass Kalorien- sowie Glucoserestriktion zusammen mit Bewegung zu einem erhöhten mitochondrialen Metabolismus sowie einer erhöhten ROS-Bildung beitragen. Dies scheint zu einer erhöhten Stressresistenz, einer verbesserten antioxidativen Abwehr sowie einer verlängerten Lebensdauer zu führen (Ristow und Schmeisser, 2011).

RONS sind demnach sowohl an altersbedingten Krankheiten beteiligt, können jedoch ebenfalls zu einer Verlängerung des Lebens beitragen (Ristow und Schmeisser, 2011; Graves, 2012; Hekimi et al., 2011).

Insgesamt ist die Rolle der RONS differenziert zu betrachten. Entscheidend ist es dabei, ein Gleichgewicht zwischen den nützlichen und schädlichen Effekten zu erreichen (Graves, 2012; Halliwell, 2006). In niedrigeren Konzentrationen scheinen die Effekte der RONS auf den Organismus eher positiv zu sein, während in höheren Konzentrationen die toxischen Effekte zu überwiegen scheinen (Calabrese et al., 2004; Graves, 2012; Droge, 2002).

1.3.4 Plasma und reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies

Wie bereits zuvor beschrieben, handelt es sich beim Plasma um ein ionisiertes Gasgemisch, welches unter anderem aus freien Elektronen, Ionen, Radikalen und RONS besteht. Durch die Anwesenheit von Sauerstoff in der Umgebungsluft können bei der Generierung von Plasma reaktive Sauerstoffspezies entstehen. Es werden unter anderem Hydroxyl-Radikale, Superoxide sowie Wasserstoffperoxid gebildet (Ziuzina et al., 2013; Oehmigen et al., 2010; Arjunan et al., 2011). Des Weiteren führen das Vorhandensein von Stickstoff in der Umgebungsluft sowie die Anregung mittels Plasma zur Entstehung von reaktiven Stickstoffspezies. Als durch das ionisierte Gasgemisch entstehende RNS sind unter anderem Nitrat, Nitrit, Stickoxid und Peroxynitrit zu nennen (Ziuzina et al., 2013; Arjunan et al., 2011; Laroussi und Leipold, 2004).

Diese entstehenden redoxaktiven Spezies entsprechen denen, die im menschlichen Körper selbst gebildet werden und an vielen verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt sind. ROS und RNS gehören zu diesen entstehenden Produkten. Da redoxaktive Spezies auch im menschlichen Körper vorkommen, können sie über körpereigene antioxidative Mechanismen unschädlich gemacht werden. Demnach können mögliche, über redoxaktive Spezies vermittelte toxische Effekte des Plasmas durch körpereigene Systeme unschädlich gemacht werden (von Woedtke et al., 2016; Droge, 2002).

Eine große Rolle für die antioxidative Response einer Zelle spielt der Transkriptionsfaktor Nrf2. Schmidt et al. konnten nachweisen, dass nach einer Plasmabehandlung von Keratinozyten der Nrf2-Signalweg aktiviert wird. Dies bestätigt die Induktion körpereigener Schutzmechanismen zum Schutz gegen Plasma-generierte redoxaktive Spezies (von Woedtke et al., 2016; Schmidt et al., 2015). Im Sinne der Redoxbalance muss ein Gleichgewicht zwischen oxidativen und reduzierenden Prozessen in der Zelle oder im Gewebe gewährleistet sein. Wird die zelluläre Redoxbalance überschritten, kann es zu Schädigungen der DNA kommen. Diese Schäden können repariert werden oder zur Induktion des programmierten Zelltods in der Zelle führen. Wende et al. konnten zudem nachweisen, dass Zellen eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber einer Plasmabehandlung aufweisen (Wende et al., 2014).

Plasma wirkt demnach selektiv auf verschiedene Zelltypen. T-Lymphozyten scheinen sehr empfindlich auf RONS zu reagieren, während Keratinozyten und Fibroblasten unempfindlicher erscheinen (von Woedtke et al., 2016; Wende et al., 2014).

Es wurde ein Zusammenhang zwischen der zellulären Sensitivität der Zellen und der Teilungsrate beobachtet. Demnach reagieren Zellen, die sich schnell teilen, empfindlicher auf eine Plasmabehandlung als Zellen mit einer niedrigeren Verdopplungszeit. Des Weiteren spielen Faktoren wie die Behandlungsdauer und demzufolge die Plasmadosis eine entscheidende Rolle in Bezug auf die schädigenden Effekte (von Woedtke et al., 2016; Hasse et al., 2016; Lendeckel et al., 2015).

RONS sind nicht nur an zellschädigenden Prozessen beteiligt. Sie spielen zudem eine essenzielle Rolle bei der Zelleproliferation/-differenzierung und der Zell-Zell-Kommunikation. Über gesteigerte Genexpression von Enzymen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren könnte die Wundheilung mittels Plasma stimuliert werden. So wird z. B. die Ausschüttung des Fibroblasten-Wachstumsfaktors FGF2 durch eine kurze Plasmabehandlungsdauer erhöht. Dieser Effekt wird über reaktive Sauerstoffspezies vermittelt. Neben vielen weiteren Wachstumsfaktoren wird die Freisetzung von VEGF ebenfalls über ROS stimuliert. Über diese Wachstumsfaktoren wird die Migration und Proliferation von Endothelzellen sowie der Angiogenese stimuliert. Diese Effekte könnten sich positiv auf die Wundheilung auswirken (Arjunan et al., 2011; von Woedtke et al., 2016; Kalghatgi et al., 2010).

Die Entstehung von RONS kann durch verschiedene Parameter beeinflusst werden. Dazu gehören die Behandlungsdauer, die Temperatur, die Plasmaanregung sowie der Gasdruck und die Gaszusammensetzung (Arjunan et al., 2011; Ziuzina et al., 2013). Anhand von Studien konnte festgestellt werden, dass Zellen, die mit niedriger Intensität oder Einwirkdauer behandelt wurden, stimuliert werden. Eine hohe Intensität oder lange Behandlungsdauer bewirken hingegen eine Inaktivierung oder Abtötung der Zellen (von Woedtke et al., 2016; Hasse et al., 2016; Lendeckel et al., 2015).

Während sich die stimulierenden Effekte der plasmaproduzierten RONS positiv auf die Wundheilung auswirken könnten, können die inaktivierenden Effekte zur Dekontamination genutzt werden. Reaktive Stickstoffspezies (RNS) sind hauptsächlich für die Entstehung von Nitriten und Nitraten in flüssigen Medien verantwortlich, welche wiederum zum Ansäuern des Mediums beitragen (Ziuzina et al., 2013). Die Entstehung von RONS sowie das Herabsetzen des pH-Wertes scheinen die antibakterielle Wirksamkeit des Plasmas wesentlich zu beeinflussen, sind jedoch auch für die toxischen Effekte auf humane Zellen verantwortlich (Balzer et al., 2015; Ziuzina et al., 2013; Liu et al., 2010).

Oehmigen et. al. konnten in ihren experimentellen Studien den Effekt der durch CAP produzierten RNS auf die Ansäuerung von Flüssigkeiten bestätigen. Den größten Einfluss auf den sauren pH-Wert scheint dabei die Salpetersäure zu haben. Diese scheint jedoch nicht allein für die antimikrobiellen Effekte des Plasmas verantwortlich zu sein. Als weiterer Faktor kommt das produzierte Wasserstoffperoxid in Betracht. Die reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies scheinen somit gemeinsam für die sterilisierende Wirkung verantwortlich zu sein (Oehmigen et al., 2010).

Balzer et. al. konnten nachweisen, dass reaktive Sauerstoffspezies wie das Wasserstoffperoxid, reaktive Stickstoffspezies wie Nitrat und Nitrit sowie ein niedriger pH-Wert wesentlich an der reduzierten Lebensfähigkeit von humanen Zellen beteiligt zu sein scheinen. Sie vermuten jedoch, dass es weitere Faktoren gibt, welche die Toxizität des Plasmas begründen (Balzer et al., 2015).

1.4 Anwendungsmöglichkeiten von Plasma

Seit den 1960er Jahren wird Plasma bereits zur Verbesserung der Biokompatibilität von Implantaten eingesetzt und es wurde damit begonnen, die antibakteriellen Effekte des Plasmas zu studieren (Gerling und Weltmann, 2016). In den 70er Jahren kam Niederdruck-Radio-Frequenzplasma in der Industrie zur Aufbereitung zum Einsatz. Die Generierung des Niederdruckplasmas machte allerdings das Vorhandensein einer Vakuumkammer erforderlich, welche die Verwendung von

Plasma kompliziert und teuer gestaltete (Gerling und Weltmann, 2016; Liu und Lu, 2010).

Thermisches Plasma wird unter anderem zum Schweißen sowie zur Herstellung von Energiesparlampen und Plasmafernsehern genutzt (Arjunan et al., 2011). Aufgrund seiner antibakteriellen Wirksamkeit findet das thermische Plasma im Bereich der Sterilisation und Desinfektion Anwendung. Ein weiteres Anwendungsgebiet ist die Oberflächenmodifikation (Hoffmann et al., 2013; Haertel et al., 2014; Heinlin et al., 2011; Liu und Lu, 2010; Metelmann et al., 2016; Metelmann et al., 2018).

Mit der Entdeckung von Atmosphärendruckplasma konnte der Einsatz in den 90er Jahren erweitert werden. Der Einsatz des Plasmas zur Behandlung von vitalen, hitzeempfindlichen Zellen und Geweben wurde möglich. Dies war ein großer Schritt in der Entwicklung der Plasmamedizin und eröffnete viele neue Anwendungsmöglichkeiten des ionisierten Gasgemisches (Balzer et al., 2015; von Woedtke et al., 2016; Helmke, 2016; Liu und Lu, 2010).

Seit 1996 wird kaltes atmosphärisches Plasma zur Sterilisation eingesetzt. Ein großer Vorteil ist die Unabhängigkeit von der Oberflächenbeschaffenheit: Es kann auch in kleine Hohlräume eindringen und damit eine hohe Sterilisationsqualität gewährleisten (Heinlin et al., 2011). Zu den weiteren Anwendungsbereichen von kalten Plasmen zählen unter anderem die Dekontamination von Lebensmitteln, die Aufbereitung von Medizinprodukten sowie die Reinigung von Abwässern (Kramer et al., 2016).

Aufgrund der möglichen antimikrobiellen Wirksamkeit sowie antiinflammatorischer Effekte des CAP liegt der Fokus der Anwendung des ionisierten Gasgemisches im Bereich der Wundheilung sowie der Behandlung von Hautkrankheiten (Balzer et al., 2015). Ein weiteres großes Forschungsfeld in der Plasmamedizin ist der Einsatz von Plasma im Bereich der Tumorthherapie (Liu und Lu, 2010).

1.4.1 Antibakterielle Effekte des CAP

Bakterielle Resistenzen stellen weltweit ein zunehmendes Problem dar (Becker et al., 2019; Nguyen et al., 2018). Bisher kommen zur Sterilisation verschiedene chemische, mechanische, physikalische und thermische Verfahren zum Einsatz. Diese Prozesse gehen allerdings mit einigen nachteiligen Effekten einher, wie die Beschädigung von Materialien, die eingeschränkte Effektivität der Dekontamination, hohe anfallende Kosten sowie – in Abhängigkeit von der Oberflächenbeschaffenheit – Schwierigkeiten bei der Anwendung (Stapelmann et al., 2013; Heinlin et al., 2011; Rauscher et al., 2010; Song et al., 2009).

Kaltes Atmosphärendruckplasma erlangte in den letzten Jahren aufgrund seiner antibakteriellen Wirksamkeit unter nicht thermischen Bedingungen mehr und mehr an Bedeutung. Es stellt einen alternativen Ansatz zur kostengünstigen, effizienten und schnellen Eliminierung von Mikroorganismen und Pathogenen von kontaminierten Lebensmitteln oder Medizinprodukten dar (Stapelmann et al., 2013; Ziuzina et al., 2013; Song et al., 2009). In der Lebensmittelindustrie wird CAP bereits an Stelle einer thermischen Pasteurisierung zur Aufbereitung von Milch genutzt (Nguyen et al., 2018).

Es existieren verschiedene Parameter, welche die Zusammensetzung des Plasmas sowie seine antibakterielle Wirksamkeit beeinflussen. Zu diesen Faktoren zählen die Behandlungsdauer, die angelegte Spannung, der Abstand zwischen den Elektroden, die Gaszusammensetzung und die Art des behandelten Bakteriums. Bei Verwendung der DBD können weitere Faktoren Einfluss nehmen, wie die Aufbewahrungsdauer nach der Behandlung, das verwendete Medium sowie die Position der Probe zur Plasmaquelle (Ziuzina et al., 2013).

Die antibakteriellen Effekte des Plasmas sind bedingt durch UV-Strahlung, freie Radikale, hochaktive RONS, den sauren pH-Wert sowie die elektrostatischen Kräfte (Stapelmann et al., 2013; Oehmigen et al., 2010; Daeschlein, 2016). In Untersuchungen von Ziuzina et al. konnte nachgewiesen werden, dass allein durch einen sauren pH-Wert nicht die gleiche antibakterielle Wirksamkeit wie durch eine Plasmabehandlung erzielt werden kann (Ziuzina et al., 2013). Der Vorteil des ionisierten Gasgemisches liegt in der Kombination der verschiedenen Spezies, wodurch auch bei geringeren einzelnen Konzentrationen eine gute Wirksamkeit

gewährleistet werden kann (Daeschlein, 2016). Nicht thermisches Plasma kann unter anderem über reaktive Sauerstoffspezies zur Zerstörung von grampositiven und gramnegativen Bakterien führen (Han et al., 2016; Nguyen et al., 2018).

1.4.2 Effekte des CAP auf Tumorzellen

Im Jahre 2020 wurden die weltweit an Krebs erkrankten Menschen auf 19,3 Millionen geschätzt. Es wird mit einem weiteren deutlichen Anstieg an Krebserkrankungen in den nächsten Jahren gerechnet (Sung et al., 2021). Erstmals wurde im Jahre 2007 über die toxischen Effekte des Plasmas auf maligne Zellen berichtet. Die Wirksamkeit des ionisierten Gases gegen viele verschiedene Krebszellen wurde bereits in verschiedenen *In-vitro*-Studien nachgewiesen. Neben Hirntumoren sind Haut- und Brustkrebs die im Rahmen der aktuellen Forschung am häufigsten untersuchten Malignome (Yan et al., 2017).

CAP weist eine hohe Selektivität gegenüber Krebszellen auf, womit ein großer Vorteil gegenüber herkömmlichen Therapiemöglichkeiten gegeben ist (Yan et al., 2017; Van der Paal et al., 2017; Guerrero-Preston et al., 2014; Dubuc et al., 2018). Es existieren verschiedene theoretische Ansätze zur Begründung dieser Selektivität. Einer dieser Ansätze beruht darauf, dass Krebszellen im Vergleich zu gesunden Zellen eine höhere Anzahl an Aquaporinen und weniger Cholesterin in ihrer Zellmembran besitzen. Aufgrund dessen können ROS leichter in die Krebszellen diffundieren und sind weniger resistent gegen Peroxidation. Dies führt zur Induktion von Apoptose in den malignen Zellen (Van der Paal et al., 2017; Dubuc et al., 2018; Yan et al., 2017). Dass maligne Zellen an sich schon höhere intrazelluläre ROS-Konzentrationen besitzen als nicht maligne Zellen, stellt einen weiteren theoretischen Ansatz dar. Diese hohe Konzentration an ROS soll dazu führen, dass die tolerable ROS-Schwelle in malignen Zellen schneller überschritten wird (Yan et al., 2017; Dubuc et al., 2018; Graves, 2012). Des Weiteren wurde, wie oben bereits beschrieben, ein Zusammenhang zwischen der zellulären Sensitivität der Zellen und der Teilungsrate beobachtet. Demnach reagieren Zellen mit einer höheren Proliferationsrate empfindlicher auf eine Behandlung mit Plasma als jene mit einer niedrigeren Verdopplungszeit (von Woedtke et al., 2016; Hasse et al., 2016; Lendeckel et al., 2015).

1.4.3 Einfluss des CAP auf die Wundheilung

Wunden werden als chronisch bezeichnet, wenn sie länger als zwei bis drei Wochen bestehen. Ursachen für die Entstehung chronischer Wunden sind arterielle oder venöse Durchblutungsstörungen, Diabetes mellitus oder konstante Druckbelastung (Tiede und Emmert, 2016). Insgesamt sind etwa 1–2 % der Gesamtbevölkerung von chronisch-venösen Ulzerationen betroffen, die Anzahl der betroffenen Patienten ist stetig steigend. Im Durchschnitt beträgt die Heilungsdauer etwa 24 Wochen. Bei 15 % der Patienten zeigen die Wunden jedoch keinerlei Heilungstendenz. An der reduzierten Heilungstendenz von chronischen Wunden ist eine bakterielle Besiedlung beteiligt (Isbary et al., 2012; Haertel et al., 2014; Isbary und Shimizu, 2016), weswegen die Zunahme der bakteriellen Resistenzen, die in der Medizin ein immer größer werdendes Problem darstellen, einen negativen Einfluss auf die Heilungstendenz hat. Die Defizite in der Neuzulassung von Antibiotika sowie der Mangel an Investitionen in die Entwicklung neuer wirksamer Antibiotika wirken sich ebenfalls negativ auf die Therapiemöglichkeiten aus (Daeschlein, 2016).

Kaltes Atmosphärendruckplasma liefert einen vielversprechenden Ansatz im Hinblick auf die Therapie von Wundheilungsstörungen und Hautkrankheiten. Die antiseptischen Effekte, die Stimulation und Förderung der Migration von Hautzellen, die pro- und antiinflammatorischen sowie pro-angiogenetischen Effekte des Plasmas könnten sich positiv auf die Wundheilung auswirken (Haertel et al., 2014; von Woedtke et al., 2016; Lloyd et al., 2010). Das Alleinstellungsmerkmal des Plasmas ist die Kombination von verschiedenen Spezies, welche so bereits in niedrigerer Dosis ihre Wirksamkeit entfalten können. Zu diesen Spezies zählen freie Radikale, Ionen, Elektronen, RONS sowie UV-Strahlung und elektrische Felder (Heinlin et al., 2011; Haertel et al., 2014; Daeschlein, 2016; von Woedtke et al., 2013).

Anhand einiger Studien konnte die Effektivität des Plasmas in Bezug auf die inaktivierende Wirkung auf Mikroorganismen bereits nachgewiesen werden (Haertel et al., 2014; Becker et al., 2019; Daeschlein, 2016; Isbary et al., 2012).

Auch in der Therapie multiresistenter Erreger auf der Haut und in Wunden erwies sich das kalte Atmosphärendruckplasma als effektiv wirksam (Haertel et al., 2014; Daeschlein, 2016; Daeschlein et al., 2014; Maisch et al., 2012).

Die Angiogenese spielt im Rahmen der Wundheilung eine große Rolle. Ziel ist es, die Angiogenese zu fördern, um die Wundheilung zu verbessern. Faktoren, die die Ausbildung neuer Gefäße fördern, sind Sauerstoffmangel, Wachstumsfaktoren wie VEGF, EGF, EGE, Zytokine, NO und reaktive Sauerstoffspezies. Anhand von *In-vitro*-Studien konnte gezeigt werden, dass die Proliferation von Endothelzellen durch die Behandlung mittels Plasma stimuliert werden kann. Die Wachstumsfaktoren FGF-2 und Stickstoffmonoxid scheinen hierbei eine entscheidende Rolle zu spielen (Haertel et al., 2014; Balzer et al., 2015; Kalghatgi et al., 2010; Arjunan et al., 2011).

Haertel et al. beobachteten pro-angiogenetische Effekte, die mit dem, aus Keratinozyten freigesetzten, Wachstumsfaktor VEGF in Korrelation stehen (Haertel et al., 2014). Des Weiteren scheinen Wasserstoffperoxid und Hydroxyl-Radikale positive Effekte auf die Angiogenese zu haben (Balzer et al., 2015).

Im Hinblick auf die Plasmatherapie sind stets die dosis- und zeitabhängigen Effekte zu beachten. Anhand dieser können die Entstehung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies, die Erzeugung von Apoptose und Nekrose, die Schädigung der Mitochondrien, die Zellproliferation und Zellmigration sowie der DNA-Abbau und -Zyklus beeinflusst werden. Allgemein lässt sich festhalten, dass eine geringe Plasmadosis und kurze Behandlungszeit stimulierend auf die Zellen wirken. Es kommt zur Induktion der Proliferation, DNA-Reparatur und Migration. Bei Verwendung einer hohen Plasmadosis und langen Behandlungsdauer lassen sich toxische Effekte des Plasmas nachweisen. Durch Proliferationsstopp, Apoptose, Schädigung der DNA und Zellzyklusarrest kommt es zum Zelltod (Haertel et al., 2014; Tiede und Emmert, 2016; von Woedtke et al., 2013).

Anhand von *In-vivo*-Studien konnten bisher keine toxischen Wirkungen des Plasmas nachgewiesen werden. Zudem scheint es allgemein gut verträglich zu sein (Nguyen et al., 2018; Metelmann et al., 2013; Heinlin et al., 2013; Isbary et al., 2012; Isbary et al., 2010; Brehmer et al., 2015).

1.4.4 Anwendung von Plasma in der Klinik

Heute ist das ionisierte Gas bereits seit einigen Jahren fester Bestandteil des klinischen Alltags. Die Argon-Plasma-Koagulation wird zur Kauterisation und zur Abtragung von Geweben genutzt (von Woedtke et al., 2016). Die ersten Versuche zur Kauterisation von Gewebe mittels Argon-Plasma-Koagulation im Rahmen operativer Eingriffe begannen bereits in den 1970er Jahren (Morrison und Lagow, 1977). Des Weiteren findet der vierte Aggregatzustand Anwendung in Form von Plasmadisplays, zur Sterilisation von Materialien im medizinischen Bereich, als umweltfreundliche und kostengünstige Option zur Desinfektion und Entfernung von Schadstoffen aus dem Wasser sowie in der Lebensmittelindustrie (Kramer et al., 2016).

Anhand klinischer Untersuchungen konnten Isbary et al. eine effektive Reduktion der bakteriellen Besiedlung bereits nach einer zweiminütigen Behandlung mittels indirekter DBD-Geräte (MicroPlaSter alpha und MicroPlaSter beta) beobachten (Isbary et al., 2012). Gan et al. haben weiterhin nachgewiesen, dass CAP bereits in niedriger Dosis zur Desinfektion von Wunden eingesetzt werden kann (Gan et al., 2019). Neben der antibakteriellen und desinfizierenden Wirkung konnten ebenfalls durchblutungsfördernde Effekte nachgewiesen werden (Schönebeck und Wandke, 2016; Gerling und Weltmann, 2016).

Isbary et al. bestätigten, dass die Anwendung von Plasma *In-vivo* unbedenklich ist und Plasma positive Effekte auf chronische Wunden hat (Isbary et al., 2012). Gao et al. untersuchten in ihrer klinischen Studie die Effekte von CAP auf oberflächliche Hautläsionen wie traumatische Wunden, Pyoderma gangraenosum, diabetische Füße, chronische Ekzeme sowie eine genitale Riesenwarze. Bei allen Patienten konnte nach einer CAP-Therapie ein kompletter Wundverschluss beobachtet werden (Gao et al., 2019), ohne dass diese negative Effekte hervorrief. Weiterhin konnten Heinlin et al. eine signifikant verbesserte Heilung im Bereich von Spalthautentnahmestellen am Oberschenkel nach Behandlung mittels CAP nachweisen (Heinlin et al., 2011). Ein weiterer möglicher Anwendungsbereich könnte die Behandlung von Narben sein. Metelmann et al. untersuchten die Effekte einer Therapie mit Argon-Plasma auf die mit einem ablativen Laser verursachte Narben. Untersucht wurden die Läsionen im Hinblick auf Verkrustungen,

Hyperpigmentierungen, Hypopigmentierungen, Präkanzerosen, Hyper- und Hypotrophien sowie das ästhetische Ergebnis. Nach zwölf Monaten wurde bei keinem der Patienten eine präkanzerotische Läsion nachgewiesen. Der deutlichste Effekt zeigte sich bei der Beurteilung der ästhetischen Ergebnisse. Hierbei ergab sich ein deutlich besseres Ergebnis als bei der unbehandelten Kontrolle (Metelmann et al., 2013).

Bereits zur klinischen Anwendung zugelassen ist der kINPen®, der von Wissenschaftlern der Universität Greifswald entwickelt wurde. Der kINPen® wurde in Zusammenarbeit mit der *neoplas tools GmbH* entwickelt und ist im Jahre 2013 als Medizinprodukt der Klasse IIa erklärt worden. Der Aufbau des Gerätes entspricht dem eines Plasmajets (Helmke, 2016; Helmke et al., 2013). Daeschlein et al. konnten bereits im Jahre 2012 nachweisen, dass der kINPen® zur Dekontamination der bakteriell besiedelten Haut beiträgt, ohne dabei negative Effekte zu erzeugen (Helmke, 2016; Daeschlein et al., 2012). Im Rahmen weiterer klinischer Studien konnte außerdem gezeigt werden, dass der kINPen® zur deutlichen Reduktion der Wundfläche beiträgt und zu besseren Ergebnissen führt als eine Behandlung mittels Octenisept. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass lediglich geringe Mengen an Octenisept sowie eine kurze Einwirkdauer verwendet wurden, welche nicht der klinischen Anwendung entsprachen (Helmke, 2016; Bekeschus et al., 2016).

Auch eine Plasmaquelle des DBD-Typs, das PlasmaDerm-Gerät, ist bereits als Medizinprodukt der Klasse IIa zugelassen. Brehmer et al. bestätigten die sichere klinische Anwendung des Plasmas zur Therapie von chronischen Ulzerationen. Untersucht wurde die Wirkung von direktem DBD-Plasma (Plasma-Derm®) auf chronische Wunden bei chronisch venöser Insuffizienz. Es konnte lediglich direkt nach der Behandlung mit Plasma eine Reduktion der bakteriellen Besiedlung nachgewiesen werden. Weiterhin konnte, verglichen mit der Kontrollgruppe, kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Größe der Ulzerationen beobachtet werden (Brehmer et al., 2015).

1.5 Herausforderungen in der klinischen Anwendung

Die Plasmatherapie eröffnet in der Medizin viele neue Anwendungsmöglichkeiten. Es sind jedoch weitere Studien notwendig, um normierte Standards für die Einstellungen der Plasmaquellen festzulegen. Weiterhin sollten weitere randomisierte, kontrollierte klinische Studien zur genaueren Evaluation der Wirkung des Plasmas durchgeführt werden (Haertel et al., 2014).

Durch Plasma kann der programmierte Zelltod von Krebszellen induziert werden. Darüber hinaus scheint Plasma selektiv auf maligne Zellen zu wirken. Aus diesen Gründen könnte Plasma allein oder in Kombination mit der herkömmlichen Tumorthherapie in Zukunft Anwendung finden. Auch im Bereich der Krebstherapie sind jedoch weitere Studien erforderlich (Dubuc et al., 2018).

Die bisher zur klinischen Anwendung zugelassenen Plasmaquellen besitzen ein CE-Zertifikat. Damit sind sie sicher und medizinisch-technisch leistungsfähig. Es müssen verschiedene Komponenten untersucht werden, um die Sicherheit des Plasmas zu gewährleisten. Dazu zählen UV-Strahlung, Stromfluss und Gasemissionen (Tiede und Emmert, 2016; Heinlin et al., 2010; von Woedtke et al., 2013). Es existiert bereits eine Leitlinie, in der die Anforderungen an die Plasmaquellen näher definiert werden. Dennoch steht die Plasmamedizin vor der Herausforderung, allgemeingültige Grenzwerte für die jeweiligen Plasmaquellen zu entwickeln. Besonders sind hierbei die entstehenden Radikale und RONS, die Strahlung und der Strom von Bedeutung. In Abhängigkeit von der Dosis konnten bereits geringe Mutationsraten beobachtet werden. Es sind weitere Untersuchungen nötig, um die schädigenden Effekte des Plasmas auf die DNA näher beurteilen zu können. Eine zu starke Plasmabehandlung scheint allerdings eher zu Apoptose zu führen als zu Mutationen. Des Weiteren stellen Verbrennungen und große Wundflächen eine Herausforderung für die Anwendung des Plasmas dar (Tiede und Emmert, 2016).

1.6 Ziele und Fragestellung

Im Rahmen dieses Forschungsprojekts wurde eine Kaltplasmaquelle, die DBD (*Dielectric Barrier Discharge*), verwendet. Die Zusammensetzung des Plasmas kann anhand der Spannung (kV), der Frequenz (Hz) und der Behandlungsdauer moduliert werden.

Vorstudien haben bereits gezeigt, dass im Plasma bzw. zwischen den Elektroden verschiedene Spezies wie freie Radikale, Ionen, Elektronen, reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RONS) sowie UV-Strahlung und elektrische Felder entstehen (von Woedtke et al., 2013). Wie oben bereits beschrieben, sind die Effekte der RONS vielfältig. In niedrigen Konzentrationen können sie positiv auf den Organismus wirken, während in höheren Konzentrationen die toxischen Effekte zu überwiegen scheinen (Droge, 2002).

Leider gibt es keine Studien, die den Einfluss der Variation verschiedener Parameter der DBD auf die Entstehung der RONS sowie deren biologische Wirkung hin untersucht haben. In diesem Zusammenhang haben befasst sich die vorliegende Studie mit der Fragestellung, welche Effekte verschiedene Betreiberparameter der DBD (Frequenz, Behandlungsdauer) auf die generierten Nitrat-, Nitrit- und Wasserstoffperoxid-Konzentrationen sowie den pH-Wert haben. Des Weiteren wurde in diesem Zusammenhang die Wirkung des energiereichen Gasgemischs auf die Vitalität von humanen dermalen Fibroblasten untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellen

Humane dermale Fibroblasten	<p>Gewonnen aus Haut-Weichteil-Gewebe von 8 Patienten nach Abdominoplastik.</p> <p>7 weibliche und ein männlicher Patient.</p> <p>39–75 Jahre, Mittelwert: $52,4 \pm 15,3$ Jahre.</p> <p>Verwendung mit Zustimmung der Spender und Genehmigung der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Studien-Nr. 3634).</p> <p>Zusammenarbeit mit der Abteilung für Plastische und Ästhetische Chirurgie des Klinikums Köln-Merheim.</p>
-----------------------------	--

2.1.2 Geräte

Name	Hersteller
Digitales Thermometer, <i>GMH3239</i>	GMH GROUP – Greisinger (Regenstauf, Deutschland)
Dielectric Barrier Discharge (DBD)	Ruhr-Universität Bochum (Bochum, Deutschland)
Elektrode, <i>HI764080</i>	Hanna Instruments (Carrollton, TA, USA)
Fluoreszenzmikroskop, <i>Epifluoreszenz-Mikroskop</i>	Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)
Gefrierschrank, <i>Mr. Frosty</i>	Schmidt „Laborgeräte und Umweltsimulation“ <i>Cryo-rate freezer</i> (Pressbaum, Österreich)

Inkubator, <i>NuAire DH AutoFlow CO2 Water-Jacketed Incubator</i>	NuAire Autoflow (Plymouth, MA, USA)
Laborbank, <i>Herasafe®</i>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Lichtmikroskop, <i>Axio Vert 40</i>	Carl Zeiss AG (Oberkochen, Germany)
Multiparameter pH-Meter, <i>HI2020-Edge</i>	Hanna Instruments (Carrollton, TA, USA)
NO/NOx-Analysator CLD 88	Eco Physics GmbH (Hürth, Deutschland)
NO/NOx-Analysator CLD 88 e	Eco Physics GmbH (Hürth, Deutschland)
NO/NOx-Analysator CLD 822r	Eco Physics GmbH (Hürth Deutschland)
pH-Elektrode, <i>InLab Micro</i>	Mettler-Toledo GmbH (Gießen, Deutschland)
pH-Meter, <i>Climatic 766</i>	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG (Berlin, Deutschland)
Photometer, <i>Specord 205</i>	Analytik Jena GmbH (Jena, Deutschland)
Pipetten, <i>Research® fix</i>	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)
Pipettierhilfe, <i>Pipetboy Accu-jet® Pro</i>	Brand GmbH & Co. KG (Wertheim, Deutschland)
Spektrofluorometer, <i>VICTOR3™ V Multilabel Counter Model 1420</i>	PerkinElmer Inc. (Waltham, MA, USA)
Taumel-Rollenmischer, <i>RM5-V 1750</i>	Ingenieurbüro CAT, M. Zipperer GmbH (Ballrechten-Dottingen, Deutschland)
Vortexmischer, <i>IKA® RET</i>	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach, Germany)
Wärmebad, <i>Drybath</i>	Thermo Fisher Scientific, (Waltham, MA, USA)
Zentrifuge, <i>Thermo Scientific Heraeus Megafuge 16 R</i>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

2.1.3 Materialien

Name	Hersteller
Chirurgische Pinzette	MedicoCare (Numansdorp, Niederlande)
Chirurgische Schere	MedicoCare (Numansdorp, Niederlande)
Filter-Pipettenspitzen 50 µl, <i>TipOne</i> ®	Starlab International GmbH (Hamburg, Deutschland)
Filter-Pipettenspitzen 100 µl, <i>TipOne</i> ®	Starlab International GmbH (Hamburg, Deutschland)
Filter-Pipettenspitzen 200 µl, <i>TipOne</i> ®	Starlab International GmbH (Hamburg, Deutschland)
Gefrier Röhrchen, <i>Cryos</i> TM 2 ml	GREINER Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Objektträger, Nr. 11101	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH (Edermünde, Deutschland)
Pasteurpipette, ISO 7712	BRAND GmbH & Co. KG (Wertheim, Deutschland)
Petrischale, <i>Dish 100</i>	SARSTEDT AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
Pipettenspitzen, <i>TipOne</i> ®	Starlab International GmbH (Hamburg, Deutschland)
Skalpell	MedicoCare (Numansdorp, Niederlande)
Zählkammer, <i>Neubauer</i>	BRAND GmbH & Co. KG (Wertheim, Deutschland)
Zellkulturflasche 75cm ² , <i>CELLSTAR</i> ® Cell Culture Flasks Red Filter Cap	GREINER Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Zellkulturflasche 175cm ² , <i>CELLSTAR</i> ® Cell Culture Flasks Red Filter Cap	GREINER Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
0,5-ml-Röhrchen, <i>Safe-Lock Tubes</i> TM	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)
1,5-ml-Röhrchen, <i>Safe-Lock Tubes</i> TM	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)

2-ml-Röhrchen, <i>Safe-Lock Tubes™</i>	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)
5-ml-Stripette, <i>Costar®</i>	Sigma-Aldrich (Bensalem, PA, USA)
10-ml-Stripette, <i>Costar®</i>	Sigma-Aldrich (Bensalem, PA, USA)
15-ml-konisches-Röhrchen, Art.-Nr.: <i>188171</i>	GREINER Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
50-ml-konisches-Röhrchen, Art.-Nr.: <i>227261</i>	GREINER Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
24-Well Platte, <i>CELLSTAR® Tissue Culture Plates</i>	GREINER Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
96-Well Platte, <i>CELLSTAR® Tissue Culture Plates</i>	GREINER Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)

2.1.4 Substanzen

Name	Hersteller
Aqua 1000 ml	B. Braun SE (Melsungen, Deutschland)
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Caliumchlorid-Dihydrat	Sigma-Aldrich (St. Louis, MI, USA)
Dispase-II-Lösung	Sigma-Aldrich (St. Louis, MI, USA)
DMEM 1 g/L Glucose	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach, Deutschland)
D-(+)-Glucose	Sigma-Aldrich (St. Louis, MI, USA)
Ethanol	Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland)
Fluoresceindiaceetat (FDA)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
HEPES	Sigma-Aldrich (Bensalem, PA, USA)
Hoechst 33258	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Katalase	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Kollagenase Typ CLS 255 U/mg	Biochrom GmbH (Berlin, Deutschland)
L-Glutamine 200 mM (100x)	Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumchlorid (0,9 %)	VWR International (Radnor, PA, USA)
Natriumhydroxid	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Natriumnitrat	VWR International (Radnor, PA, USA)
Natriumnitrit	VWR International (Radnor, PA, USA)
Penicillin (100x)	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Phosphat-gepufferte Lösung	Invitrogen AG (Carlsbad, MA, USA)
Propidiumiodid	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Salzsäure (1.0 N)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Schwefelsäure (1.0 N)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Sera Plus Special Processed FBS	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Streptomycin (100x)	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Titaniumoxalat	Sigma-Aldrich (St. Louis, MI, USA)
Trypsin/EDTA-Lösung (10x)	Biochrom GmbH (Berlin, Deutschland)
Vanadium (III) Chlorid	Sigma-Aldrich (St. Louis, MI, USA)

Wasserstoffperoxid	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Zellviabilitätsmessung, <i>CellTiter-Blue</i> ®	Promega Corporation (Madison, WI, USA)

2.1.5 Software

Name	Hersteller
ImageJ	Wayne Rasband, National Institutes of Health (Bethesda, USA)
Microsoft Excel	Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA)
Microsoft PowerPoint	Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA)
Microsoft Word	Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA)
Origin 8	OriginLab Corporation (Northampton, MA, USA)
PowerChrom™	eDAQ Pty Ltd (Denistone East, Australien)
PRISM 8	GraphPad Software (Boston, MA, USA)
ZeissAxioVision	Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellisolation

Haut-Weichteilgewebe wurde operativ gewonnen und anschließend in modifiziertes Medium transferiert und in gekühlten, sterilen Behältnissen in das Labor transportiert. Das Ethikvotum sowie Einverständnis der Patienten liegen vor.

Das Haut-Weichteilgewebe wurde nach Entfernung des Mediums in Petrischalen überführt und anschließend mittels Skalpell portioniert. Es folgte die Inkubation der Gewebeproben in 50 ml Falcons mit 5–10 ml Dispase-II-Lösung über Nacht bei 4 °C. Die Epidermis wurde am nächsten Tag von der Dermis gelöst. Die Schichten der Haut sind in Abbildung 9 dargestellt.

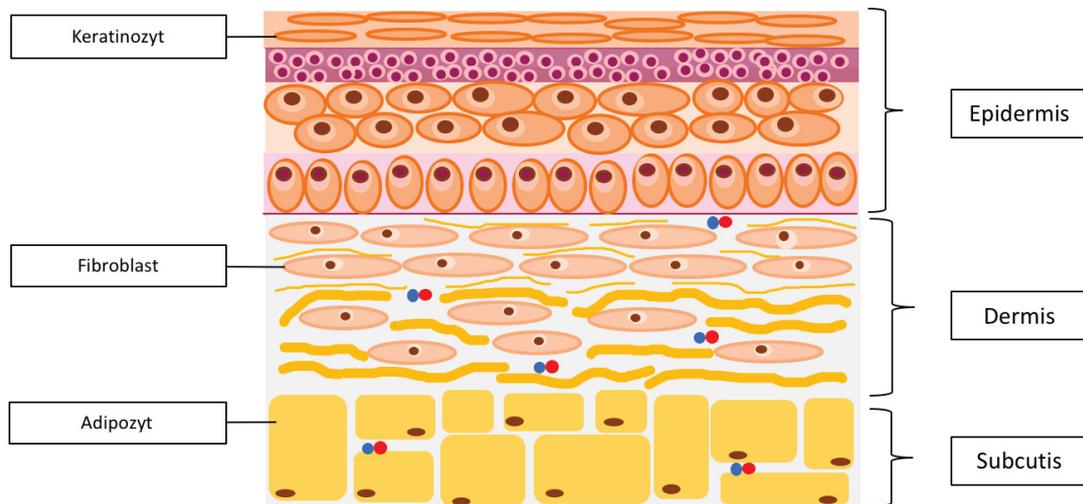


Abb. 9: Schichten der menschlichen Haut Die Haut lässt sich in drei Schichten gliedern. Die Epidermis, Dermis und Subcutis. In der Epidermis befinden sich vor allem die Keratinozyten. Die Fibroblasten sind in der Dermis lokalisiert. Adipozyten befinden sich in der Subcutis (eigene Darstellung in Anlehnung an (Aumüller, 2007)).

Aus der Epidermis konnten Keratinozyten isoliert werden, welche zu weiteren Untersuchungen abgegeben wurden. Die Dermis wurde in ein 50 ml Falcon gegeben. Es folgte die Zugabe einer Kollagenase-Puffer-Lösung und die Inkubation für 45–60 min bei 37 °C. Anschließend wurden die Dermisproben zur weiteren Vermischung zusammen mit der Lösung (Abb. 10) in einen Vortexmischer gegeben. Um die Fibroblasten aus dem Gewebe zu isolieren, wurden diese dann in ein Sieb (50–100 µM) überführt.

Zunächst wurden die Hautproben durch den Filter gepresst, anschließend wurde das Siebe mittels PBS gespült, welches zum Abstoppen der Reaktion führte. Das gewonnene Filtrat wurde in ein neues 50 ml-Röhrchen gegeben und für 10 min bei 300 x g zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde in 10 ml Medium (DMEM) resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Es folgte die Kultivierung der Zellen unter Standardinkubationsbedingungen (37 °C, 5 % CO₂) im Inkubator.

Lösung	Inhaltsstoffe
Dispase-II-Lösung	0.1 % Dispase Typ II 5 % 1 M HEPES Pufferlösung 1 M <i>ad.</i> PBS
Kollagenase-Puffer	100 mM HEPES 120 mM NaCl 50 mM KCl 1 mM CaCl ₂ 5 mM Glucose <i>ad.</i> Aqua dest. Vor Gebrauch 0,2 % Kollagenase I und 1,5 % BSA dazugegeben

Abb. 10: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen. Es werden die verschiedenen Substanzen sowie ihre Konzentrationen in der Dispase-II-Lösung und dem Kollagenase-Puffer angegeben (eigene Darstellung in Anlehnung an (Balzer, 2016)).

2.2.2 Zellkultivierung der Fibroblasten

Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO₂, 90 % Luftfeuchtigkeit) in einem CO₂-Inkubator. Die Zellen wurden zur Kultivierung in 75–175 cm² Zellkulturflaschen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) gegeben. Die Schritte der Zellkultivierung erfolgten unter sterilen Bedingungen unter der sterilen Bank mit bei 121 °C autoklavierten Materialien.

Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM), 100 U/ml Penicillin (Pen), 100 µg/ml Streptomycin (Strep) und 10 % (v/v) fetales Kälberserum (FCS) wurden zu den adhärent wachsenden Fibroblasten gegeben. Ein Wechsel des Zellmediums erfolgte alle drei Tage.

2.2.3 Passagieren der Zellen

Die Zellen wurden regelmäßig passagiert, damit sie ihr Wachstum auch auf 24-Well-Platten oder in Zellkulturflaschen fortsetzen konnten. Das verbrauchte Medium wurde zunächst abgesaugt. Die an der Zellkulturflasche anhaftenden Zellen wurden zweimal mit calcium- und magnesiumfreier phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Es folgte das Absaugen der Salzlösung. Um die noch adhärennten Fibroblasten abzulösen folgte die Hinzugabe von 5–10 ml warmem Trypsin/EDTA. Im Anschluss wurden die Zellkulturflaschen für 5–7 min unter Standardkultivierungsbedingungen in den CO₂-Inkubator gestellt. Um den Zelltod zu verhindern, wurde darauf geachtet, dass die Inkubationszeit nicht überschritten wird. Die Hinzugabe von fetalem Kälberserum (FCS) zu den Zellen folgte nach mikroskopischer Kontrolle der Zellablösung, um das Trypsin/EDTA zu neutralisieren. Anschließend erfolgte die Überführung der Suspension in ein 50 ml Falcon und die fünfminütige Zentrifugation unter 300 x g. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand über dem Pellet abgesaugt. Das Pellet wurde mit einer 1000-µl-Pipette in 10 ml frischem FCS-Medium resuspendiert, bis eine annähernd klare Flüssigkeit entstanden war. Die Zellen konnten nun ausgezählt oder in eine neue Zellkulturflasche überführen werden, um einen weiteren Zellwachstumsprozess zu durchlaufen. Die Fibroblasten wurden zum Zählen in 10 µl Zellsuspension auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben und mit einem Deckglas abgedeckt. Unter dem

Mikroskop wurde die Zellzahl durch Auszählen der vier Quadrate bestimmt. Die Zahl an Fibroblasten in der 10 µl Zellsuspension konnte durch Berechnung des arithmetischen Durchschnitts aller vier Quadrate bestimmt werden. Die exakte Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels folgender Formel:

$$\text{Zelldichte} = \text{Verdünnungskoeffizient} * \frac{\text{Zellzahl}}{4} * 10^4 * \text{ml}^{-1}$$

Anschließend erfolgte die gleichmäßige Verteilung der Fibroblasten auf eine 24-Well-Platte. Die Zellen wurden bei unzureichender Zellzahl erneut in eine Zellkulturflasche mit *Dulbecco's modified Eagle's Medium* (DMEM) überführt und unter Standardkultivierungsbedingungen im CO₂-Inkubator gelagert.

2.2.4 Kryokonservierung

Um Fibroblasten aus einer aktuellen Zelllinien auch für zukünftige Experimente nutzen zu können erfolgte die Kryokonservierung. Zur Kryokonservierung wurden die Fibroblasten in 2 ml Kryo-Röhrchen von Greiner mit 10 % DMSO und 90 % FCS gegeben. Nach der Passagierung wurden 500 000–1 000 000 Zellen in die o. g. Suspension überführt. Anschließend wurden die Röhrchen in mit Isopropanol gefüllte Gefäße gegeben, die dem vorsichtigen Einfrieren der Zellen dienen. Nach 4-stündigem Einfrieren wurden die Kryo-Röhrchen bei -80 °C in gewöhnliche Behältnisse gestellt, um diese über einen längeren Zeitraum bei -80 °C lagern zu können.

In einem 37 °C warmen Wasserbad konnten vorher kryokonservierte Fibroblasten aufgetaut werden. Die Röhrchen wurden bei teilweise flüssiger Suspension aus dem Wasserbad entfernt und anschließend bis zum vollständigen Schmelzen resuspendiert.

Modifiziertes Medium wurde hinzugegeben. Es folgte die Zentrifugation der Röhrchen (300 x g für 5 min). Anschließend wurde der Überstand des Mediums abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. Nach Resuspension des Zellpellets wurden die Zellen auf 75 cm² Zellkulturflaschen mit 30 ml DMEM gegeben und unter den oben genannten Standardbedingungen in einem CO₂-Inkubator kultiviert.

2.2.5 Zellviabilitätsmessung

Zur Bestimmung der Lebensfähigkeit (Viabilität) von Zellen erfolgte die CellTiter-Blue®-Messung. Als Indikatorfarbstoff enthält die Lösung Resazurin, der von lebenden Zellen zu Resofurin metabolisiert werden kann. Die beiden Farbstoffe unterscheiden sich anhand von verschiedenen Absorptionsmaxima. Das verwendete Spektrofluorometer (VICTOR X Multilabel Plate Reader, Perkin Elmer, 590 nm) kann somit zwischen vitalen und avitalen Zellen unterscheiden.

Zur Bestimmung der Viabilität von HDF nach einer Plasmabehandlung wurde die CellTiter-Blue®-Messung durchgeführt. Die Mischung des Farbstoffes erfolgte im Verhältnis 1:20 mit DMEM. Zunächst wurde das sich auf den Zellen (24-Well-Platten) befindliche Medium abgesaugt. Es folgte die Hinzugabe von 350 µl der CellTiter-Blue®/DMEM-Lösung. Unter Standardinkubationsbedingungen wurden die Zellen eine Stunde inkubiert. Jeweils 100 µl der Lösung aus jeder Probe wurden anschließend auf zwei 96-Well-Platten transferiert und mittels spektrofluorometrischer Messung ausgewertet. Abschließend wurden die Zellkulturen mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versorgt, um sie für weitere Untersuchungen zu verwenden.

2.2.6 Fluoreszenzmikroskopie

Auf 24-Well-Platten wurden humane dermale Fibroblasten mit einer Zelldichte von $2,5 \times 10^4$ Zellen ausgesät. Am Tag nach der Aussaat erfolgte die Behandlung der Zellen mit Plasma. Die Untersuchung der Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde am ersten sowie siebten Tag nach der Plasmabehandlung durchgeführt. Den Zellen auf den 24-Well-Platten wurden vorab 1,5 µl Hoechst (H), 1,5 µl Propidiumiodid (PI) sowie 0,5 µl Fluoresceindiacetat (FDA) zugefügt. H dient der Anfärbung aller Zellkerne, welche blau fluoreszieren. PI färbt Zellkerne rot, deren Zellmembran perforiert ist, demnach werden avitale Zellen durch PI kenntlich gemacht. FDA dient der Anfärbung vitaler Zellen, welche den Farbstoff in eine grün fluoreszierende Verbindung umwandeln. Es folgte die Inkubation unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO₂) für 3–5 min. Anschließend wurden die Farbstoffe durch 500 µl PBS ersetzt und unter Verwendung des

Fluoreszenzmikroskops (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) analysiert. Die Ergebnisse wurden mittels Zeiss AxioVision dokumentiert und mit dem Bildauswertungsprogramm ImageJ ausgewertet (Schneider et al., 2012).

2.2.7 Wasserstoffperoxid-Photometrie

Die Bestimmung der Wasserstoffperoxidkonzentration in einer Lösung erfolgte mittels Photometer mit einer Wellenlänge von 400 nm. Eine Standardlösung aus Kaliumtitanoxidoalat-Dihydrat (35,4 mg/ml) und 2 M Schwefelsäure wurde hergestellt und eine Kalibrierungskurve mit bekannten Wasserstoffperoxid-Konzentrationen (1 μ M, 10 μ M, 100 μ M und 1 mM) wurde erstellt (M.Sellers, 1990). Zur Bestimmung der Wasserstoffperoxid-Konzentrationen unter Variation der Frequenz sowie der Behandlungsdauer wurden 250 μ l PBS mit verschiedenen Einstellungen behandelt. Anschließend wurden 50 μ l der behandelten Probe zu 150 μ l PBS sowie 200 μ l der Standardlösung gegeben. Ein Indikator für die Reaktion von Kaliumtitanoxidoalat-Dihydrat und Wasserstoffperoxid ist der gelbliche Farbumschlag der Lösung. Die Absorption ist kongruent zu der Konzentration des Wasserstoffperoxids. Somit konnte mittels Photometer sowie mit Hilfe der Kalibrierungskurve die Wasserstoffperoxid-Konzentration der behandelten Proben bestimmt werden.

2.2.8 Messung des pH-Werts

Zur Bestimmung des pH-Wertes wurden jeweils 250 μ l PBS mittels DBD-Plasma behandelt. Es erfolgte die direkte Behandlung der Zellen mit jeweils 250 μ l PBS pro Well auf einer 24-Well-Platte. Die Behandlung wurde unter Variation der Frequenzen und Behandlungszeiten durchgeführt. Die Frequenzen wurden zwischen 120 Hz und 600 Hz (120, 150, 300, 600 Hz), die Behandlungszeiten zwischen 30 und 600 s (30, 60, 150, 300, 600 s) variiert. Anschließend erfolgte die Messung des pH-Wertes mittels kalibriertem pH-Meter (Climatic 766, Knick, Berlin, Deutschland) und einer pH-Elektrode (InLab Micro, Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland).

2.2.9 Reduktive Gasphasen-Chemilumineszenz

Zur Bestimmung des Nitrit-/Nitrat-Gehaltes von behandelten Proben über die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) wurden zwei NO-Analysatoren der Firma Eco Physics (CLD 88, CLD 88e) verwendet. Der Versuchsaufbau setzt sich aus zwei Rückflusskühlern vor dem NO-Analysator zusammen. Im gasförmigen Zustand werden die NO-Moleküle in den Analysator weitergeleitet. Einer der Rückflusskühler wurde mit einer Mischung aus Kaliumiodid, Jod und einer 96%igen Essigsäure gefüllt. Diese Lösung kann für die Messung von Nitrit in einer Lösung genutzt werden. Der andere Rückflusskühler wurde mit Vanadium-Chlorid, welches in 1 M Salzsäure (1 % VaCl) gelöst ist, befüllt. Diese Lösung kann für die Messung von Nitrit und Nitrat in Lösungen genutzt werden. Die Reaktionslösungen wurden in einem Wasserbad auf 65 °C (Jodlösung) und 97,7 °C (VaCl-Lösung) erhitzt. Das durch Reduktion des Nitrits/Nitrats entstehende gasförmige NO, kann mit Hilfe von einem Trägergas (Stickstoff, 100 ml/min) zur mit 1 M NaOH gefüllten Kühlfalle transportiert werden. Anschließend strömt das Gas in die Reaktionskammer des jeweiligen Analysators.

Das NO reagiert mit Ozon und es entsteht das Reaktionsprodukt Stickstoffdioxid (NO₂), das Energie in Form von Licht emittiert. Das Licht kann durch den NO-Analysator detektiert werden. Zur Bestimmung der genauen Konzentration der Proben wurde eine bekannte Menge an Nitrit und Nitrat (100 µM) mit der Gasphasen-Chemilumineszenz quantifiziert.

Den behandelten Proben wurden mittels gasdichter 10-µl-Spritze jeweils 5 µl entnommen und diese durch eine gasdichte Membran in die Reaktionslösung injiziert (siehe Abb. 11). Die Datenaufzeichnung und Datenanalyse wurden unter Verwendung der Software Origin 8 gemäß des Herstellerprotokolls durchgeführt.

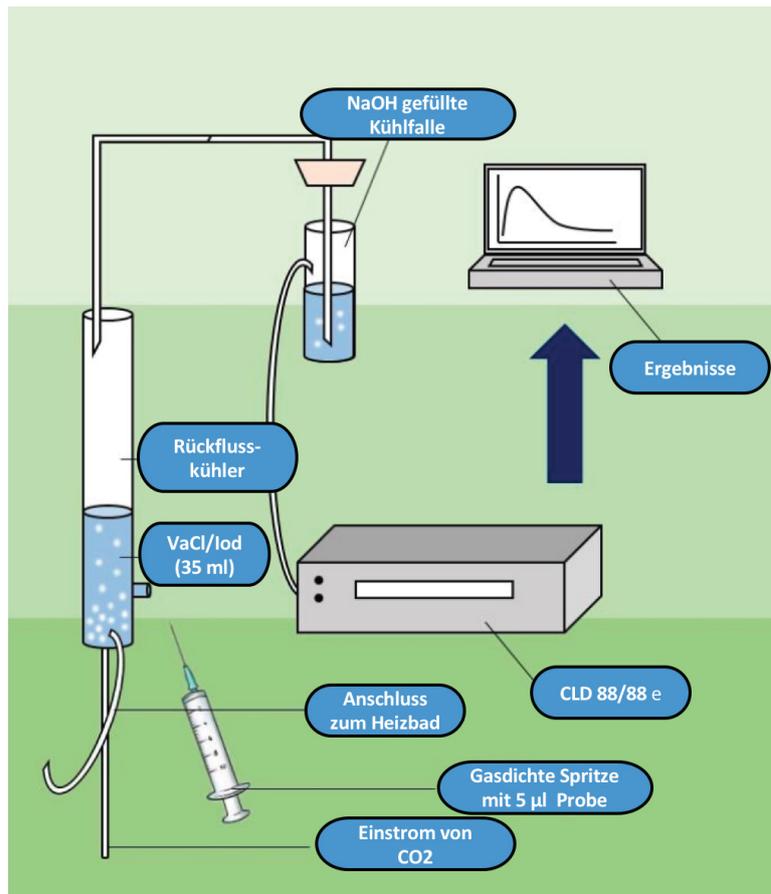


Abb. 11: Schematischer Aufbau der Gasphasen-Chemilumineszenz. Nach Injektion der Proben, fließt das Edukt, mit Hilfe von Stickstoff N_2 , durch die Rückflusskühler zur Kühlfalle. Im Folgenden strömt das Gas in die Reaktionskammer des Analysators (CLD) (eigene Darstellung in Anlehnung an (Jansen, 2021)).

2.2.10 Experimenteller Aufbau

Gewebeproben wurden im Rahmen von Straffungsoperationen in der Abteilung für Plastische, Rekonstruktive und Ästhetische Chirurgie des Klinikums Köln-Merheim entnommen und zu weiteren Forschungszwecken zur Verfügung gestellt. Es folgte, wie oben beschrieben, die Isolation von humanen dermalen Fibroblasten sowie der Zelltransfer in Zellkulturflaschen. Nach entsprechendem Wachstum erfolgte die Aussaat der Zellen auf 24-Well-Platten sowie die entsprechende Behandlung der Zellen mittels Plasma. Im weiteren Beobachtungszeitraum erfolgten wiederholte Messungen der Zellproliferation bzw. der Viabilität (siehe Abb. 12).

2.2.11 Dielektrische Barriereentladung

Die Behandlung der dermalen Fibroblasten sowie der für weitere Versuche verwendeten Lösungen erfolgte mittels dielektrischer Barriereentladung (DBD). Die DBD wurde von der Ruhr-Universität Bochum zur Verfügung gestellt.

Zur Bestimmung von physikalischen Parametern wie dem pH-Wert, der Nitrit-/Nitrat- sowie Wasserstoffperoxidkonzentration wurden jeweils 250 μl PBS direkt mit Plasma behandelt. Hierbei wurden die Behandlungszeiten zwischen 30 s und 600 s (30, 60, 150, 300, 600 s) und die verwendeten Frequenzen zwischen 120 Hz und 600 Hz (120, 150, 300, 600 Hz) variiert. Die zylinderförmige Elektrode wurde in einem Abstand von 1 mm zur Lösung positioniert, um die optimale Wirksamkeit des Plasmas zu gewährleisten (siehe Abb. 12). Die Plasmaquelle ist auf 14 kV eingestellt.

Im Rahmen der Behandlung von humanen dermalen Fibroblasten erfolgte zunächst die Aussaat von 25 000 Zellen pro Well auf 24-Well-Platten. Den Zellen wurden jeweils 500 μl DMEM zugefügt. Zwei Tage nach der Zellaussaat folgte die Behandlung mit Plasma. Vor jeder Behandlung wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen wurden mit 500 μl PBS gewaschen. Es folgte das Absaugen des PBS. Anschließend wurden 250 μl frisches PBS auf die Zellen gegeben. Danach wurden verschiedene Versuchsansätze durchgeführt.

Bei der direkten Plasmabehandlung wurden die mit 250 μl PBS pro Well bedeckten Zellen mit verschiedenen Behandlungszeiten sowie Frequenzeinstellungen behandelt. Die Behandlungsdauer wurde zwischen 30 s und 600 s (30, 60, 150, 300, 600 s), die verwendeten Frequenzen wurden zwischen 120 Hz und 600 Hz (120, 150, 300, 600 Hz) variiert.

Im Rahmen der indirekten Plasmatherapie erfolgte die Behandlung von jeweils 250 μl PBS mit 150, 300 sowie 600 Hz. Die mit Plasma behandelte Lösung wurde anschließend für 30, 300 und 600 s auf die Zellen gegeben. Nach der Behandlung wurde das PBS durch 500 μl Medium ersetzt und die Zellen wurden wieder unter Standardbedingungen in den Inkubator gestellt. Bei einem weiteren Versuchsansatz wurde die oben beschriebene indirekte Behandlung des PBS

durchgeführt. Anschließend erfolgte die Applikation von 240 µl behandeltem PBS sowie 10 µl Katalase auf die Zellen, mit den entsprechenden Behandlungszeiten.

Diese verschiedenen Einstellungen wurden im Hinblick auf die produzierten Substanzen sowie ihren Einfluss auf das Zellwachstum hin untersucht. Die weiteren Untersuchungen der Zellen, wie die Messung der Zellviabilität mittels CellTiter-Blue® erfolgten am ersten, vierten und siebten Tag nach der Behandlung.

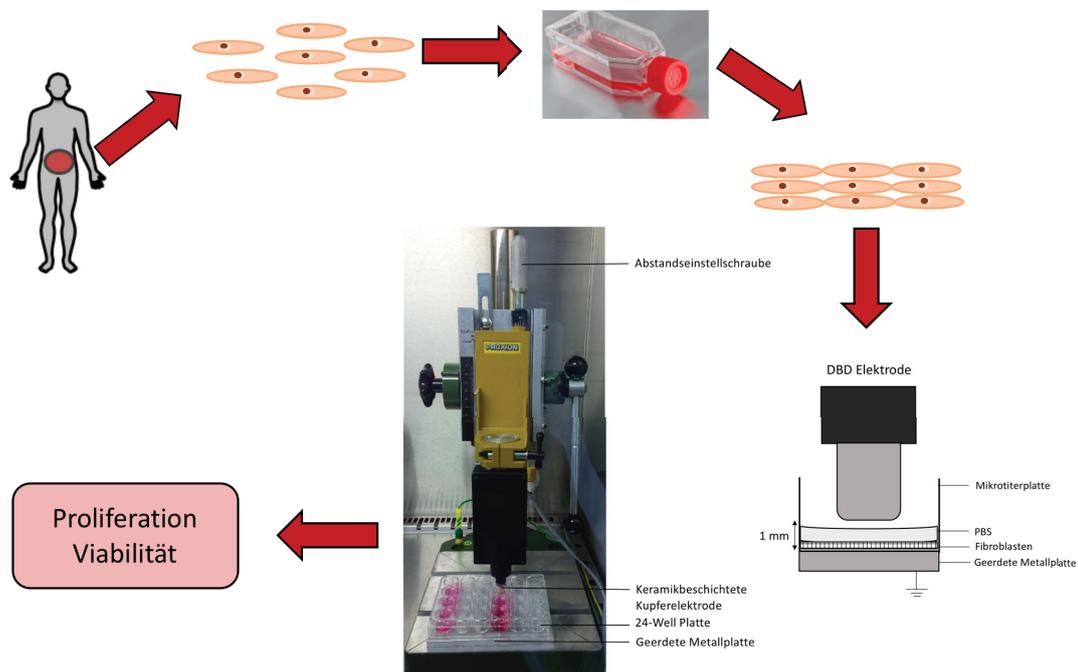


Abb. 12: Versuchsaufbau zur Behandlung von humanen Fibroblasten mittels DBD. Zunächst erfolgte die Isolation der Fibroblasten aus Gewebeprobe. Es folgte die Kultivierung und anschließend die Behandlung mittels Plasma. Bei der Darstellung der DBD, in der obenstehenden Abbildung, handelt es sich um eine eigene Fotografie. Die Behandlung von Fibroblasten erfolgte auf einer 24-Well Platte. Die Erzeugung des Plasmas zwischen der Elektrode der DBD und Gegenelektrode ist schematisch in der Abbildung dargestellt. Positionierung der Fibroblasten zwischen der geerdeten Metallplatte und der DBD Elektrode, bedeckt mit PBS (eigene Darstellung in Anlehnung an (Balzer, 2016)).

2.2.12 Statistische Analyse

Signifikante Unterschiede wurden unter Verwendung eines gepaarten zweiseitigen Student's t-Tests oder ANOVA, gefolgt von einem geeigneten Post-hoc-Mehrfachvergleichstest (Tukey-Methode) bewertet. Als signifikant wurde ein $p < 0,05$ angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Physikochemische Effekte der CAP-Behandlung

3.1.1 Einfluss des CAP auf den pH-Wert

Inhalt der physikalischen Experimente war zunächst die Untersuchung des pH-Wertes (2.2.8) unter Variation der Behandlungsdauer und -frequenz mit einer maximalen Spannung von 14 kV. Es wurden jeweils 250 μ l PBS mit Plasma behandelt. Der pH-Wert der unbehandelten Pufferlösung lag bei 7,04. Bei Behandlung mit einer Frequenz von 120 Hz für 60 s zeigte sich ein Anstieg des pH-Wertes auf 7,07 ($\pm 0,04$), nach einer zehnmütigen Plasmatherapie fiel der pH-Wert auf 6,94 ($\pm 0,05$). Im Vergleich hierzu lagen die gemessenen pH-Werte bei zehnmütiger Behandlung nach Erhöhung der Frequenz auf 300 Hz bei 6,65 ($\pm 0,24$) und 600 Hz bei 4,35 ($\pm 0,71$). Es zeigte sich, dass eine längere Plasmabehandlung zu einem verstärkten Abfall des pH-Wertes führte. Auch konnte durch eine Erhöhung der Frequenz ein stärkerer Abfall des pH-Wertes induziert werden (siehe Abb. 13).

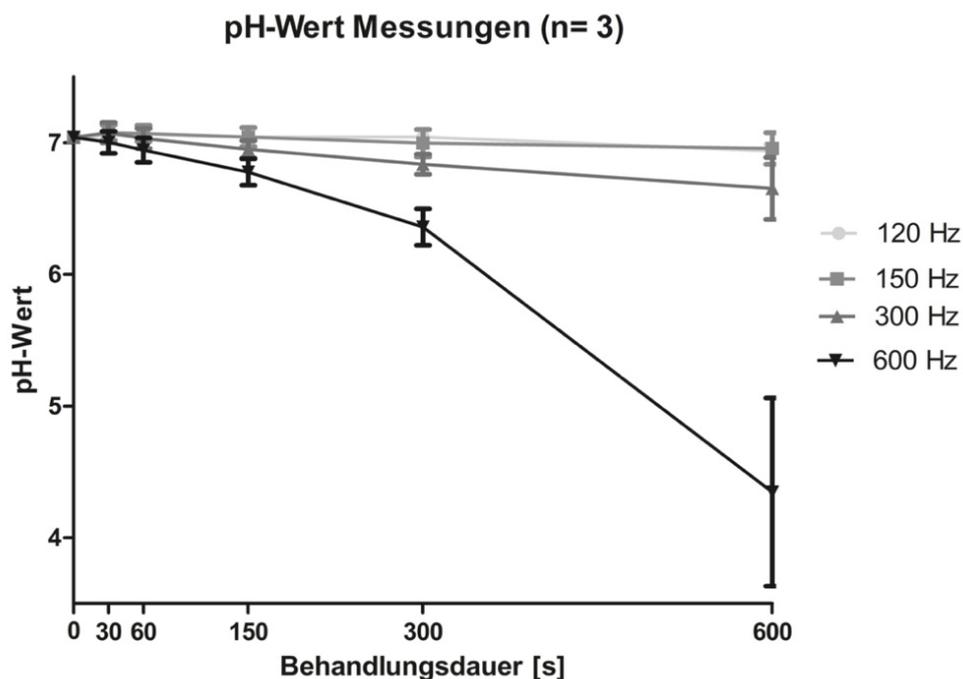


Abb. 13: Einfluss von CAP auf den pH-Wert. Messung des pH-Wertes mittels pH-Meter, von mit Plasma behandeltem PBS, unter Variation der Frequenz zwischen 120 und 600 Hz, in Korrelation zur Behandlungsdauer in Sekunden (n = 3).

3.1.2 Akkumulation von Nitrit und Nitrat

Zur Bestimmung der Nitrit- und Nitratkonzentration nach Behandlung von PBS mittels DBD wurde die Gasphasen-Chemilumineszenz (2.2.9) genutzt. Es erfolgte die Behandlung von jeweils 250 μl PBS mit Plasma. Hierbei wurden die Behandlungsfrequenzen zwischen 120 Hz und 600 Hz variiert. Die Behandlungsdauern lagen zwischen 30 und 600 s.

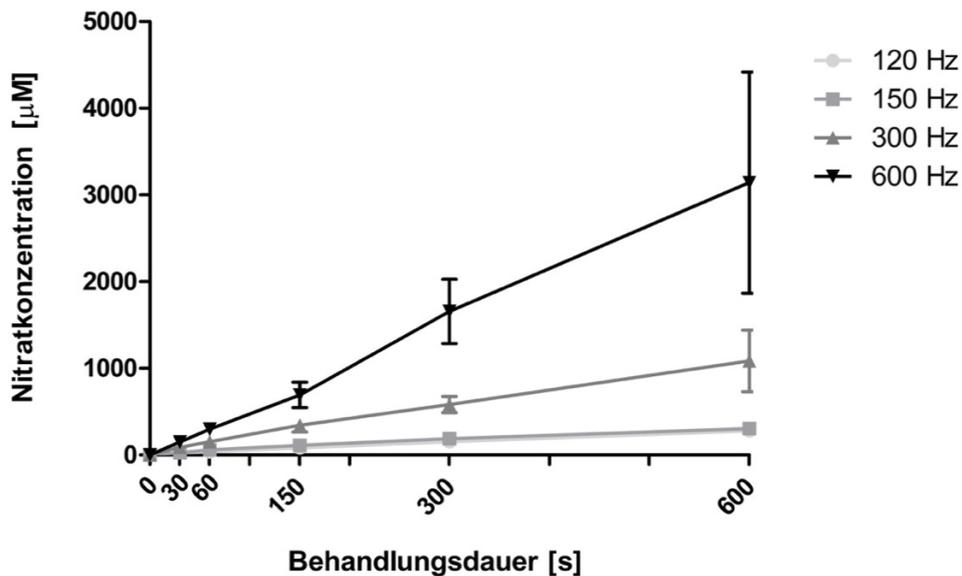


Abb. 14: Akkumulation von Nitrat. Entstehung von Nitrat nach der CAP-Behandlung unter Variation der Frequenz zwischen 120 und 600 Hz. Die Messung der Nitratkonzentration erfolgte mittels CLD in μM , in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer in Sekunden ($n = 3$).

In Abhängigkeit von der Behandlungsdauer zeigte sich für die Behandlungsfrequenzen von 120 bis 300 Hz ein linearer Kurvenverlauf der Nitratkonzentration. Bei einer 600-sekündigen Behandlung mittels CAP mit 120 Hz lag die Nitratkonzentration bei $279 \pm 22 \mu\text{M}$. Im Vergleich hierzu stieg die Konzentration bei gleicher Behandlungsdauer unter Erhöhung der Behandlungsfrequenz auf 300 Hz auf $1086 \pm 355 \mu\text{M}$. Die Nitratkonzentration der mit 600 Hz behandelten Pufferlösung zeigte bis zu einer Behandlungsdauer von 300 s ebenfalls einen nahezu linearen Anstieg. Nach einer 300-sekündigen Plasmabehandlung mit 600 Hz lag die Konzentration im Mittel bei $1656 \pm 372 \mu\text{M}$. Eine Konzentration von $3142 \pm 1275 \mu\text{M}$ wurde nach einer 600-sekündigen CAP-

Behandlung gemessen. Es präsentierte sich somit ein deutlicher Anstieg der gemessenen Nitratkonzentration bei Verlängerung der Behandlungsdauer von 5 auf 10 min mit einer Frequenz von 600 Hz. Insgesamt zeigte sich mit der Erhöhung von Behandlungsdauer und -frequenz ein linearer Anstieg der Nitratkonzentration (siehe Abb. 14).

In Abbildung 15 zeigt sich bei allen gewählten Behandlungszeiten ab einer Behandlungsfrequenz von 150 Hz bis zu einer Frequenz von 600 Hz ein nahezu linearer Anstieg der Nitratkonzentration. Bei Erhöhung der Behandlungsfrequenz von 300 auf 600 Hz und einer Behandlungsdauer von 600 s verdreifachte sich die Nitratkonzentration.

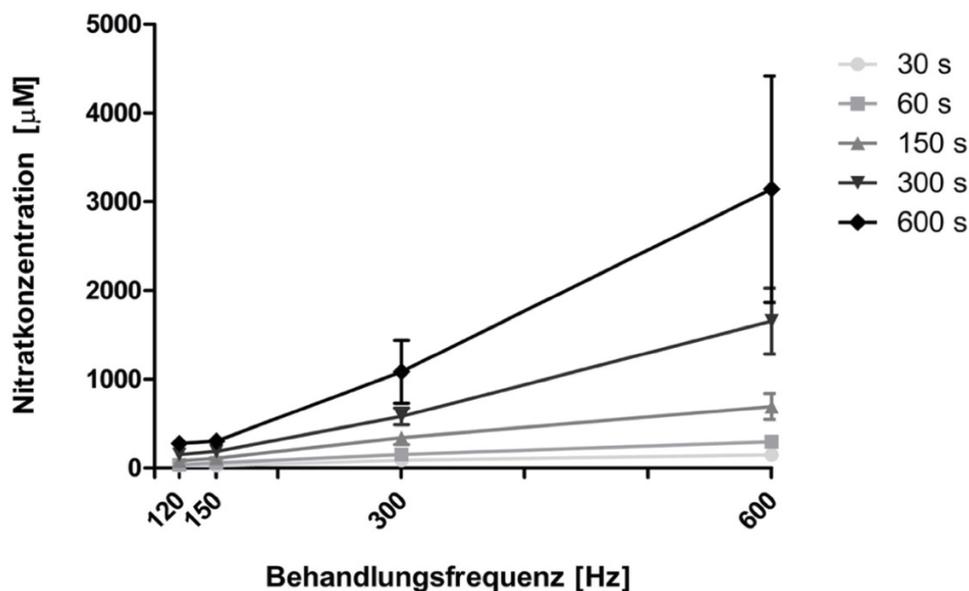


Abb. 15: Akkumulation von Nitrat. Entstehung von Nitrat nach CAP-Behandlung unter Variation der Behandlungsdauer zwischen 30 und 600 s. Die Messung der Nitratkonzentration erfolgte mittels CLD (n = 3).

Nach Behandlung von PBS mit Plasma zeigte sich im Vergleich zur Nitratentstehung eine geringere Nitritproduktion. Die höchste gemessene Nitratkonzentration lag bei $3142 \pm 1275 \mu\text{M}$ (600 Hz, 600 s), die maximale Nitritkonzentration bei $495 \pm 191 \mu\text{M}$ (600 Hz, 300 s). Bis zu einer 300-sekündigen Behandlung mit einer Frequenz von 150 Hz präsentiert sich ein annähernd linearer Anstieg der Nitritkonzentration. Bei Betrachtung der Nitritkonzentration nach einer Behandlung der Proben mit 300 Hz, zeigte sich initial ein deutlich stärkerer Anstieg der gemessenen Nitritkonzentration, der mit steigender Behandlungsdauer

abflacht. Die gemessene Nitritkonzentration nach einer 300-sekündigen Behandlung mit 300 Hz beträgt $263 \pm 108 \mu\text{M}$, nach einer 600-sekündigen Behandlung liegt diese bei $261 \pm 108 \mu\text{M}$. Demnach zeigte sich nach einer Behandlung mit CAP für 5 min mit 300 Hz eine höhere Nitritkonzentration als nach einer zehnmütigen Behandlung. Die höchste Nitritkonzentration von $495 \pm 191 \mu\text{M}$ wurde nach einer 300-sekündigen Plasmabehandlung mit 600 Hz gemessen. Die Verlängerung der Behandlungsdauer auf 10 min bei einer Frequenz von 600 Hz führte zu einer deutlich geringeren Nitritentstehung von im Mittel $304 \pm 243 \mu\text{M}$ (siehe Abb. 16). Wie oben beschrieben, stieg die Nitratkonzentration unter diesen Einstellungen deutlich an.

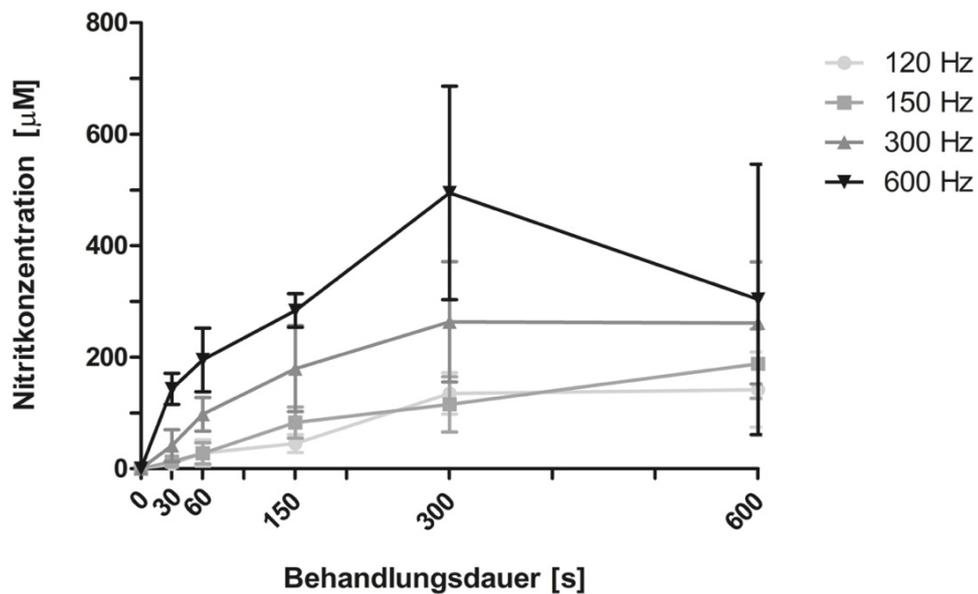


Abb. 16: Akkumulation von Nitrit. Entstehung von Nitrit nach Behandlung mittels DBD unter Variation der Frequenz zwischen 120 und 600 Hz. Die Messung der Nitritkonzentration erfolgte mittels CLD ($n = 3$).

3.1.3 Einfluss der Plasmaparameter auf die Wasserstoffperoxid-Akkumulation

Die Messung der Konzentration des entstehenden Wasserstoffperoxids (H_2O_2) erfolgte mittels Wasserstoffperoxid-Photometrie. Wie Abbildung 17 zu entnehmen ist, steigt die H_2O_2 -Konzentration in Korrelation mit der Behandlungsdauer und Behandlungsfrequenz an. Bei den mit 120, 150 und 300 Hz behandelten Proben zeigte sich ein linearer Anstieg der H_2O_2 -Konzentration in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer. Nach einer zehnminütigen Behandlung der Pufferlösung mit 150 Hz ließ sich eine Konzentration von im Mittel $189 \pm 4 \mu\text{M}$ nachweisen. Bei Erhöhung der Behandlungsfrequenz auf 300 Hz betrug die nach 300 s gemessene H_2O_2 Konzentration $340 \pm 12 \mu\text{M}$. In Betrachtung der mit 600 Hz behandelten Versuchsreihe zeigte sich ein deutlicherer Anstieg der gemessenen H_2O_2 -Konzentration ab einer Behandlungsdauer von 150 s. Nach einer 150-sekündigen Behandlung mit CAP lag die H_2O_2 -Konzentration im Mittel bei $143 \pm 17 \mu\text{M}$, nach 600 s bereits bei $813 \pm 14 \mu\text{M}$.

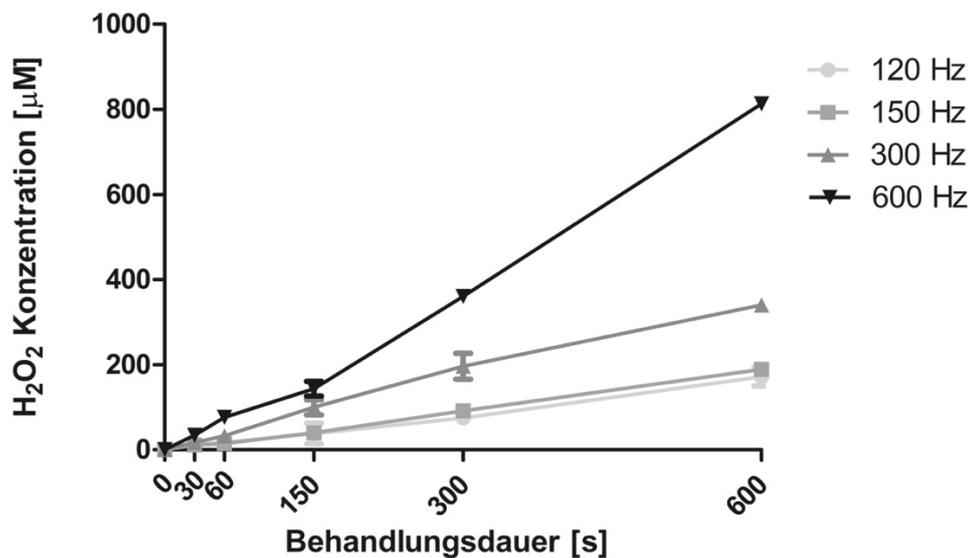


Abb. 17: Akkumulation von H_2O_2 . Entstehung von Wasserstoffperoxid nach CAP-Behandlung unter Variation der Frequenz zwischen 120 und 600 Hz. Messung der H_2O_2 -Konzentration mittels Photometrie ($n = 3$).

Wie in Abbildung 18 zu erkennen ist, lässt sich bei einer konstanten Behandlungsdauer von 600 s in Abhängigkeit von den Frequenzen eine mehr als verdoppelte H_2O_2 -Konzentration bei Verdopplung der Behandlungsfrequenz von 300 auf 600 Hz nachweisen.

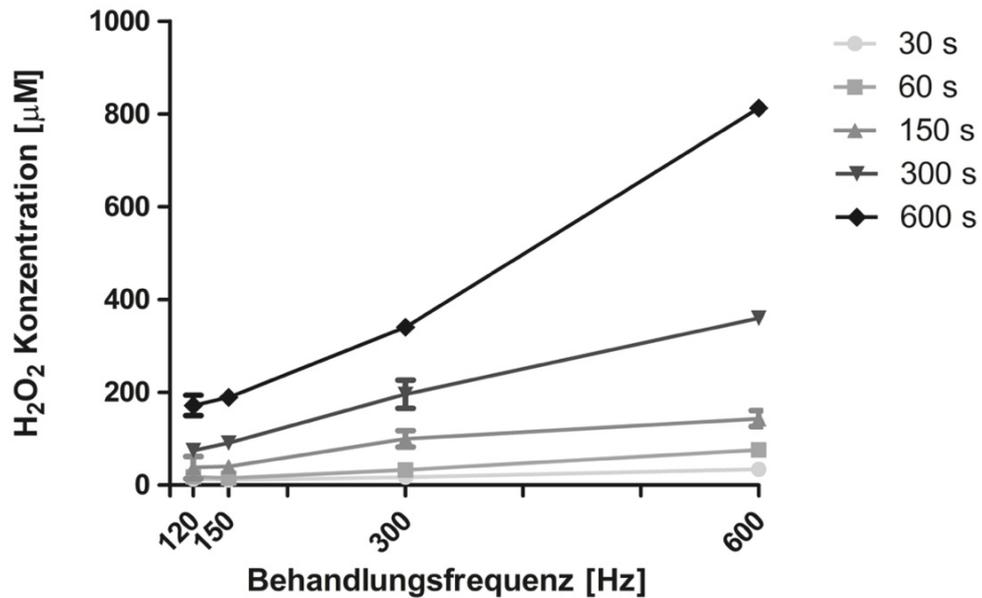


Abb. 18: Akkumulation von H_2O_2 . Entstehung von Wasserstoffperoxid nach CAP-Behandlung unter Variation der Behandlungsdauer zwischen 30 und 600 s. Messung der H_2O_2 -Konzentration mittels Photometrie ($n = 3$).

3.2 Proliferation von humanen dermalen Fibroblasten (HDF)

3.2.1 Viabilität von HDF nach direkter Plasmabehandlung

Im Anschluss an die Durchführung der chemischen Versuchsansätze erfolgte die Untersuchung der Effekte des CAP auf humane dermale Fibroblasten (HDF). Die Wirkung der Plasmabehandlung auf die Zellen wurde ebenfalls unter Variation der Frequenz zwischen 120 und 600 Hz sowie der Behandlungsdauer zwischen 30 und 600 s durchgeführt. Die humanen dermalen Fibroblasten wurden unter den oben genannten entsprechenden Vorgaben mit Plasma behandelt. Die Messung der Zellviabilität mittels Resazurin-basiertem Assay (2.2.5) erfolgte an Tag 1, 4 und 7 nach der Plasmabehandlung.

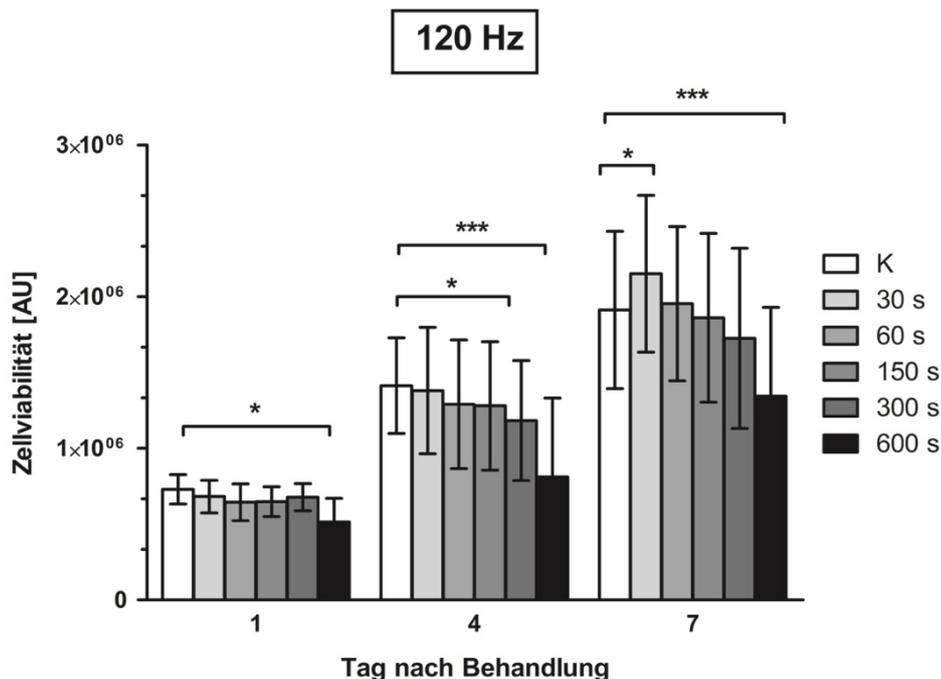


Abb. 19: Proliferation humaner dermalen Fibroblasten nach Plasmabehandlung (120 Hz). Einfluss des Plasmas auf die Zellviabilität unter Variation der Behandlungsdauer (0–600 s), bei einer konstanten Behandlungsfrequenz von 120 Hz. Messung der Viabilität mittels Resazurin-basiertem Assay an Tag 1, 4 und 7 nach der Behandlung (n = 8; p > 0,05; * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001).

Eine zehnmütige Plasmabehandlung der Zellen mit einer Behandlungsfrequenz von 120 Hz führte zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle an Tag 1, 4 und 7. Auf der anderen Seite zeigte sich an

Tag 7 nach der CAP-Behandlung eine signifikant höhere Zellviabilität der HDF, welche für 30 s mit 120 Hz behandelt wurden (siehe Abb. 19).

Die zuvor bereits beschriebenen Effekte ließen sich ebenfalls bei der Behandlung humaner dermaler Fibroblasten mit einer Frequenz von 150 Hz beobachten. Auch hier zeigte sich über den gesamten Beobachtungszeitraum eine signifikant niedrigere Zellviabilität nach einer zehnmütigen Behandlung mit CAP. Die Anzahl vitaler Zellen war an Tag 7 nach einer 30-sekündigen Behandlung ebenfalls signifikant erhöht, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle (siehe Abb. 20).

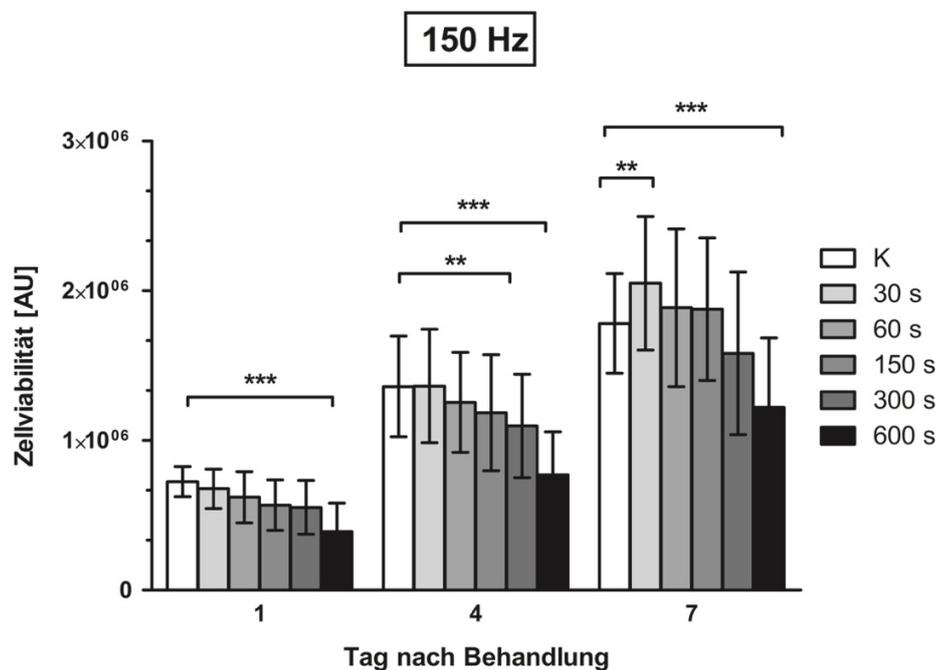


Abb. 20: Proliferation humaner dermaler Fibroblasten nach Plasmabehandlung (150 Hz). Einfluss des Plasmas auf die Zellviabilität unter Variation der Behandlungsdauer (0–600 s), bei einer konstanten Behandlungsfrequenz von 150 Hz. Messung der Viabilität mittels Resazurin-basiertem Assay an Tag 1, 4 und 7 nach der Behandlung (n = 8; p > 0,05; * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001).

In Abbildung 21 ist die Behandlung der HDF mit einer Frequenz von 300 Hz unter Variation der Behandlungszeit dargestellt. Es konnte keine signifikant erhöhte Zellviabilität nach einer 30-sekündigen Behandlung der HDF an Tag 7 nachgewiesen werden. Bei Behandlung der Zellen mit 300 Hz zeigte sich über den gesamten Beobachtungszeitraum eine signifikante Reduktion der Zellviabilität der HDF, die initial für 5 und 10 min mit CAP behandelt wurden. An Tag 4 zeigte sich bereits nach einer 60-sekündigen Plasmabehandlung eine signifikant geringere Lebensfähigkeit der Zellen. Sieben Tage nach der Behandlung mit CAP präsentierte sich die Zellviabilität der mit 150–600 s behandelten Proben als signifikant geringer, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle.

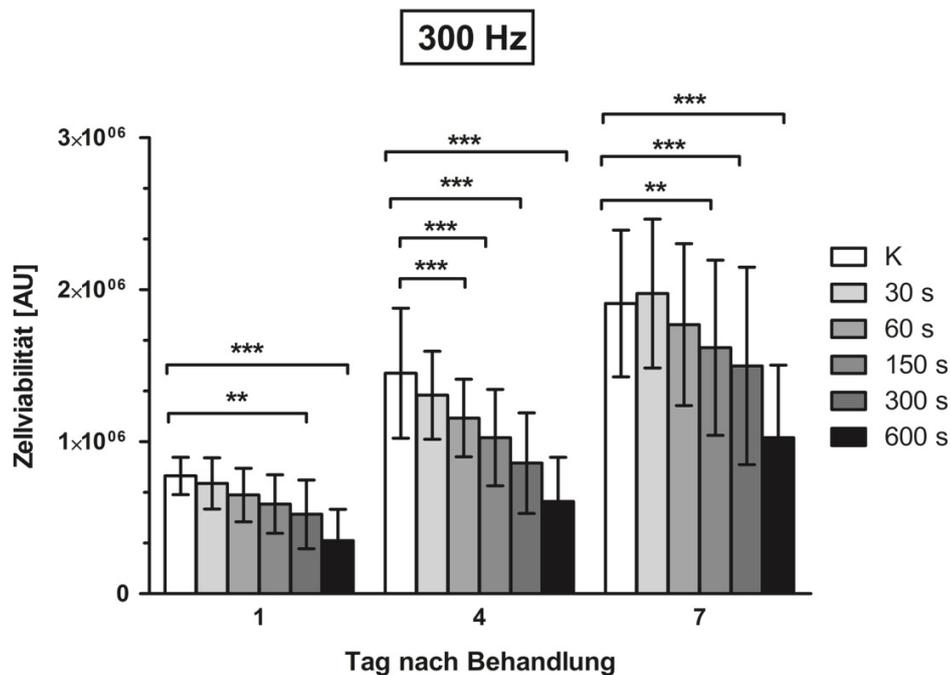


Abb. 21: Proliferation humaner dermaler Fibroblasten nach Plasmabehandlung (300 Hz). Einfluss des Plasmas auf die Zellviabilität unter Variation der Behandlungsdauer (0–600 s), bei einer konstanten Behandlungsfrequenz von 300 Hz. Messung der Viabilität mittels Resazurin-basiertem Assay an Tag 1, 4 und 7 nach der Behandlung (n = 8; p > 0,05; * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001).

Ein signifikanter Effekt auf die Zellviabilität ließ sich bei der Behandlung von humanen dermalen Fibroblasten mit einer Frequenz von 600 Hz beobachten. Hier zeigten sich an Tag 4 und 7 signifikant niedrigere Zahlen vitaler Zellen verglichen mit der Kontrolle. Dies gilt für Proben, die für 60–600 s mit CAP behandelt wurden. Einen Tag nach der Plasmatherapie zeigte sich lediglich eine geringere Zellviabilität für Zellen, die über einen Zeitraum von 300–600 s mit 600 Hz behandelt wurden (siehe Abb. 22).

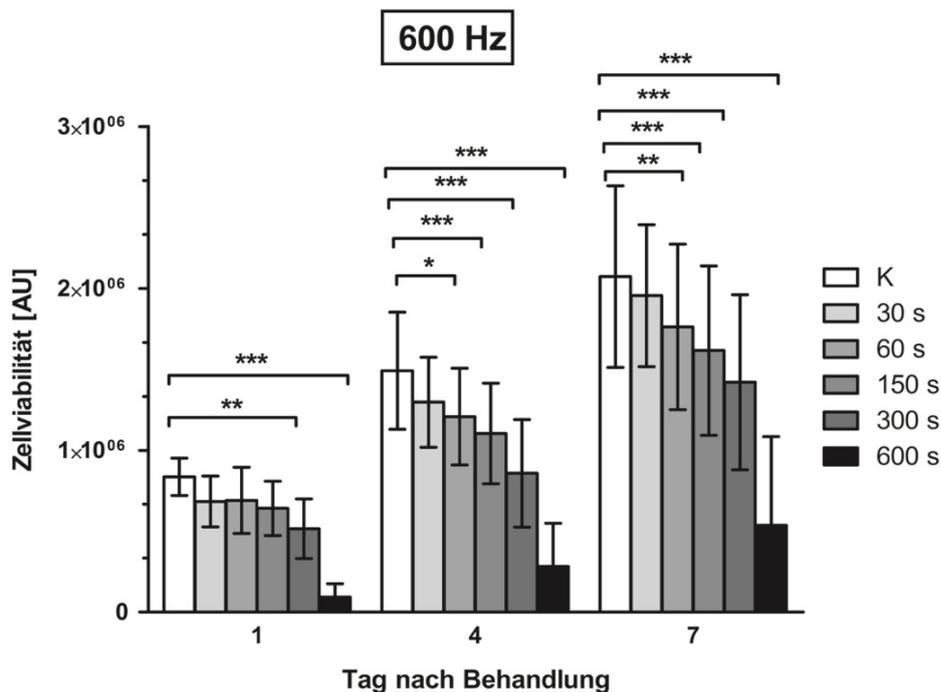


Abb. 22: Proliferation humaner dermalen Fibroblasten nach Plasmabehandlung (600 Hz). Einfluss des Plasmas auf die Zellviabilität unter Variation der Behandlungsdauer (0–600 s), bei einer konstanten Behandlungsfrequenz von 600 Hz. Messung der Viabilität mittels Resazurin-basiertem Assay an Tag 1, 4 und 7 nach der Behandlung (n = 8; p > 0,05; * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001).

In Abbildung 23 ist die Proliferation der humanen dermalen Fibroblasten nach einer 30-sekündigen Behandlung mit CAP unter Variation der Behandlungsfrequenz dargestellt. Das Proliferationspotenzial der mit 120 Hz behandelten Zellen überstieg im weiteren Behandlungszeitraum das der Kontrolle. An Tag 7 nach der Behandlung mit CAP war die Zellzahl verglichen mit der unbehandelten Kontrolle signifikant höher. Die Steigung der Zellviabilität der mit 120 Hz behandelten Zellen war von Tag 4 auf Tag 7 größer als die der Kontrolle. Somit zeigen die humanen dermalen Fibroblasten, die für 30 s mit 120 Hz behandelt wurden, insgesamt das größte Proliferationspotenzial.

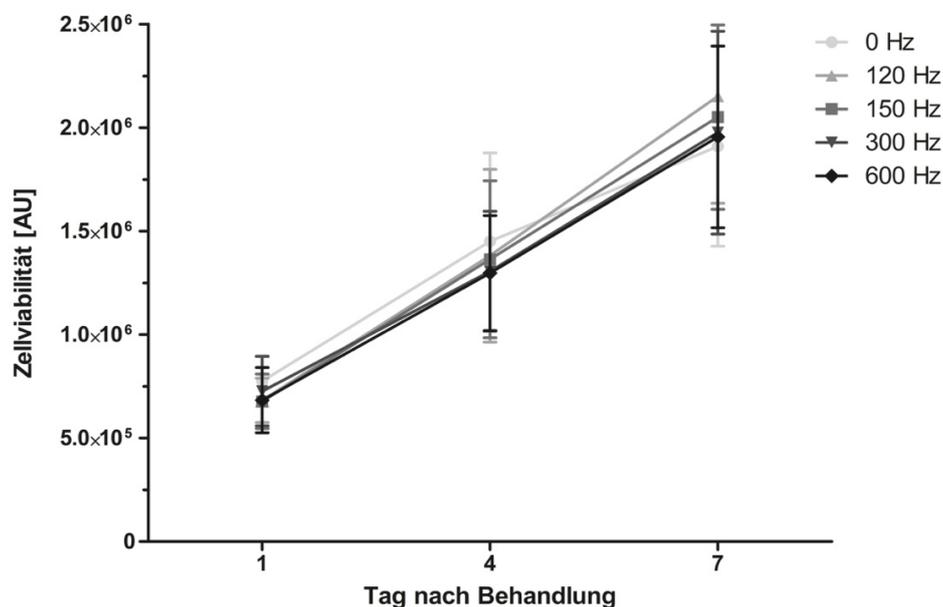


Abb. 23: Proliferation humaner dermalen Fibroblasten nach Plasmabehandlung. Einfluss des Plasmas auf die Zellviabilität unter Variation der Behandlungsfrequenz (120–600 Hz) bei einer konstanten Behandlungsdauer von 30 s. Messung der Viabilität mittels Resazurin-basiertem Assay an Tag 1, 4 und 7 nach der Behandlung (n = 8).

Die Verlängerung der Behandlungsdauer auf 60 s führte zunächst zu einer Verringerung des Anteils vitaler Zellen. Auch die Zellproliferation war bis zum vierten Tag nach der Behandlung geringer als die der Kontrolle. Es zeigte sich beim Vergleich des Proliferationspotenzials von Tag 1 auf Tag 4, dass jenes der behandelten HDF im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle geringer war. An Tag 7 zeigte sich jedoch, dass das Zellviabilitätssignal der mit CAP-behandelten Zellen höher war als jenes der unbehandelten Kontrolle.

Nach der initialen Reduzierung des Proliferationspotenzial der behandelten Zellen stieg dieses im Intervall von Tag 4 auf Tag 7 an. Dieser Effekt ließ sich für alle untersuchten Behandlungsfrequenzen darstellen. Auch nach einer 60-sekündigen Plasmatherapie war die Proliferationsrate der humanen dermalen Fibroblasten, die mit 120 Hz behandelt wurden, am größten (siehe Abb. 24).

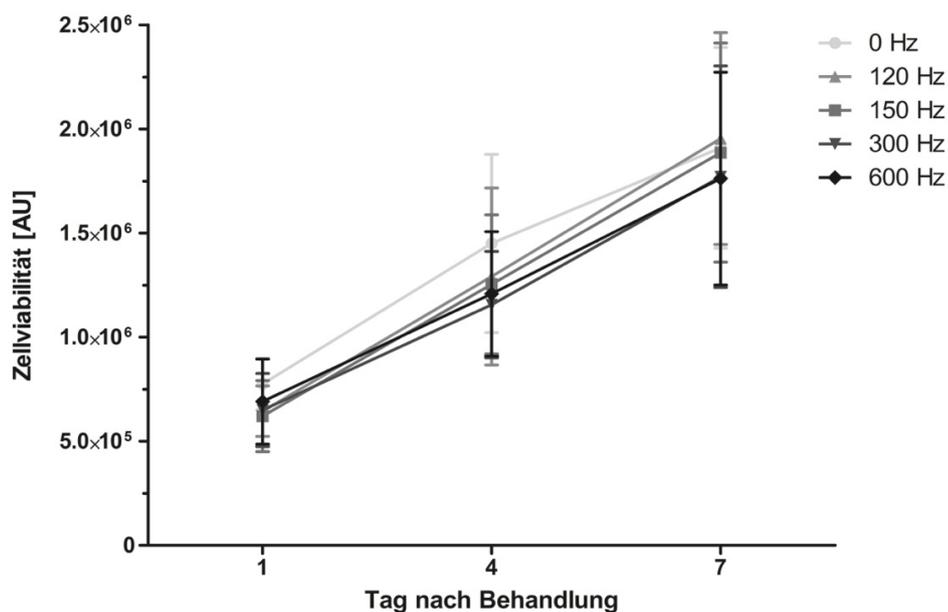


Abb. 24: Proliferation humaner dermalen Fibroblasten nach Plasmabehandlung. Einfluss des Plasmas auf die Zellviabilität unter Variation der Behandlungsfrequenz (120–600 Hz) bei einer konstanten Behandlungsdauer von 60 s. Messung der Viabilität mittels Resazurin-basiertem Assay an Tag 1, 4 und 7 nach der Behandlung (n = 8).

Wie bereits zuvor beschrieben, ist die Zellviabilität von humanen dermalen Fibroblasten, die für 150 s mit 300 Hz oder 600 Hz mit Plasma behandelt wurden, an Tag 4 und Tag 7 nach der Plasmatherapie signifikant reduziert (siehe Abb. 21 und 22). Wie in Abbildung 25 zu erkennen ist, zeigte sich, dass auch die Proliferationsfähigkeit der Zellen, die mit 300 und 600 Hz behandelt wurden, initial geringer war als die der Kontrolle.

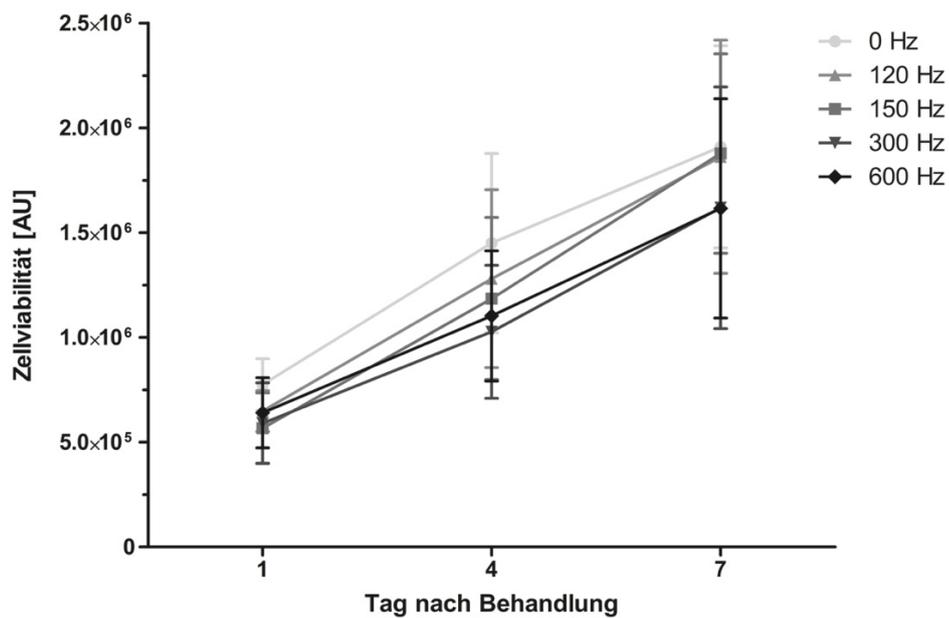


Abb. 25 Proliferation humaner dermalen Fibroblasten nach Plasmabehandlung. Einfluss des Plasmas auf die Zellviabilität unter Variation Behandlungsfrequenzen (120–600 Hz) bei einer konstanten Behandlungsdauer von 150 s. Messung der Viabilität mittels Resazurin-basiertem Assay an Tag 1, 4 und 7 nach der Behandlung (n=8).

Wurden die HDF für 300 s mit Plasma behandelt, zeigte sich eine Reduktion der Zellviabilität. Für die Behandlungsfrequenzen von 300 Hz (siehe Abb. 21) und 600 Hz (siehe Abb. 22) war dieser Effekt über den gesamten Beobachtungszeitraum signifikant. Am Tag 4 nach der Plasmatherapie ließ sich eine signifikant geringere Zellzahl auch nach Behandlungen mit 120 Hz (siehe Abb. 19) und 150 Hz (siehe Abb. 20) nachweisen. Wurde die Zellviabilität der behandelten und unbehandelten Proben an Tag 1 und Tag 4 verglichen, präsentierte sich ein niedrigeres Proliferationspotenzial der mit Plasma behandelten Zellen. Die weiteren Messungen belegten hingegen, dass das Zellwachstum der behandelten humanen dermalen Fibroblasten im weiteren Beobachtungsintervall wieder deutlich zunahm. Zellen, die mit 300 Hz über 300 s behandelt wurden, zeigten von Tag 4 auf Tag 7 die größte Wachstumsrate (siehe Abb. 26).

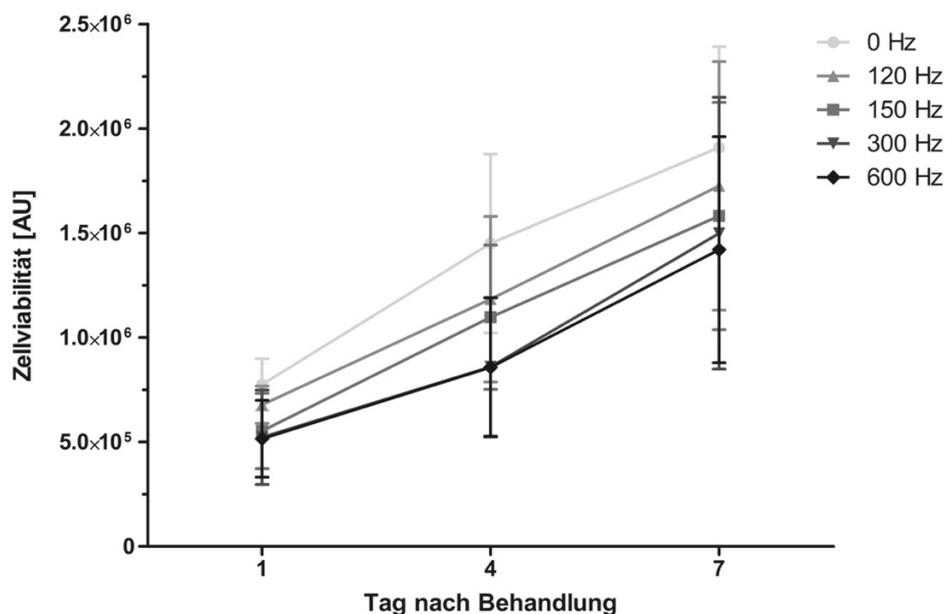


Abb. 26: Proliferation humaner dermaler Fibroblasten nach Plasmabehandlung. Einfluss des Plasmas auf die Zellviabilität unter Variation der Behandlungsfrequenz (120–600 Hz) bei einer konstanten Behandlungsdauer von 300 s. Messung der Viabilität mittels Resazurin-basiertem Assay an Tag 1, 4 und 7 nach der Behandlung (n = 8).

Die Zellzahl wurde durch eine Plasmabehandlung über 600 s signifikant reduziert (siehe Abb. 27). Dies traf auf die untersuchten Frequenzen von 120 bis 600 Hz über das gesamte Untersuchungsintervall zu (siehe Abb. 19–22). Im Hinblick auf die Fähigkeit zur Proliferation konnte festgestellt werden, wie in Abbildung 26 zu erkennen ist, dass behandelte Proben von Tag 1 auf Tag 4 im Vergleich zu solchen, die nicht mit Plasma behandelt wurden, ein niedrigeres Wachstumspotenzial aufwiesen. Im Intervall von Tag 4 auf Tag 7 zeigte sich für alle verwendeten Behandlungsfrequenzen ein Anstieg der Proliferationsrate der behandelten humanen dermalen Fibroblasten.

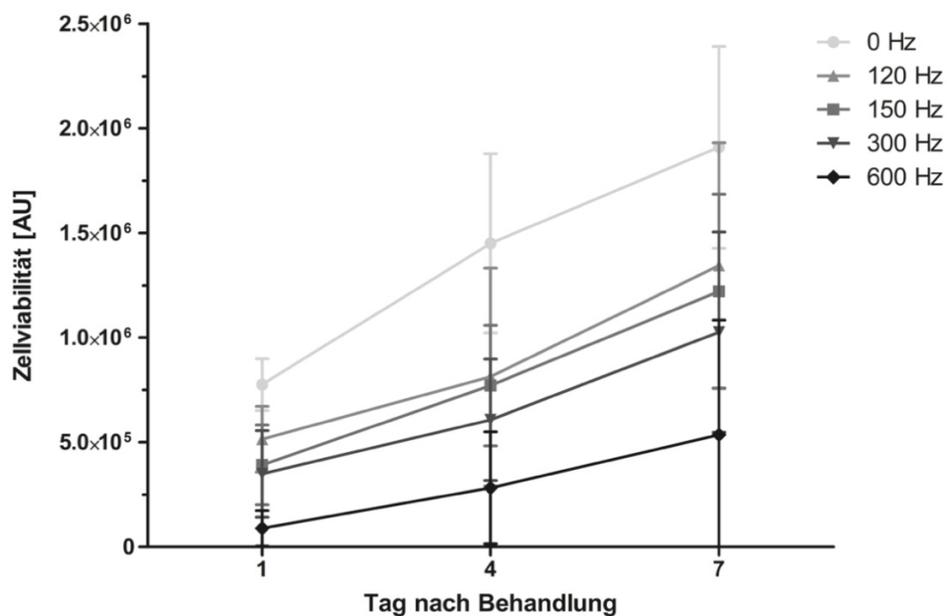


Abb. 27: Proliferation humaner dermalen Fibroblasten nach Plasmabehandlung. Einfluss des Plasmas auf die Zellviabilität unter Variation der Behandlungsfrequenz (120–600 Hz) bei einer konstanten Behandlungsdauer von 600 s. Messung der Viabilität mittels Resazurin-basiertem Assay an Tag 1, 4 und 7 nach der Behandlung (n = 8).

In Abbildung 28 ist die Zellviabilität an Tag 1 nach der Behandlung in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer unter Variation der Behandlungsfrequenz dargestellt. Für Zellen, die mit einer Frequenz von 120 Hz sowie 150 Hz mit Plasma behandelt wurden, zeigte sich bezogen auf die Zellviabilität zwischen einer Behandlungsdauer von 60 s und 300 s ein Plateau. In diesem Intervall war die Zellzahl an Tag 1 nach der Behandlung trotz Erhöhung der Behandlungsdauer annähernd konstant.

Bei einer Behandlungsfrequenz von 120 Hz und einer Erhöhung der Behandlungsdauer von 60 auf 300 s präsentierte sich sogar ein Anstieg der Zellviabilität. Nach 60 s lag das Signal der Zellviabilität im Mittel bei $644\,865 \pm 120\,970$ AU und nach 300 s bei $677\,902 \pm 8904$ AU.

Ein deutlicher Abfall der Zellviabilität zeigte sich für alle gewählten Behandlungsfrequenzen bei Erhöhung der Behandlungsdauer von 5 auf 10 min. Der Kurvenverlauf von mit 120–300 Hz behandelten HDF ist hierbei annähernd parallel. Das Gefälle bei den mit 600 Hz behandelten Zellen ist deutlich steiler.

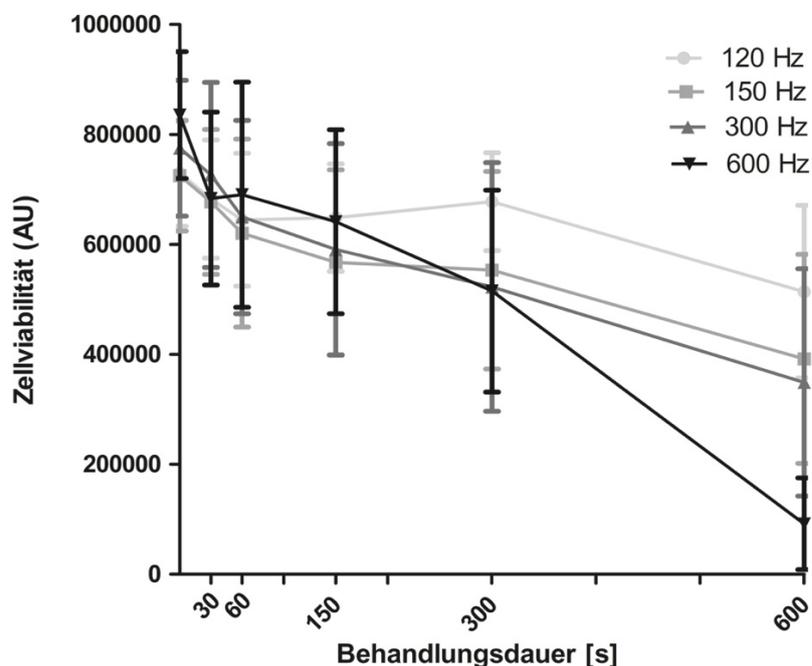


Abb. 28: Proliferation humaner dermaler Fibroblasten am ersten Tag nach Plasmabehandlung. Einfluss des Plasmas auf die Zellviabilität unter Variation der Behandlungsfrequenz (120–600 Hz). Messung der Viabilität mittels Resazurin-basiertem Assay an Tag 1 nach der Behandlung in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer in Sekunden (n = 8).

3.2.2 Effekte der direkten und indirekten CAP-Behandlung auf die Viabilität von HDF

Zur weiteren Beurteilung der Effekte des durch die DBD erzeugten Plasmas erfolgte die Untersuchung der indirekten Behandlung von HDF. Die indirekte Wirkung des Plasmas auf die Zellen wurde unter Variation der Frequenz zwischen 150 Hz und 600 Hz sowie der Behandlungsdauer zwischen 30 s und 600 s durchgeführt. Weiterhin wurde der Effekt von Katalase, die H_2O_2 abbaut, auf die Viabilität von HDF hin untersucht. Hierbei erfolgte zunächst die Behandlung von PBS mit CAP, anschließend wurde das behandelte PBS zusammen mit der Katalase auf die Zellen gegeben. Die humanen dermalen Fibroblasten wurden unter den entsprechenden Vorgaben mit CAP behandelt. Die Messungen der Zellviabilität mittels Resazurin-basiertem Assay erfolgte an Tag 1, 4 und 7 nach der Plasmatherapie.

Wie in Abbildung 29 zu erkennen ist, lässt sich am Tag 4 nach der Behandlung eine signifikant erniedrigte Viabilität der Zellen feststellen, die direkt und indirekt mit Plasma behandelt wurden.

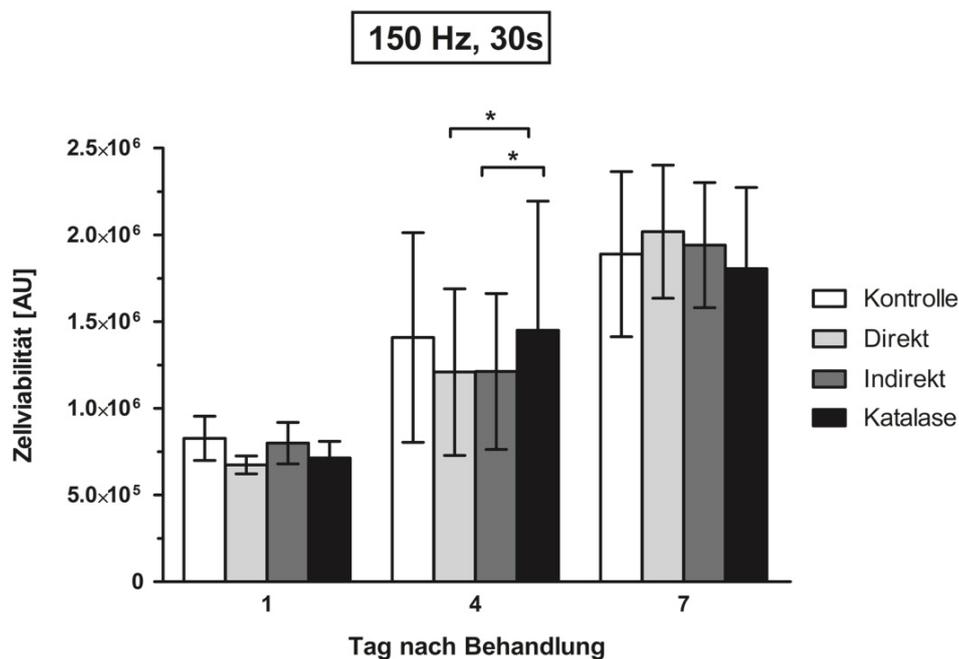


Abb. 29: Proliferation humaner dermaler Fibroblasten nach direkter und indirekter CAP-Behandlung. Einfluss des CAP auf die Zellviabilität unter Variation der Art der Behandlung mit einer konstanten Behandlungsfrequenz von 150 Hz und einer Behandlungsdauer von 30 s sowie einer Zugabe von Katalase nach CAP-Behandlung. Die Viabilität der Zellen wurde an Tag 1, 4 und 7 nach der Plasmabehandlung gemessen. Messung der Viabilität mittels Resazurin-basiertem Assay an Tag 1, 4 und 7 nach der Behandlung (n = 6; p > 0,05; * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001).

In Anwesenheit von Katalase, die im Rahmen der indirekten Behandlung zugefügt wurde, konnte kein signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle festgestellt werden. An Tag 7 nach der Plasmatherapie war die Zellviabilität der direkt und indirekt behandelten Zellen verglichen mit der Kontrolle sowie der indirekten Plasmabehandlung mit Katalase etwas höher. Dies war statistisch jedoch nicht signifikant.

Im Hinblick auf die Proliferation der Zellen (siehe Abb. 30) zeigte sich initial ein höheres Wachstumspotenzial der Fibroblasten, die unter Zugabe von Katalase indirekt mit Plasma behandelt wurden. Das Proliferationspotenzial dieser Proben flachte jedoch im weiteren Verlauf deutlich ab. In dem Beobachtungszeitraum präsentierte sich hingegen ein deutlicher Anstieg des Wachstumspotenzials der direkt und indirekt behandelten Zellen, welches das der Kontrolle übertraf.

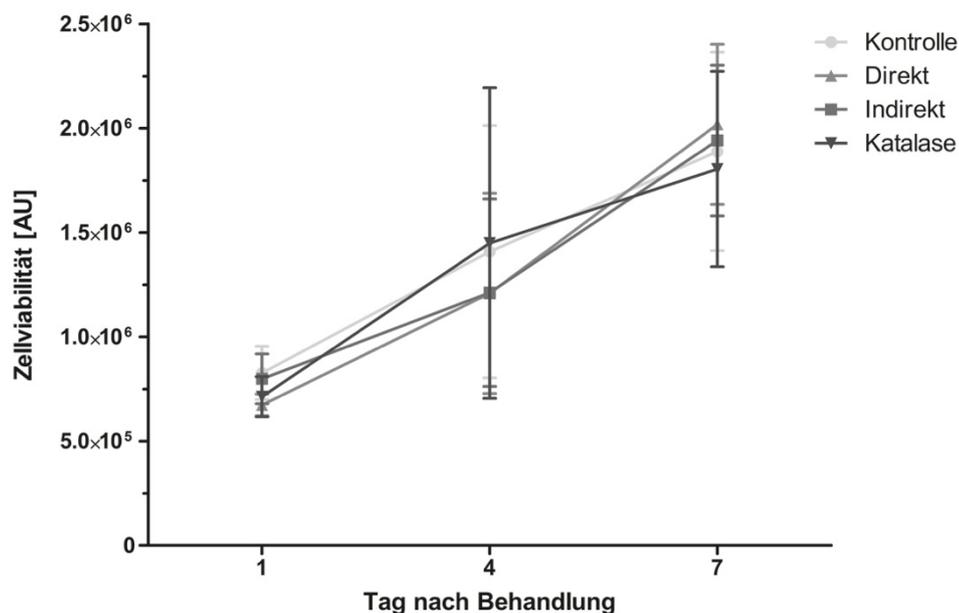


Abb. 30: Proliferationspotenzial humaner dermaler Fibroblasten nach direkter CAP-Behandlung sowie indirekter Behandlung mit und ohne Hinzugabe von Katalase. Einfluss des CAP auf die Zellviabilität unter Variation der Art der Behandlung mit einer konstanten Behandlungsfrequenz von 150 Hz sowie einer Behandlungsdauer von 30 s und Zugabe von Katalase. Die Viabilität der Zellen wurde an Tag 1, 4 und 7 nach der Plasmabehandlung gemessen. Messung der Viabilität mittels Resazurin-basiertem Assay an Tag 1, 4 und 7 nach der Behandlung (n = 6).

Die direkte Behandlung humaner dermaler Fibroblasten mit einer Dauer von 300 s und Frequenzen zwischen 150–600 Hz führte zu einer anfänglich deutlichen Reduktion der Zellzahl (siehe Abb. 31, 33, 35). Insgesamt war die Zellzahl der Proben, die direkt mit Plasma behandelt wurden, an Tag 1 nach der Behandlung geringer als nach einer indirekten Plasmabehandlung. Hierfür ergab sich jedoch keine Signifikanz. Verglichen mit der unbehandelten Kontrolle, war die Zellviabilität der direkt mit Plasma behandelten Zellen (150–600 Hz) am Tag nach der Plasmatherapie signifikant reduziert (siehe Abb. 31, 33, 35).

Indirekt mit Plasma behandelte Zellen zeigten, unter Zugabe von Katalase, an Tag 4 nach der Behandlung eine signifikant größere Anzahl an lebenden Zellen, verglichen mit direkt behandelten Zellen (siehe Abb. 31, 33, 35). Dieser Effekt war an Tag 7 nach der Behandlung für Zellen, welche mit 300 Hz und 600 Hz behandelt wurden, nicht mehr nachweisbar (siehe Abb. 33, 35). Das größte Proliferationspotenzial zeigte sich von Tag 1 auf Tag 4 bei humanen dermalen Fibroblasten, denen Katalase zugegeben wurde.

Im darauffolgenden Beobachtungsintervall, zwischen Tag 4 und Tag 7, war das Proliferationspotenzial der unbehandelten Zellpopulation am geringsten (siehe Abb. 32, 34, 36). Das Wachstum der Zellen, die indirekt und direkt mit Plasma behandelt wurden, war zunächst, verglichen mit der Kontrolle sowie den Zellen, denen ein Puffer zugegeben wurde, reduziert. Zwischen Tag 4 und Tag 7 nach der Plasmabehandlung stieg die Proliferationsrate jedoch wieder an (siehe Abb. 32, 34, 36).

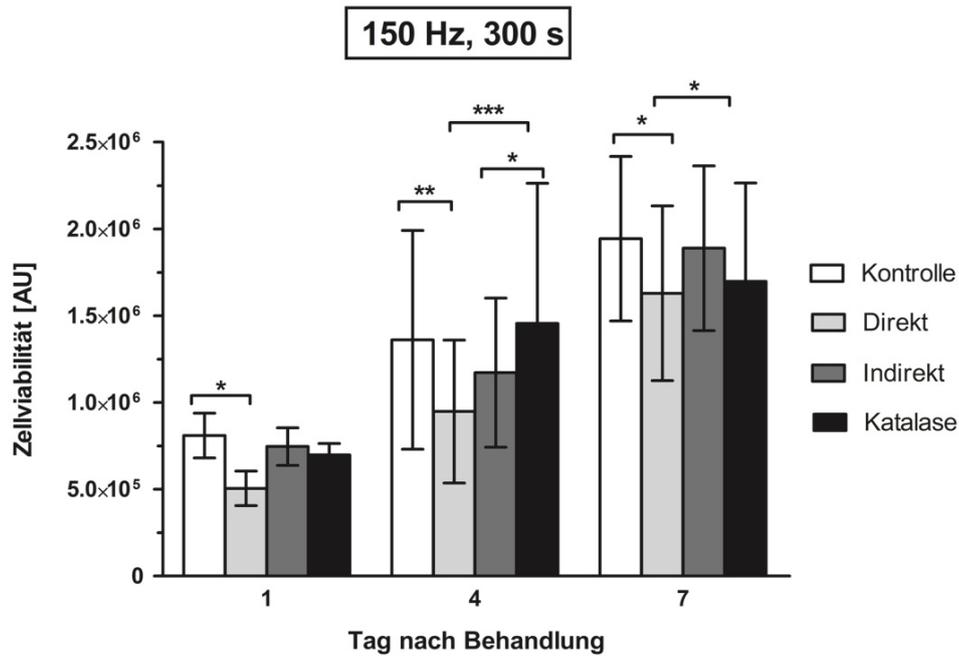


Abb. 31: Proliferation humaner dermaler Fibroblasten nach direkter und indirekter CAP-Behandlung. Einfluss des CAP auf die Zellviabilität unter Variation der Art der Behandlung mit einer konstanten Behandlungsfrequenz von 150 Hz und einer Behandlungsdauer von 300 s sowie einer Zugabe von Katalase nach CAP-Behandlung. Die Viabilität der Zellen wurde an Tag 1, 4 und 7 nach der Plasmabehandlung gemessen. Messung der Viabilität mittels Resazurin-basiertem Assay an Tag 1, 4 und 7 nach der Behandlung (n = 6; p > 0,05; * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001).

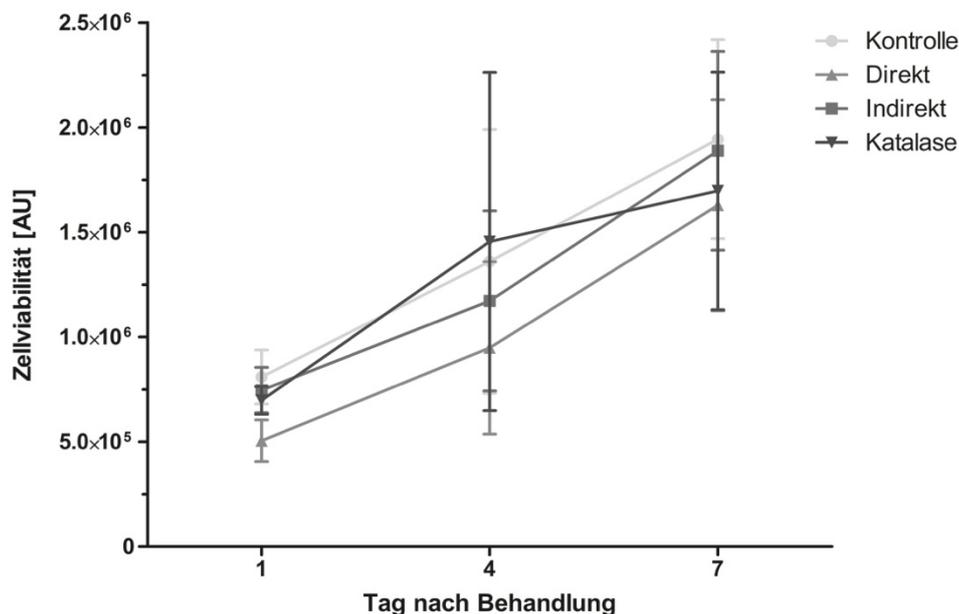


Abb. 32: Proliferationspotenzial humaner dermaler Fibroblasten nach direkter CAP-Behandlung sowie indirekter Behandlung mit und ohne Hinzugabe von Katalase. Einfluss des CAP auf die Zellviabilität unter Variation der Art der Behandlung mit einer konstanten Behandlungsfrequenz von 150 Hz sowie einer Behandlungsdauer von 300 s und Zugabe von Katalase. Die Viabilität der Zellen wurde an Tag 1, 4 und 7 nach der Plasmabehandlung gemessen. Messung der Viabilität mittels Resazurin-basiertem Assay an Tag 1, 4 und 7 nach der Behandlung (n = 6).

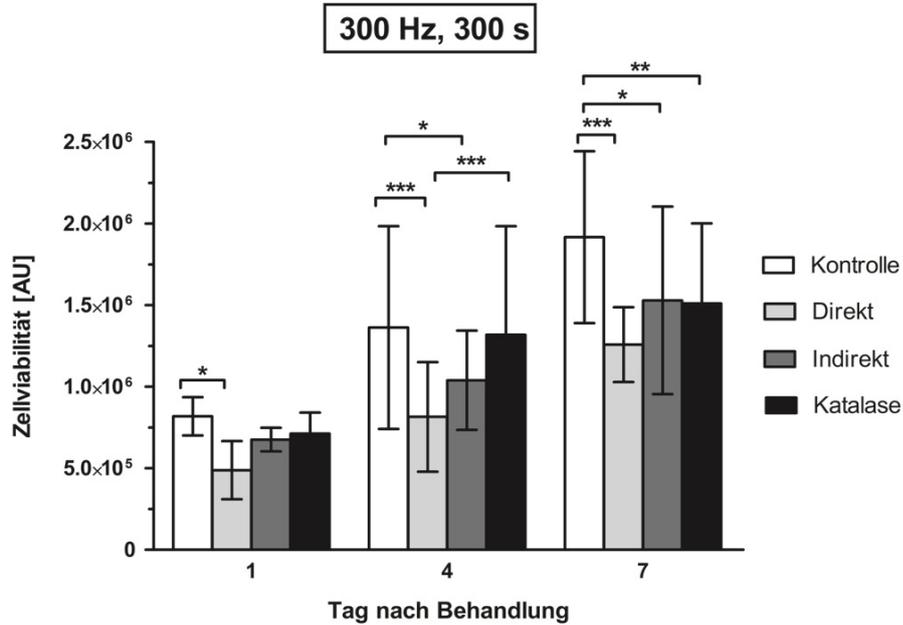


Abb. 33: Proliferation humaner dermaler Fibroblasten nach direkter und indirekter CAP-Behandlung. Einfluss des CAP auf die Zellviabilität unter Variation der Art der Behandlung mit einer konstanten Behandlungsfrequenz von 300 Hz und Behandlungsdauer von 300 s sowie einer Zugabe von Katalase nach CAP-Behandlung. Die Viabilität der Zellen wurde an Tag 1, 4 und 7 nach der Plasmabehandlung gemessen. Messung der Viabilität mittels Resazurin-basiertem Assay an Tag 1, 4 und 7 nach der Behandlung (n = 6; p > 0,05; * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001).

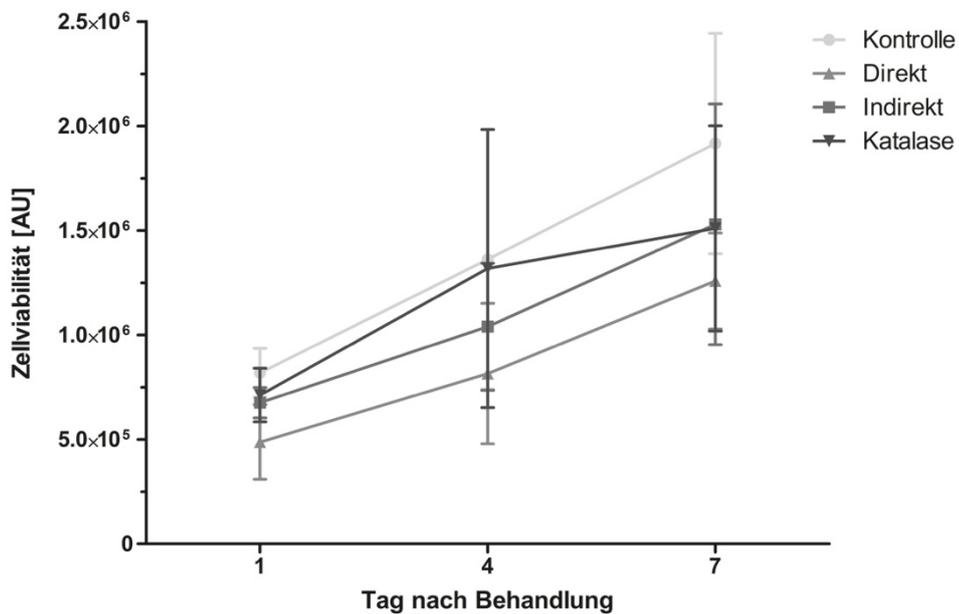


Abb. 34: Proliferationspotenzial humaner dermaler Fibroblasten nach direkter CAP-Behandlung sowie indirekter Behandlung mit und ohne Hinzugabe von Katalase. Einfluss des CAP auf die Zellviabilität unter Variation der Art der Behandlung mit einer konstanten Behandlungsfrequenz von 300 Hz sowie einer Behandlungsdauer von 300 s und Zugabe von Katalase. Die Viabilität der Zellen wurde an Tag 1, 4 und 7 nach der Plasmabehandlung gemessen. Messung der Viabilität mittels Resazurin-basiertem Assay an Tag 1, 4 und 7 nach der Behandlung (n = 6).

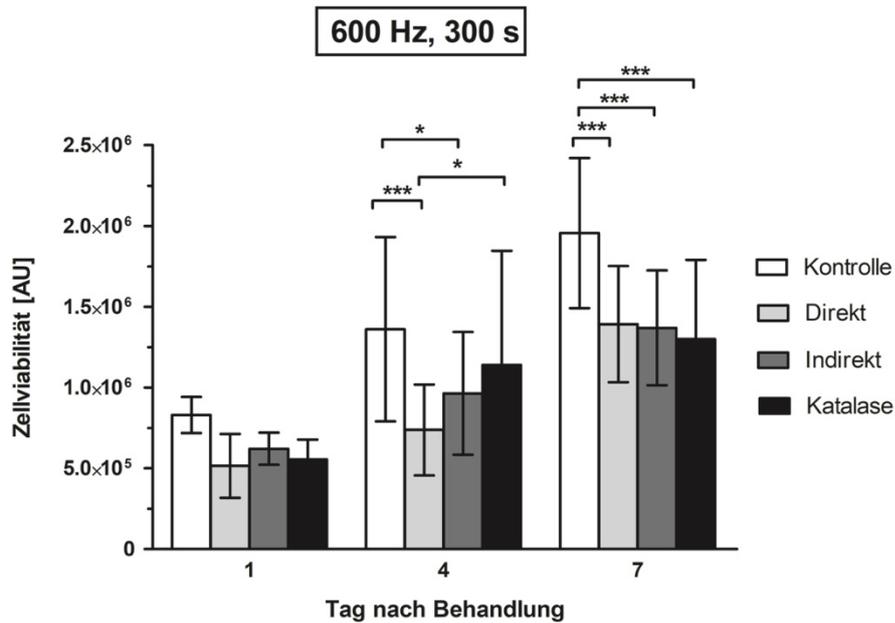


Abb. 35: Proliferation humaner dermaler Fibroblasten nach direkter und indirekter CAP-Behandlung. Einfluss des CAP auf die Zellviabilität unter Variation der Art der Behandlung mit einer konstanten Behandlungsfrequenz von 600 Hz und einer Behandlungsdauer von 300 s sowie einer Zugabe von Katalase nach CAP-Behandlung. Die Viabilität der Zellen wurde an Tag 1, 4 und 7 nach der Plasmabehandlung gemessen. Messung der Viabilität mittels Resazurin-basiertem Assay an Tag 1, 4 und 7 nach der Behandlung (n = 6; * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001).

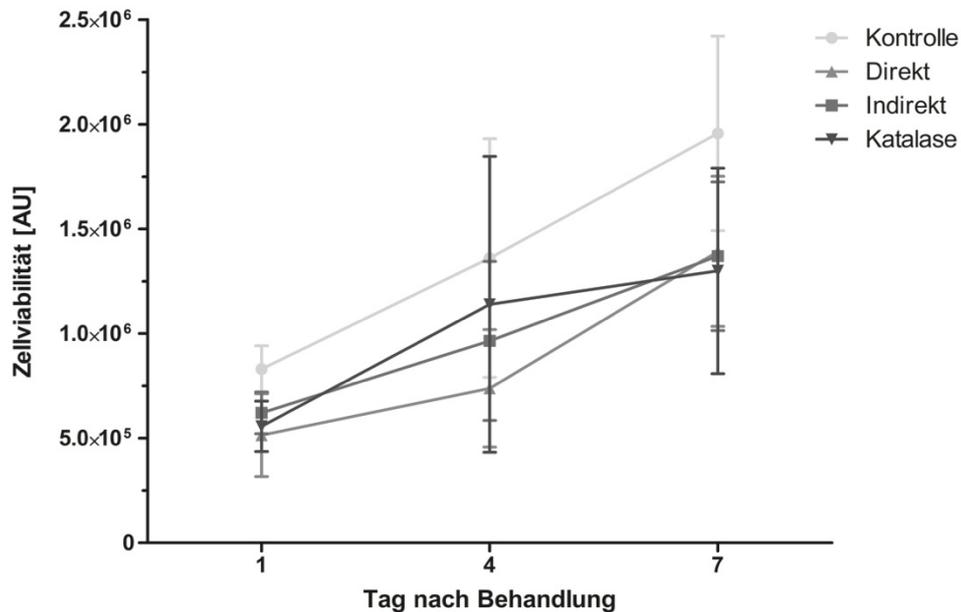


Abb. 36: Proliferationspotenzial humaner dermaler Fibroblasten nach direkter CAP-Behandlung sowie indirekter Behandlung mit und ohne Hinzugabe von Katalase. Einfluss des CAP auf die Zellviabilität unter Variation der Art der Behandlung mit einer konstanten Behandlungsfrequenz von 600 Hz sowie einer Behandlungsdauer von 300 s und Zugabe von Katalase. Die Viabilität der Zellen wurde an Tag 1, 4 und 7 nach der Plasmabehandlung gemessen. Messung der Viabilität mittels Resazurin-basiertem Assay an Tag 1, 4 und 7 nach der Behandlung (n = 6).

Die Behandlung humaner dermaler Fibroblasten für 600 s mit 600 Hz führte bei allen drei Versuchsansätzen zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität (siehe Abb. 37). Das Wachstumspotenzial aller behandelten Proben war über den gesamten Zeitraum niedriger als das der unbehandelten Kontrollen. Vergleicht man die behandelten Zellen untereinander, ist zunächst das Proliferationspotenzial der Zellpopulation am höchsten, der Katalase zugegeben wurde.

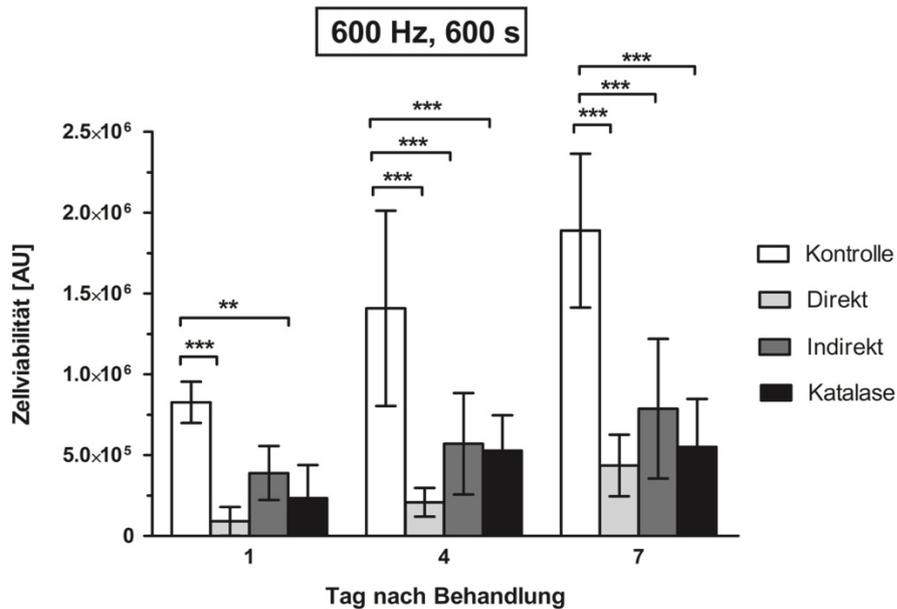


Abb. 37: Proliferation humaner dermaler Fibroblasten nach direkter und indirekter CAP-Behandlung. Einfluss des CAP auf die Zellviabilität unter Variation der Art der Behandlung mit einer konstanten Behandlungsfrequenz von 600 Hz und einer Behandlungsdauer von 600 s sowie einer Zugabe von Katalase nach CAP-Behandlung. Die Viabilität der Zellen wurde an Tag 1, 4 und 7 nach der Plasmabehandlung gemessen. Messung der Viabilität mittels Resazurin-basiertem Assay an Tag 1, 4 und 7 nach der Behandlung (n = 6; p > 0,05; * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001).

Im Beobachtungsintervall von Tag 4 bis Tag 7 war das Wachstum dieses Versuchsansatzes am geringsten (siehe Abb. 38). Die Zellviabilität der Zellen, die indirekt mit CAP behandelt wurden, war verglichen mit der direkten Behandlung über den gesamten Beobachtungszeitraum höher, hierfür ergab sich jedoch keine Signifikanz (siehe Abb. 37).

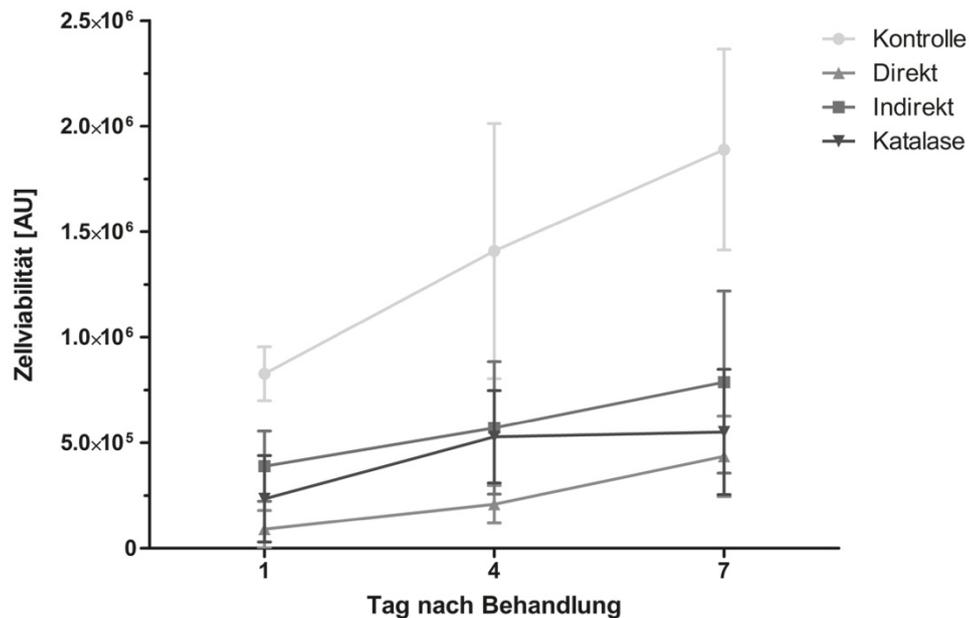


Abb. 38: Proliferationspotenzial humaner dermaler Fibroblasten nach direkter CAP-Behandlung sowie indirekter Behandlung mit und ohne Hinzugabe von Katalase. Einfluss des CAP auf die Zellviabilität unter Variation der Art der Behandlung mit einer konstanten Behandlungsfrequenz von 600 Hz sowie einer Behandlungsdauer von 600 s und Zugabe von Katalase. Die Viabilität der Zellen wurde an Tag 1, 4 und 7 nach der Plasmabehandlung gemessen. Messung der Viabilität mittels Resazurin-basiertem Assay an Tag 1, 4 und 7 nach der Behandlung (n = 6).

3.3 CAP-induzierte H₂O₂-Akkumulation und HDF

In Abbildung 39 ist die Zellviabilität am Tag 1 nach der Plasmabehandlung mit 150–600 Hz für 30–600 s in Abhängigkeit der produzierten H₂O₂-Konzentration dargestellt.

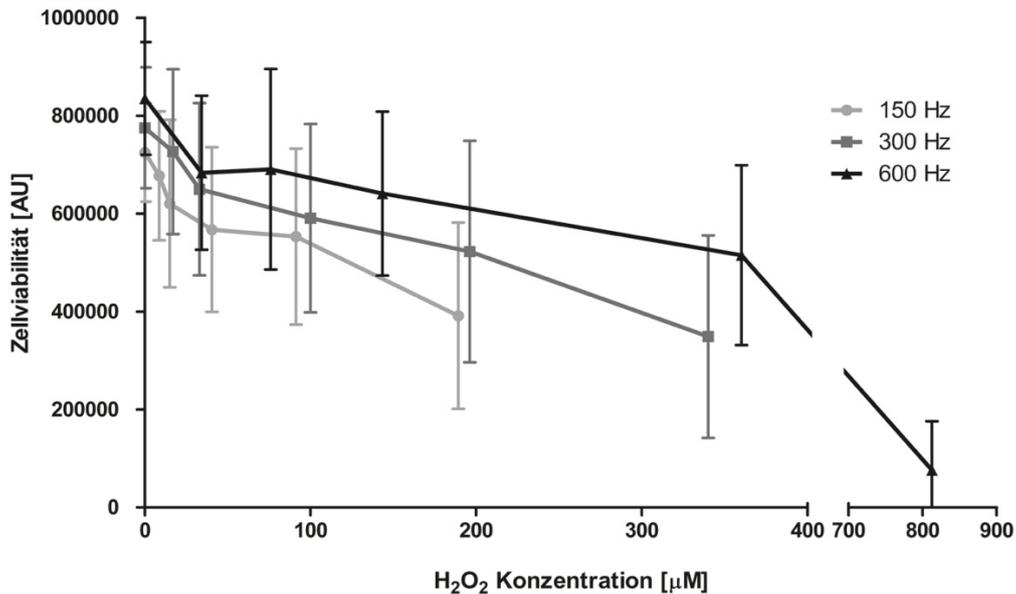


Abb. 39: Zellviabilität humaner dermaler Fibroblasten nach direkter Plasmabehandlung in Bezug auf die produzierte H₂O₂-Konzentration. Einfluss des Plasmas auf die Zellviabilität unter Variation der Behandlungsfrequenz (150, 300, 600 Hz) sowie der Behandlungsdauer (30–600 s). Die Viabilität der Zellen wurde mit der entsprechend produzierten Wasserstoffperoxidkonzentration korreliert. Messung der Viabilität mittels Resazurin-basiertem Assay (n = 8).

Bei Behandlung der Zellen mit 150 Hz wurde die maximale H₂O₂-Konzentration nach einer zehnmütigen Behandlung erreicht. Hierbei lag die H₂O₂-Konzentration bei $189 \pm 4 \mu\text{M}$. Bei dieser Konzentration wurde die Zellviabilität um durchschnittlich 46 %, verglichen mit der Zellviabilität vor der Behandlung, reduziert. Die höchste H₂O₂-Konzentration wurde bei einer Behandlungsfrequenz von 300 Hz ebenfalls nach 600 s erreicht und lag bei $340 \pm 12 \mu\text{M}$. Die Zellviabilität reduzierte sich im Mittel um 55 %. Bei Behandlung der Zellen mit 600 Hz wurde das Maximum der H₂O₂-Konzentration nach 10 min erreicht und lag bei $813 \pm 14 \mu\text{M}$. Insgesamt reduzierte sich die Zellviabilität, verglichen mit jener vor der CAP-Behandlung um durchschnittlich 91 %.

Die Zellviabilität und die produzierte H₂O₂-Konzentration verhielten sich in Bezug auf die Behandlungsfrequenz und -dauer nicht proportional (siehe Abb. 39). Initial ergab sich eine starke Reduktion der Zellviabilität bei niedriger Wasserstoffperoxidkonzentration. Dieser Effekt ließ sich bei allen ausgewählten Behandlungsfrequenzen beobachten. Bei einer Behandlungsfrequenz von 600 Hz reduzierte sich die Anzahl vitaler Zellen nach einer 30-sekündigen Behandlung im Mittel um 18 %, verglichen mit der Zellviabilität vor der Plasmabehandlung. Die entstandene Wasserstoffperoxidkonzentration lag bei $34 \pm 10 \mu\text{M}$.

Ähnliche Effekte zeigten sich ebenfalls bei einer Behandlungsfrequenz von 150 Hz. Bis zu einer H₂O₂-Konzentration von $40 \mu\text{M}$ sank die Zellviabilität in Korrelation zur produzierten H₂O₂-Konzentration deutlich. Zwischen $40 \mu\text{M}$ und $91 \mu\text{M}$ zeigte sich ein Plateau des Kurvenverlaufes. Eine Verlängerung der Behandlungsdauer von 300 s auf 600 s führte zu einer Erhöhung der H₂O₂-Konzentration auf $189 \mu\text{M}$ und zeigte auch eine weitere Reduktion der Zellviabilität.

3.4 Life-Cell-Imaging von HDF nach CAP-Behandlung

Nach Behandlung der humanen dermalen Fibroblasten mit Plasma wurden an Tag 1 und Tag 7 nach der Behandlung Untersuchungen der Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Die HDF wurden mit 120 Hz sowie 600 Hz für 300 s mit Plasma behandelt. An Tag 1 und Tag 7 nach der Behandlung wurden die Proben sowie eine unbehandelte Kontrolle gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Nach der Behandlung von HDF für 300 s mit 600 Hz zeigte sich anhand der Färbung mittels FDA eine Veränderung des Zellphänotyps (siehe Abb. 40). Insbesondere an Tag 7 nach der Behandlung fiel, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle, auf, dass die Zellen ihre für Fibroblasten typische Form verloren haben. Die Zellen waren deutlich kleiner und hatten eine abgerundete Form. Anhand der PI-Färbung konnte die Zahl an avitalen Zellen gemessen werden. An Tag 1 nach der Behandlung lag die Zahl avitaler Zellen im Sichtfeld nach einer Behandlung mit 600 Hz für 300 s bei 30. An Tag 7 nach der Behandlung bei 33. Am Tag 1 betrug die Zahl avitaler Zellen im Bildausschnitt der Kontrolle 6, am Tag 7 waren es 0. Anhand der Färbung mittels Hoechs fiel auf, dass die Zellkerne nach der Behandlung für 300 s mit 600 Hz vergrößert und zusammengelagert erschienen.

Die Zellform von HDF, die für 300 s mit 120 Hz behandelt wurden, war verglichen mit der unbehandelten Kontrolle sowohl an Tag 1 als auch an Tag 7 nach der Behandlung unverändert. Die Zahl avitaler Zellen im Sichtfeld betrug 1, sowohl an Tag 1 als auch an Tag 7 (siehe Abb. 40).

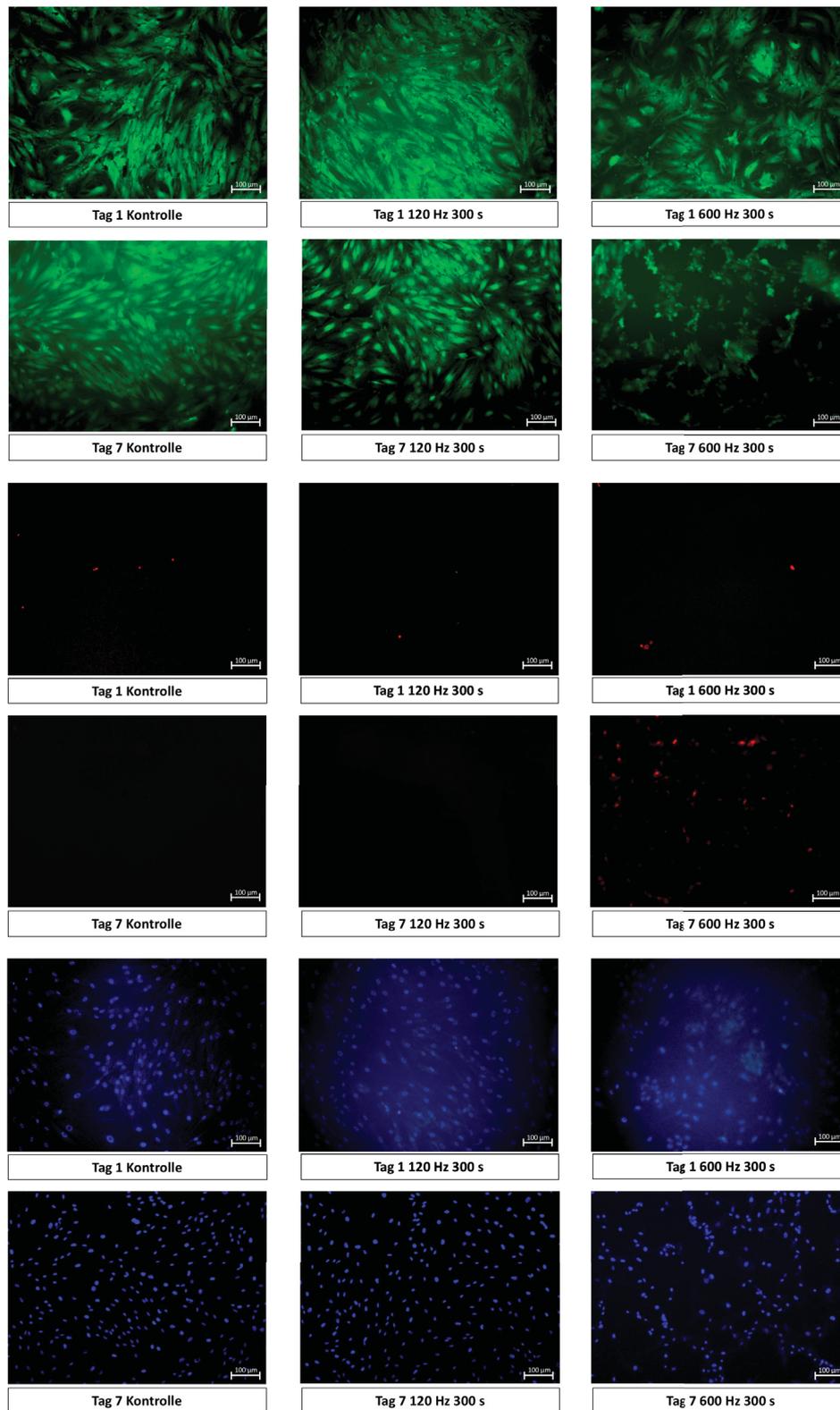


Abb. 40: Fluoreszenzmikroskopie nach Behandlung von HDF mit Plasma. HDF wurden für 300 s mit 120 Hz und 600 Hz mit Plasma behandelt. Die Kontrolle blieb unbehandelt. An Tag 1 und Tag 7 nach der Behandlung wurden die Zellen mit H, PI sowie FDA angefärbt. FDA färbt vitale Zellen grün. Durch PI werden avitale Zellen rot angefärbt. Durch H werden Zellkerne blau angefärbt.

Die Toxizität des Plasmas bei einer Plasmabehandlung von HDF für 600 s lässt sich mittels Fluoreszenzmikroskopie veranschaulichen (siehe Abb. 41). Eine Erhöhung der Behandlungsdauer von 300 s auf 600 s bei einer Frequenz von 600 Hz führte zu einer deutlichen Zunahme an avitalen Zellen (siehe Abb. 40, 41). Am Tag 1 nach der Behandlung von HDF mit 600 Hz für 300 s lag die Zahl avitaler Zellen im Bildausschnitt bei 18. Die Erhöhung der Behandlungsdauer auf 600 s führte zu einer Zunahme der avitalen Zellen auf durchschnittlich 175 pro Sichtfeld. Es ließen sich anhand der FDA-Färbung kaum vitale HDF erkennen.

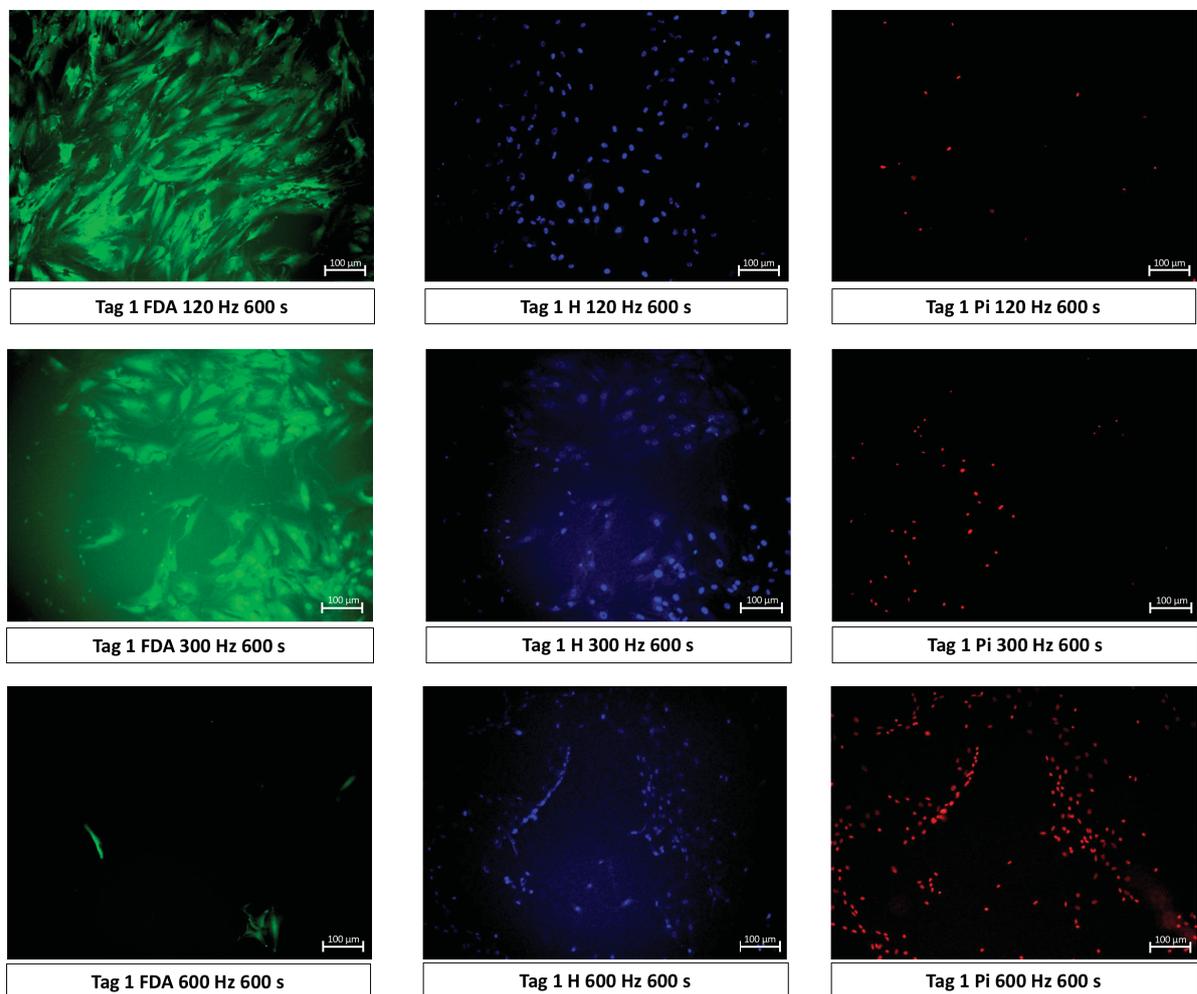


Abb. 41: Fluoreszenzmikroskopie nach Behandlung von HDF für 600 s mit Plasma. HDF wurden für 600 s mit 120 Hz, 300 Hz und 600 Hz mit Plasma behandelt. An Tag 1 nach der Behandlung wurden die Zellen mit H, PI sowie FDA angefärbt. FDA färbt vitale Zellen grün. Durch PI werden avitale Zellen rot und durch H werden Zellkerne blau angefärbt.

Bei einer Behandlung von HDF für 600 s mit 300 Hz zeigte sich eine geringere direkte Toxizität als bei einer Behandlungsfrequenz von 600 Hz. Es präsentierten sich 30 avitale Zellen pro Sichtfeld. Auch anhand der FDA-Färbung ließ sich eine reduzierte Anzahl an vitalen Fibroblasten erkennen. Die vorhandenen vitalen HDF wirkten jedoch nicht formverändert (siehe Abb. 41).

Am Tag 1 nach der Plasmabehandlung von HDF mit 120 Hz für 600 s präsentierten sich die HDF nicht formverändert. Bei der größeren Anzahl der Zellen handelte es sich um vitale HDF. Anhand der PI-Färbung ließen sich lediglich 10 avitale Zellen im Bildausschnitt feststellen. Im Vergleich zu einer Behandlungsdauer von 300 s hatte sich die Anzahl avitaler Zellen jedoch erhöht (siehe Abb. 40, 41).

4 Diskussion

Insbesondere mit der Entwicklung von CAP und der damit gewonnenen Möglichkeit, hitzeempfindliche biologische Gewebe zu behandeln, ist das Interesse an Plasma gewachsen. Neben der sterilisierenden Wirkung scheint Plasma ebenfalls positive Effekte auf die Behandlung von Wunden zu haben (Brehmer et al., 2015). Für das bessere Verständnis der Wirkung des Plasmas bedarf es jedoch weiterer Grundlagenforschung. Im Rahmen dieser Studie wurde die DBD-Plasmaquelle genutzt und es wurden die Effekte der Variation der Behandlungsdauer sowie der Behandlungsfrequenz untersucht. Bis heute sind die Mechanismen für die Wirksamkeit von CAP nicht vollständig verstanden. Insbesondere chemische Komponenten wie RONS scheinen neben physikalischen Komponenten von Bedeutung zu sein (Bernhardt et al., 2019). Die Effekte des CAP wurden unter Verwendung verschiedener Behandlungsparameter hinsichtlich der Veränderungen des pH-Wertes, der Entstehung von Wasserstoffperoxid sowie der Bildung von Nitrit und Nitrat untersucht. Des Weiteren wurde die Viabilität von HDF nach Behandlung mit CAP unter verschiedenen gewählten Einstellungsparametern gemessen. Diese Untersuchungen sollen zur weiteren Grundlagenforschung, zum besseren Verständnis der Wirkungsmechanismen sowie zur weiteren Verifikation von Behandlungseinstellungen bei Verwendung von CAP beitragen.

4.1 Entstehung von RONS nach der Behandlung mit CAP

Das Vorhandensein von Stickstoff in der Umgebungsluft sowie die Anregung mittels Plasma führen zur Entstehung von reaktiven Stickstoffspezies wie Nitrit und Nitrat (Ziuzina et al., 2013; Arjunan et al., 2011; Laroussi und Leipold, 2004). Nach Behandlung eines Puffermediums mittels DBD konnten verschiedene Konzentrationen an RNS gemessen werden. Dies wurde bereits in vorausgegangenen Arbeiten beschrieben. Bislang wurde jedoch nur die Variation der Behandlungsdauer untersucht, bei einer konstanten Behandlungsfrequenz (Heuer et al., 2015; Suschek et al., 2006). NO ist instabil und schwer zu quantifizieren, Nitrit und Nitrat sind stabile Reaktions- bzw. Endprodukte des Stickstoffmonoxids und erlauben somit Rückschlüsse auf die NO-Konzentration (Suschek et al., 2006; Rachmilewitz et al., 1995).

Im Rahmen dieser Studie wurden die Effekte der Variation der Behandlungsfrequenz sowie der Behandlungsdauer untersucht. Die Behandlung mit CAP führte zu einem deutlichen Anstieg der gemessenen Nitrit- und Nitratkonzentration, in Korrelation mit der Behandlungsdauer und -frequenz. Die maximal gemessene Nitratkonzentration lag bei $3142 \pm 1275 \mu\text{M}$ nach einer 600-sekündigen Behandlung mittels CAP bei 600 Hz (siehe Abb. 14). Die maximal gemessene Nitritkonzentration lag bei $495 \pm 191 \mu\text{M}$, diese wurde nach einer 300-sekündigen Plasmabehandlung mit 600 Hz gemessen. Die Verlängerung der Behandlungsdauer auf 10 min, bei einer Frequenz von 600 Hz, führte zu einer deutlich geringeren Nitritentstehung von im Mittel $304 \pm 243 \mu\text{M}$ (siehe Abb. 16). Da Nitrit instabil ist, wird es durch den Luftsauerstoff weiter zu Nitrat oxidiert oder durch den niedrigeren pH-Wert zu NO, weswegen die Nitritkonzentration mit Dauer der Behandlung sinkt, während die Nitratkonzentration stark ansteigt.

Im Vergleich hierzu liegt die Nitritkonzentration im Blutplasma gesunder Probanden bei $0,1\text{--}0,3 \mu\text{M}$ und die Nitratkonzentration bei $14\text{--}30 \mu\text{M}$. Die Nitritkonzentration von Hautgewebe liegt bei $5,1\text{--}8,4 \mu\text{M}$, die Nitratkonzentration bei $190\text{--}278 \mu\text{M}$ (Suschek et al., 2010).

Nicht enzymatisch kann Stickstoffmonoxid pH-induziert, unter sauren Bedingungen, durch Reduktion von Nitritanionen entstehen (Suschek et al., 2006; Dejam et al., 2003). Anhand der Experimente konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von PBS mit CAP in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und -frequenz zu einem verstärkten Abfall des pH-Wertes führt. Sowohl die Verlängerung der Behandlungsdauer als auch die Erhöhung der Behandlungsfrequenz führten zu einem stärkeren Abfall des pH-Wertes. Bei einer Behandlung mit 600 Hz für 600 s kam es zu einem Abfall des pH-Wertes bis auf $4,35 \pm 0,71$ (siehe Abb. 13).

Durch die Anwesenheit von Sauerstoff in der Umgebungsluft können reaktive Sauerstoffspezies bei der Generierung von Plasma entstehen. Es werden unter anderem Hydroxyl-Radikale, Superoxide sowie Wasserstoffperoxid gebildet (Ziuzina et al., 2013; Oehmigen et al., 2010; Arjunan et al., 2011). Die Wasserstoffperoxid-Konzentration zeigte einen linearen Anstieg in Korrelation mit der Behandlungsdauer und der Behandlungsfrequenz (120–300 Hz). Die maximal

gemessene Konzentration lag bei $813 \pm 14 \mu\text{M}$ nach einer Behandlung mit 600 Hz über 10 min (siehe Abb. 17 und 18).

RONs zeigen sowohl physiologische als auch pathologische Effekte (von Woedtke et al., 2016; Droge, 2002). In hohen Konzentrationen können sie den Zelltod sowie die Apoptose induzieren (von Woedtke et al., 2016; Hasse et al., 2016; Lendeckel et al., 2015). Balzer et al. zeigten bereits in vorausgegangenen Studien, dass RONS sowie ein niedriger pH-Wert an der reduzierten Lebensfähigkeit von humanen Zellen nach Plasmabehandlung beteiligt sind. So führt das gebildete Wasserstoffperoxid zu einem Proliferationsstopp der Zellen. Es wird jedoch von weiteren bisher nicht bekannten Faktoren ausgegangen, die zur Toxizität beitragen (Balzer et al., 2015).

Die Sensibilität von verschiedenen Zellreihen ist ebenfalls als unterschiedlich zu erachten. T-Lymphozyten sowie Zellen, die sich schnell teilen, scheinen sehr empfindlich auf RONS zu reagieren, während Keratinozyten und Fibroblasten relativ robust zu sein scheinen (von Woedtke et al., 2016; Wende et al., 2014; Hasse et al., 2016; Lendeckel et al., 2015).

Die Erzeugung von RONS mit CAP kann aufgrund einer Reihe positiver Effekte im Bereich der klinischen Anwendung von Nutzen sein. So könnten sie über eine gesteigerte Genexpression von Enzymen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren die Wundheilung stimulieren (Arjunan et al., 2011; von Woedtke et al., 2016; Kalghatgi et al., 2010). Durch die antimikrobiellen Effekte des Plasmas kann die Biofilmbildung von verschiedenen Erregern, wie dem *Staphylococcus aureus* oder dem *Pseudomonas aeruginosa*, welche häufig in chronischen Wunden nachzuweisen sind, effektiv gehemmt werden (Helmke, 2016; Zemke et al., 2014; Schlag et al., 2007). Weiterhin kann durch die CAP-Behandlung der Haut NO-induziert die Mikrozirkulation verbessert werden (Mowbray et al., 2008; Heuer et al., 2015).

Anhand der *In-vitro*-Experimente mit CAP konnten mit Erhöhung der Behandlungsdauer sowie -frequenz der Anstieg der Konzentration von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies sowie die zunehmende Ansäuerung des Puffers nachgewiesen werden. RONS haben konzentrationsabhängig physiologische und toxische Effekte auf Zellen.

Bei niedrigen Konzentrationen scheinen die positiven Effekte zu überwiegen, während bei höheren Konzentrationen die negativen Wirkungen der RONS im Vordergrund zu stehen scheinen (Gan et al., 2018; Shi et al., 2018). Die im Rahmen der vorliegenden Studie erzielten Ergebnisse können genutzt werden, um die Entstehung von RONS im Hinblick auf die Behandlungsdauer sowie -frequenz zu definieren.

4.2 Zellviabilität

4.2.1 Effekte einer direkten Behandlung mit CAP

Humane dermale Fibroblasten wurden unter Variation der Behandlungsfrequenz und der Behandlungsdauer mit CAP behandelt. Im Rahmen der physiologischen Wundheilung werden Fibroblasten, die neben dem Bindegewebe Hauptbestandteil der Dermis sind (Held et al., 2015; Tobin, 2006), über FGF-2 und TGF- β stimuliert und zur Kollagensynthese angeregt. Im weiteren Verlauf werden die Fibroblasten über TGF- β zur Differenzierung in Myofibroblasten angeregt (Baum und Arpey, 2005; Tiede und Emmert, 2016; Bingöl, 2014; Lawrence, 1998). Zu den wichtigen Funktionen der Fibroblasten gehören unter anderem die Synthese von extrazellulärer Matrix sowie die Unterstützung der Wundrandadaptation (Lawrence, 1998; Baum und Arpey, 2005). Sie können jedoch ebenfalls an der Bildung von pathologisch veränderten Narben, wie hypertrophen und keloiden Narben, beteiligt sein (Desmouliere, 1995; Desmouliere et al., 2005; Darby und Hewitson, 2007; Balzer et al., 2015).

Die erzielten Ergebnisse konnten zeigen, dass bei direkter Anwendung niedriger Behandlungsfrequenzen sowie einer kurzen Behandlungsdauer ein positiver Effekt auf die Proliferation dermalen humaner Fibroblasten induziert wurde. Eine signifikant höhere Zellviabilität der Fibroblasten präsentierte sich an Tag 7 nach der Behandlung mit CAP für 30 s bei einer Behandlungsfrequenz von 120 Hz (siehe Abb. 19) sowie 150 Hz (siehe Abb. 20). Bei Behandlung der Zellen mit 300 Hz zeigte sich über den gesamten Beobachtungszeitraum eine signifikante Reduktion der Zellviabilität von Fibroblasten, die initial für 5 und 10 min mit CAP behandelt wurden (siehe Abb. 21). An Tag 4 und Tag 7 nach der Behandlung von Fibroblasten mit 600 Hz zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle eine signifikant niedrigere Zahl vitaler

Zellen. Dies gilt für Proben, die für 60–600 s mit Plasma behandelt wurden (siehe Abb. 22).

Anhand der Fluoreszenzmikroskopie kann die Reduktion vitaler Zellen nach einer Plasmabehandlung mit 600 Hz verdeutlicht werden. Insbesondere bei einer Behandlungsdauer von 600 s mit 600 Hz zeigte sich eine ausgeprägte direkte Toxizität. Nach einer 600-sekündigen Behandlung mit 120 Hz zeigten sich hingegen nur wenige avitale Zellen und keine Zellformveränderungen (siehe Abb. 41). Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigten auch für die Behandlung von HDF für 300 s mit 120 Hz verglichen mit der Kontrolle keine Zellveränderungen. Die Plasmabehandlung von HDF für 300 s mit 600 Hz führte hingegen zu einem Anstieg der Anzahl avitaler Zellen sowie zu einer deutlichen Formveränderung (siehe Abb. 40).

Das Wachstumspotenzial war für Zellen, die für 30–150 s und mit 120 Hz und 150 Hz mit CAP behandelt wurden, von Tag 4 auf Tag 7 am größten (siehe Abb. 23–25). Bei einer Behandlungsdauer von 300 s präsentierte sich ein initial reduziertes Wachstum der Fibroblasten. Im weiteren Beobachtungszeitraum von Tag 4 auf Tag 7 war das Proliferationspotenzial der Zellen, die eine CAP-Behandlung mit 300 Hz erhielten, jedoch am größten (siehe Abb. 26). Bei allen Zellreihen präsentierte sich von Tag 1 auf Tag 4 nach einer zehnminütigen CAP-Behandlung ein deutlich reduziertes Wachstumspotenzial (siehe Abb. 27).

Das erhöhte Proliferationspotenzial nach einer kurzen Behandlungsdauer mit einer Frequenz von 120–150 Hz könnte durch die erhöhte Ausschüttung des Fibroblasten-Wachstumsfaktors FGF2 bei kurzer Plasmabehandlungsdauer bedingt sein, welcher über reaktive Sauerstoffspezies vermittelt wird. Es werden weitere Wachstumsfaktoren wie VEGF über ROS stimuliert. Über diese Wachstumsfaktoren werden ebenfalls die Migration und Proliferation von Endothelzellen sowie die Angiogenese stimuliert (Arjunan et al., 2011; von Woedtke et al., 2016; Kalghatgi et al., 2010). Shi et al. konnten eine signifikante Steigerung der Proliferation von Fibroblasten, der Sekretion des epidermalen Wachstumsfaktors sowie des TGF- β nach einer kurzen Behandlung mit CAP nachweisen (Shi et al., 2018).

Bei Verwendung einer hohen Plasmodosis und langen Behandlungsdauer lassen sich toxische Effekte des Plasmas nachweisen. Durch Proliferationsstopp, Apoptose, Schädigung der DNA und Zellzyklusarrest kommt es zum Zelltod (Haertel et al., 2014; Tiede und Emmert, 2016; von Woedtke et al., 2013). Eine deutliche Reduktion der Zellviabilität sowie des Wachstumspotenzials lassen sich nach einer Behandlungsdauer von 600 s sowie 600 Hz mittels CAP nachweisen. Bereits nach einer Behandlung für 300 s mit 600 Hz lassen sich anhand der Fluoreszenzmikroskopie ausgeprägte Zellformveränderungen sowie ein deutlicher Anstieg der Anzahl avitaler Zellen feststellen. Bei einer Frequenz von 120 Hz zeigen sich hingegen selbst bei einer langen Behandlungsdauer wenig Zellformveränderungen.

4.2.2 Effekte der RONS auf HDF nach direkter CAP-Behandlung

Es lässt sich zusammenfassen, dass es mit einer Erhöhung der Behandlungsdauer und -frequenz zu einer deutlichen Senkung des pH-Wertes sowie zur Entstehung von RONS in höheren Konzentrationen kommt. Auf humane dermale Fibroblasten bewirken eine Reduzierung des pH-Wertes und RONS in niedrigen Konzentrationen eine Steigerung des Proliferationspotenzials, bei hohen Konzentrationen kommt es zu einer Reduktion der Zellviabilität sowie des Wachstumspotenzials. Diese konzentrationsabhängigen Effekte der RONS wurden bereits in Vorarbeiten beschrieben. In niedrigen Konzentrationen können diese das Wachstum fördern und die Apoptose hemmen, während sie in höheren Konzentrationen die Apoptose fördern und den Zellzyklus hemmen (Thomas et al., 2008; Graves, 2012). Insgesamt ist die Rolle der RONS somit differenziert zu betrachten. Entscheidend für ihre Anwendung ist es, ein Gleichgewicht zwischen nützlichen und schädlichen Effekten zu erreichen (Graves, 2012; Halliwell, 2006). Während sich die stimulierenden Effekte der plasmaproduzierten RONS positiv auf die Wundheilung auswirken könnten, können die inaktivierenden Effekte zur Dekontamination genutzt werden (Ziuzina et al., 2013).

Im Hinblick auf die Variation der Behandlungseinstellungen der DBD lässt sich anhand der erzielten Ergebnisse ableiten, dass für die Behandlung chronischer Wunden, mit dem Ziel der Proliferationsstimulation von HDF, niedrige

Behandlungsfrequenzen sowie kurze Behandlungszeiten am besten geeignet zu sein scheinen. Diese Effekte sollten in zukünftigen Forschungsarbeiten in *In-vivo*-Versuchen weiter untersucht werden. Längere Behandlungszeiten mit höheren Frequenzen könnten hingegen für die effektive Dekontamination oder die Behandlung einer überschießenden Wundheilung genutzt werden. Bei einer hohen Behandlungsdauer kommt es zu einer Abnahme der Zellproliferation und einer Zunahme der Toxizität des Plasmas, Gleiches gilt für die Erhöhung der Behandlungsfrequenz. Um die Effekte der Behandlungsdauer und der Behandlungsfrequenz bezüglich der Toxizität besser einordnen zu können, sollten in zukünftigen Arbeiten auch sehr kurze Behandlungszeiten wie 5 s bei hohen Behandlungsfrequenzen wie 600 Hz untersucht werden.

4.2.3 Vergleich zwischen direkter und indirekter CAP-Behandlung und die Effekte von Katalase

Im Weiteren wurde neben der Variation der Behandlungsfrequenz und -dauer die Art der Behandlung verändert. Proben wurden direkt oder indirekt mit Plasma behandelt. Weiterhin wurden die Effekte bei Hinzugabe von Katalase nach einer indirekten Behandlung mit Plasma untersucht.

Nach einer CAP-Behandlung von humanen dermalen Fibroblasten für 30 s mit einer Frequenz von 150 Hz präsentierte sich initial sowohl bei einer indirekten als auch direkten Behandlung eine stärkere Reduktion der Zellviabilität als in Anwesenheit von Katalase (siehe Abb. 29). Im weiteren Verlauf zeigte sich im Vergleich mit den Zellen, denen Katalase zugegeben wurde und zur unbehandelten Kontrolle jedoch eine höhere Proliferationsrate der Zellen, die direkt und indirekt mit Plasma behandelt wurden. Am Tag 4 nach einer Behandlung für 300 s mit 150–600 Hz und am Tag 7 nach einer Behandlung mit 150 Hz für 300 s präsentierte sich eine signifikant höhere Viabilität der Zellen, denen nach einer indirekten Behandlung Katalase zugegeben wurde, verglichen mit den Zellen, die direkt mit Plasma behandelt wurden (siehe Abb. 31, 33, 35). Es fällt jedoch auf, dass sich die direkt mit Plasma behandelten Zellen durch das höhere Wachstumspotenzial von Tag 4 auf Tag 7 den Zellen, denen Katalase zugegeben wurden, annähern. Am Tag 7 nach einer Behandlung mit 300–600 Hz ergab sich keine signifikant höhere Viabilität der

Zellen, denen Katalase zugegeben wurde. Werden die indirekt mit Plasma behandelten Zellen mit den Zellen verglichen, denen Katalase zugegeben wurde, präsentierte sich lediglich am Tag 4 nach einer Behandlung für 300 s mit 150 Hz eine signifikant höhere Viabilität der HDF, denen Katalase zugegeben wurde (siehe Abb. 31).

Die Zellviabilität der indirekt behandelten Zellen war meist größer als die der direkt behandelten Zellen, hierfür ergab sich jedoch keine Signifikanz. Insgesamt zeigten die Zellen, denen keine Katalase zugegeben wurde, von Tag 4 auf Tag 7 ein größeres Wachstumspotenzial als Zellen, denen Katalase hinzugefügt wurde. Bei den Zellen, denen Katalase zugegeben wurde, präsentierte sich initial eine höhere Zellviabilität. Das Proliferationspotenzial dieser Proben flachte jedoch im Beobachtungsintervall insbesondere von Tag 4 auf Tag 7 deutlich ab (siehe Abb. 30, 32, 34, 36, 38).

Die Erhöhung der Behandlungsdauer auf 10 min führte, verglichen mit der Kontrolle, unabhängig von der Art der Behandlung zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität. Die Viabilität der Fibroblasten, welche indirekt mit Plasma behandelt wurden, war verglichen mit den direkt behandelten Zellen sowie den Zellen, denen Katalase zugegeben wurde, am höchsten. Hierfür konnte jedoch keine Signifikanz festgestellt werden.

Für die initiale Toxizität des CAP kommt das ROS Wasserstoffperoxid in Betracht, das durch die Katalase zu H_2O und O_2 gepuffert wird (Balzer, 2016), wodurch die initiale Reduktion der Toxizität durch Katalase erklärt werden könnte. Im weiteren Verlauf zeigt sich jedoch ein größeres Wachstumspotenzial der direkt und indirekt behandelten Zellen. Dies könnte durch die wachstumsfördernden Effekte von RONS bei niedriger Konzentration verursacht werden. Schon in vorausgegangenen Studien mit Keratinozyten wurde das Wasserstoffperoxid als Schlüsselfaktor für die Wachstumsregulation beschrieben (Balzer, 2016).

Bei Erhöhung der Behandlungsdauer und der Behandlungsfrequenz zeigte sich bei allen Proben eine deutliche Reduktion der Zellviabilität, die mit der höheren Konzentration von Wasserstoffperoxid, Nitrat, Nitrit sowie mit dem niedrigeren pH-Wert zu korrelieren scheint. Ebenfalls scheint die Wirkung der Katalase bei einer

Behandlungsdauer von 10 min für 600 Hz durch die hohe Konzentration an RONS sowie den niedrigen pH-Wert inhibiert zu werden.

Für weitere klinische Untersuchungen können sowohl die direkte als auch die indirekte CAP-Behandlung von Interesse sein. Die direkte Behandlung scheint gemäß den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit toxischer als die indirekte Behandlung zu sein. Als Grund hierfür kommen unter anderem Strom und UV-Strahlung als Ursachen für die direkte Toxizität des Plasmas in Betracht. Ein Vorteil der indirekten Behandlung könnte neben der niedrigeren direkten Toxizität unter anderem in der besseren Behandlung von größeren Wundflächen liegen. Der Einsatz von Katalase zur Inhibierung möglicher toxischer Effekte scheint nicht von Vorteil zu sein, da diese insbesondere die gewünschten Effekte der RONS zu reduzieren scheint.

4.2.4 Toxizität des CAP und Wasserstoffperoxidkonzentration

Anhand der vorherigen Untersuchungen präsentierte sich insbesondere eine initiale Toxizität für mit CAP behandelte Zellen. Für diesen Effekt kommt das Wasserstoffperoxid in Betracht. Anhand der Abbildung 39 lässt sich die Zellviabilität an Tag 1 nach der Plasmabehandlung mit 150–600 Hz für 30–600 s in Abhängigkeit der produzierten Wasserstoffperoxidkonzentration ablesen. Es zeigt sich, dass sich die produzierte Wasserstoffperoxidkonzentration in Bezug auf die Behandlungsfrequenz und die Behandlungsdauer nicht proportional verhält. Während sich initial eine starke Reduktion der Zellviabilität bei niedriger Wasserstoffperoxidkonzentration zeigt, präsentiert sich bei weiterem Anstieg der Wasserstoffperoxidkonzentration ein flacherer Kurvenverlauf. Dies könnte die initial positiven Effekte der Zugabe von Katalase auf die Zellviabilität erklären. Es lässt sich jedoch ebenfalls ableiten, dass die Toxizität des Plasmas neben der Bildung von Wasserstoffperoxid noch auf weiteren Faktoren zu basieren scheint. Hierfür kommen neben der steigenden Nitrit-/Nitrat-Konzentration der niedrigere pH-Wert oder weitere Faktoren wie beispielsweise elektromagnetische Strahlung oder UV-Licht in Betracht (Balzer, 2016).

4.3 Klinische Anwendung von Plasma

Anhand der erzielten Ergebnisse kann gezeigt werden, dass es mit Erhöhung der Behandlungsdauer und der Behandlungsfrequenz bei einer CAP-Behandlung zu einem Abfall des pH-Wertes sowie einem Anstieg an RONS kommt (siehe Abb. 13–18). Weiterhin zeigt sich bei einer kurzen Behandlungsdauer sowie einer niedrigen Behandlungsfrequenz ein positiver Effekt auf die Proliferation von Fibroblasten (siehe Abb. 19, 20). Die proliferationsfördernden Effekte einer kurzen CAP-Behandlung konnten Shi et al. anhand ihrer Untersuchungen ebenfalls nachweisen, wonach eine kurze Behandlung von Fibroblasten mit CAP zu einer Aktivierung von Fibroblasten beiträgt, die Zellproliferation fördert und schließlich zu einer Verbesserung der Wundheilung führt (Shi et al., 2018). Diese Effekte konnten bereits durch klinische Untersuchungen bestätigt werden. Heinlin et al. zeigten eine signifikant verbesserte Heilung im Bereich der Spalthautentnahmestellen am Oberschenkel nach Behandlung mittels CAP (Heinlin et al., 2013). Anhand einer Studie von Chuangsuwanich et al. konnten eine verbesserte Heilung von Druckgeschwüren sowie eine Reduktion der Keimbesiedelung nach CAP-Behandlung nachgewiesen werden (Chuangsuwanich et al., 2016). Bereits in niedrigerer Dosis kann CAP zur Desinfektion von Wunden beitragen (Gan et al., 2019).

Für die antibakteriellen Effekte scheinen insbesondere die RONS sowie ein niedriger pH-Wert verantwortlich zu sein. Diese sind jedoch auch an den toxischen Effekten auf humane Zellen beteiligt (Balzer et al., 2015; Ziuzina et al., 2013; Liu et al., 2010). Eine hohe Behandlungsfrequenz sowie eine lange Behandlungsdauer korrelieren mit einer Reduktion des pH-Wertes sowie einem Anstieg an RONS, welche zu einer deutlichen Reduktion der Viabilität von humanen dermalen Fibroblasten beitragen.

Fibroblasten, die 300 s mit 300 Hz behandelt wurden, erholen sich von der Behandlung mit CAP, wie sich an dem Anstieg des initial reduzierten Wachstumspotenzials nachweisen lässt (siehe Abb. 26). Diese Effekte könnten sich positiv auf die Behandlung hypertropher Narben auswirken. Wang et al. konnten einen beschleunigten Wundheilungsprozess sowie eine reduzierte Narbenfläche nach Behandlung mit Plasma zeigen (Wang et al., 2020). Von großem Interesse

wären zukünftige klinische Studien mit Blick auf die Effekte einer direkten CAP-Behandlung von beispielsweise hypertrophen Narben.

In höherer Dosierung könnte CAP aufgrund seiner proliferationshemmenden Effekte für die Behandlung von proliferativen Erkrankungen von Interesse sein (Gan et al., 2019). Durch die zellspezifische Reaktion auf CAP könnte es in Zukunft in der Tumorthherapie eine große Rolle spielen. Anhand einer murinen Melanom-B16/F10-Zelllinie wurde *in vitro* bereits ein Verlust der Lebensfähigkeit von fast 100 % der Zellen 48 Stunden nach einer dreiminütigen CAP-Behandlung gezeigt (Bernhardt et al., 2019; Mashayekh et al., 2015).

4.4 Empfehlungen für die Wahl der Behandlungsdauer und der Behandlungsfrequenz

Ziel dieser Arbeit war es, die Effekte der Behandlungsfrequenz und Behandlungsdauer einer CAP-Behandlung genauer zu untersuchen und zu differenzieren. Es zeigte sich, dass Frequenzen zwischen 120–150 Hz sowie eine kurze Behandlungsdauer von 30 s aufgrund ihrer proliferationsfördernden Effekte für weitere klinische Untersuchungen unter anderem in Bezug auf die Behandlung von schlecht heilenden, chronischen Wunden von großem Interesse sein können. Zur Behandlung einer überschießenden Wundheilung, wie es beispielsweise bei hypertrophen Narben der Fall ist, könnte sich aufgrund der initialen Reduktion der Zellviabilität und des im weiteren Verlauf wieder ansteigenden Wachstumspotenzial eine Behandlungsfrequenz von 300 Hz eignen. Die genannten Effekte lassen sich insbesondere bei einer Behandlungsdauer von 300 s beobachten.

Alle Frequenzen (120–600 Hz) zeigen bereits an Tag 1 nach einer 600-sekündigen CAP-Behandlung eine signifikante Reduktion der Anzahl vitaler Zellen. Dieser Effekt lässt sich über den gesamten Beobachtungszeitraum nachweisen. Anhand der Aufnahmen der Fluoreszenzmikroskopie lässt sich eine deutliche Veränderung der Zellform sowie eine Zunahme avitaler Zellen nach einer Behandlung von 600 Hz für 600 s erkennen. Demnach scheint eine zehnminütige Behandlungsdauer für weitere klinische Untersuchungen weniger empfehlenswert zu sein.

Die vorgestellten Ergebnisse müssen kritisch evaluiert werden. Sie basieren auf standardisierten Einstellungen mit einer definierten Plasmaquelle und wurden *in-*

vitro gewonnen. Bei klinischen Untersuchungen müssen unter anderem Veränderungen des Abstandes zum Wundgrund sowie größere Oberflächen bedacht werden. Es wäre wünschenswert, künftig für die verschiedenen Plasmaquellen sowie die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten einen Rahmen für die Behandlungseinstellungen festzulegen. Weiterhin könnten die Effekte einer sehr kurzen Behandlungsdauer (< 30 s) bei hoher Behandlungsfrequenz weitere Erkenntnisse ergeben. Möglicherweise könnten trotz hoher Behandlungsfrequenz bei einer sehr kurzen Behandlungszeit die positiven Eigenschaften des Plasmas, wie die proliferationsfördernde sowie antibakterielle Effekte, bei geringer Toxizität genutzt werden.

4.5 Schlussfolgerung

CAP stellt einen vielversprechenden neuen Behandlungsansatz in der Medizin, insbesondere in der Behandlung von chronischen Wunden, hypertrophen Narben, bakterieller Besiedlung sowie in der Tumortherapie, dar. In der Plastischen Chirurgie bietet das CAP eine innovative Möglichkeit der Behandlung von Problemwunden. Insbesondere die Kombination der antibakteriellen Wirksamkeit mit den proliferationsfördernden Effekten auf Zellen der Haut wie Keratinozyten und Fibroblasten tragen zu dem großen Interesse an CAP bei. In den letzten Jahren wurde im Bereich der Plasmamedizin viel an Forschungsarbeit geleistet. Es sind bereits verschiedene Plasmaquellen für die klinische Anwendung zugelassen. Dennoch ist das komplexe Gasgemisch im Hinblick auf die Mechanismen für seine Wirksamkeit noch nicht vollständig verstanden. Verschiedene Komponenten wie UV-Strahlung, RONS und elektrischer Strom spielen eine Rolle (Bernhardt et al., 2019). Es wird deutlich, dass es vor allem im Hinblick auf die Begründung der Toxizität des Plasmas noch weiterer Studien bedarf. Es konnte gezeigt werden, dass die Bildung von Wasserstoffperoxid zu der CAP-induzierten Toxizität beiträgt. Daneben haben jedoch noch weitere Faktoren einen Einfluss auf die Zellviabilität. Die Korrelation zwischen der Entstehung von RONS und der Behandlungsdauer und -frequenz ermöglicht eine Grundlage, um die Behandlungseinstellungen der DBD zu definieren. Für die Übertragbarkeit in die klinische Anwendung sind jedoch weitere Studien notwendig.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

- ARJUNAN, K. P., FRIEDMAN, G., FRIDMAN, A. & CLYNE, A. M. 2011. Non-thermal dielectric barrier discharge plasma induces angiogenesis through reactive oxygen species. *Journal of The Royal Society Interface*, 9, 147-157.
- AUMÜLLER, G. 2007. *Duale Reihe - Anatomie*, Georg Thieme Verlag KG.
- BALZER, J. 2016. Effects of non-thermal atmospheric pressure plasma on the physiology of human dermal cells. In: SURGERY, H.-H.-U. D. S. D. O. T. A. H. (ed.).
- BALZER, J., HEUER, K., DEMIR, E., HOFFMANN, M. A., BALDUS, S., FUCHS, P. C., AWAKOWICZ, P., SUSCHEK, C. V. & OPLANDER, C. 2015. Non-Thermal Dielectric Barrier Discharge (DBD) Effects on Proliferation and Differentiation of Human Fibroblasts Are Primary Mediated by Hydrogen Peroxide. *PLoS One*, 10, e0144968.
- BAUM, C. L. & ARPEY, C. J. 2005. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatol Surg*, 31, 674-86; discussion 686.
- BECKER, S., ZIMMERMANN, J. L., BAUMEISTER, P., BRUNNER, T. F., SHIMIZU, T., LI, Y. F., MORFILL, G. E., HARREUS, U. & WELZ, C. 2019. Effects of cold atmospheric plasma (CAP) on bacteria and mucosa of the upper aerodigestive tract. *Auris Nasus Larynx*, 46, 294-301.
- BEKESCHUS, S., SCHMIDT, A., WELTMANN, K. D. & VON WOEDTKE, T. 2016. The plasma jet kINPen - A powerful tool for wound healing. *Clinical Plasma Medicine*, 4, 19-28.
- BENTKOVER, S. H. 2012. Plasma skin resurfacing: personal experience and long-term results. *Facial Plast Surg Clin North Am*, 20, 145-62, v-vi.
- BERNHARDT, T., SEMMLER, M. L., SCHAFFER, M., BEKESCHUS, S., EMMERT, S. & BOECKMANN, L. 2019. Plasma Medicine: Applications of Cold Atmospheric Pressure Plasma in Dermatology. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 3873928.
- BINGÖL, A. 2014. *BASICS Plastische und ästhetische Chirurgie*, Urban & Fischer in Elsevier.
- BREDT, D. S., HWANG, P. M., GLATT, C. E., LOWENSTEIN, C., REED, R. R. & SNYDER, S. H. 1991. Cloned and Expressed Nitric-Oxide Synthase Structurally Resembles Cytochrome-P-450 Reductase. *Nature*, 351, 714-718.
- BREDT, D. S., HWANG, P. M. & SNYDER, S. H. 1990. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*, 347, 768-70.
- BREHMER, F., HAENSSLE, H. A., DAESCHLEIN, G., AHMED, R., PFEIFFER, S., GORLITZ, A., SIMON, D., SCHON, M. P., WANDKE, D. & EMMERT, S. 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, 148-55.
- BROUGHTON, G., JANIS, J. E. & ATTINGER, C. E. 2006. Wound healing: An overview. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 117, 294s-294s.
- BRUCH-GERHARZ, D., SCHNORR, O., SUSCHEK, C., BECK, K. F., PFEILSCHIFTER, J., RUZICKA, T. & KOLB-BACHOFEN, V. 2003. Arginase 1 overexpression in psoriasis - Limitation of inducible nitric oxide synthase activity as a molecular mechanism for keratinocyte hyperproliferation. *American Journal of Pathology*, 162, 203-211.
- CALABRESE, V., BOYD-KIMBALL, D., SCAPAGNINI, G. & BUTTERFIELD, D. A. 2004. Nitric oxide and cellular stress response in brain aging and neurodegenerative disorders: The role of vitagenes. *In Vivo*, 18, 245-267.

- CHUANGSUWANICH, A., ASSADAMONGKOL, T. & BOONYAWAN, D. 2016. The Healing Effect of Low-Temperature Atmospheric-Pressure Plasma in Pressure Ulcer: A Randomized Controlled Trial. *Int J Low Extrem Wounds*, 15, 313-319.
- CROOKES, W. 1883. The Bakerian Lecture; On radiant matter spectroscopy. A new method of spectrum analysis. *Proceedings of the Royal Society of London*, 35, 262-271.
- DAESCHLEIN, G. 2016. Antimikrobielle Wirksamkeit von Plasma. In: H.-R. METELMANN, T. V. W., K.-D. WELTMANN (ed.) *Plasmamedizin*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- DAESCHLEIN, G., NAPP, M., VON PODEWILS, S., LUTZE, S., EMMERT, S., LANGE, A., KLARE, I., HAASE, H., GUMBEL, D., VON WOEDTKE, T. & JUNGER, M. 2014. In Vitro Susceptibility of Multidrug Resistant Skin and Wound Pathogens Against Low Temperature Atmospheric Pressure Plasma Jet (APPJ) and Dielectric Barrier Discharge Plasma (DBD). *Plasma Processes and Polymers*, 11, 175-183.
- DAESCHLEIN, G., SCHOLZ, S., AHMED, R., VON WOEDTKE, T., HAASE, H., NIGGEMEIER, M., KINDEL, E., BRANDENBURG, R., WELTMANN, K. D. & JUENGER, M. 2012. Skin decontamination by low-temperature atmospheric pressure plasma jet and dielectric barrier discharge plasma. *Journal of Hospital Infection*, 81, 177-183.
- DARBY, I. A. & HEWITSON, T. D. 2007. Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. *Int Rev Cytol*, 257, 143-79.
- DARBY, I. A., LAVERDET, B., BONTE, F. & DESMOULIERE, A. 2014. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin Cosmet Investig Dermatol*, 7, 301-11.
- DEJAM, A., KLEINBONGARD, P., RASSAF, T., HAMADA, S., GHARINI, P., RODRIGUEZ, J., FEELISCH, M. & KELM, M. 2003. Thiols enhance NO formation from nitrate photolysis. *Free Radical Biology and Medicine*, 35, 1551-1559.
- DESMOULIERE, A. 1995. Factors influencing myofibroblast differentiation during wound healing and fibrosis. *Cell Biol Int*, 19, 471-6.
- DESMOULIERE, A., CHAPONNIER, C. & GABBIANI, G. 2005. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen*, 13, 7-12.
- DROGE, W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82, 47-95.
- DUBUC, A., MONSARRAT, P., VIRARD, F., MERBAHI, N., SARRETTE, J. P., LAURENCIN-DALICIEUX, S. & COUSTY, S. 2018. Use of cold-atmospheric plasma in oncology: a concise systematic review. *Ther Adv Med Oncol*, 10, 1758835918786475.
- FRIDMAN, G., FRIEDMAN, G., GUTSOL, A., SHEKHTER, A. B., VASILETS, V. N. & FRIDMAN, A. 2008. Applied Plasma Medicine. *Plasma Processes and Polymers*, 5, 503-533.
- GABBIANI, G. 2003. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol*, 200, 500-3.
- GAN, L., DUAN, J., ZHANG, S., LIU, X., POORUN, D., LIU, X., LU, X., DUAN, X., LIU, D. & CHEN, H. 2019. Cold atmospheric plasma ameliorates imiquimod-induced psoriasiform dermatitis in mice by mediating antiproliferative effects. *Free Radic Res*, 53, 269-280.
- GAN, L., ZHANG, S., POORUN, D., LIU, D., LU, X., HE, M., DUAN, X. & CHEN, H. 2018. Medical applications of nonthermal atmospheric pressure plasma in dermatology. *J Dtsch Dermatol Ges*, 16, 7-13.

- GAO, J., WANG, L., XIA, C., YANG, X., CAO, Z., ZHENG, L., KO, R., SHEN, C., YANG, C. & CHENG, C. 2019. Cold atmospheric plasma promotes different types of superficial skin erosion wounds healing. *Int Wound J*.
- GERLING, T. & WELTMANN, K.-D. 2016. Einführung in Atmosphärendruck- Plasmaquellen für plasmamedizinische Anwendungen. In: H.-R. METELMANN, T. V. W., K.-D. WELTMANN (ed.) *Plasmamedizin*. Berlin Heidelberg Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- GRAVES, D. B. 2012. The emerging role of reactive oxygen and nitrogen species in redox biology and some implications for plasma applications to medicine and biology. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 45.
- GUERRERO-PRESTON, R., OGAWA, T., UEMURA, M., SHUMULINSKY, G., VALLE, B. L., PIRINI, F., RAVI, R., SIDRANSKY, D., KEIDAR, M. & TRINK, B. 2014. Cold atmospheric plasma treatment selectively targets head and neck squamous cell carcinoma cells. *Int J Mol Med*, 34, 941-6.
- HAERTEL, B., VON WOEDTKE, T., WELTMANN, K. D. & LINDEQUIST, U. 2014. Non-thermal atmospheric-pressure plasma possible application in wound healing. *Biomol Ther (Seoul)*, 22, 477-90.
- HALLIWELL, B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 141, 312-322.
- HALPRIN, K. M. 1972. Epidermal Turnover Time - Re-Examination. *British Journal of Dermatology*, 86, 14-&.
- HAN, L., PATIL, S., BOEHM, D., MILOSAVLJEVIĆ, V., CULLEN, P. J., BOURKE, P. & DUDLEY, E. G. 2016. Mechanisms of Inactivation by High-Voltage Atmospheric Cold Plasma Differ for Escherichia coli and Staphylococcus aureus. *Applied and Environmental Microbiology*, 82, 450-458.
- HARMAN, D. 1956. Aging - a Theory Based on Free-Radical and Radiation-Chemistry. *Journals of Gerontology*, 11, 298-300.
- HASSE, S., DUONG TRAN, T., HAHN, O., KINDLER, S., METELMANN, H. R., VON WOEDTKE, T. & MASUR, K. 2016. Induction of proliferation of basal epidermal keratinocytes by cold atmospheric-pressure plasma. *Clin Exp Dermatol*, 41, 202-9.
- HEINLIN, J., ISBARY, G., STOLZ, W., MORFILL, G., LANDTHALER, M., SHIMIZU, T., STEFFES, B., NOSENKO, T., ZIMMERMANN, J. & KARRER, S. 2011. Plasma applications in medicine with a special focus on dermatology. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 25, 1-11.
- HEINLIN, J., ISBARY, G., STOLZ, W., ZEMAN, F., LANDTHALER, M., MORFILL, G., SHIMIZU, T., ZIMMERMANN, J. L. & KARRER, S. 2013. A randomized two-sided placebo-controlled study on the efficacy and safety of atmospheric non-thermal argon plasma for pruritus. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 27, 324-31.
- HEINLIN, J., MORFILL, G., LANDTHALER, M., STOLZ, W., ISBARY, G., ZIMMERMANN, J. L., SHIMIZU, T. & KARRER, S. 2010. Plasma medicine: possible applications in dermatology. *J Dtsch Dermatol Ges*, 8, 968-76.
- HEKIMI, S., LAPOINTE, J. & WEN, Y. 2011. Taking a "good" look at free radicals in the aging process. *Trends in Cell Biology*, 21, 569-576.
- HELD, L., METZLER, G. & SCHALLER, M. 2015. Histologische Strukturen der normalen Haut. In: CERRONI, L., GARBE, C., METZE, D., KUTZNER, H. & KERL, H. (eds.) *Histopathologie der Haut*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- HELMKE, A. 2016. Niedertemperaturplasma: Eigenschaften, Wirkungen und

- Gerätetechnik. In: H.-R. METELMANN, T. V. W., K.-D. WELTMANN (ed.) *Plasmamedizin*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- HELMKE, A., WANDKE, D., MAHMOODZADA, M., WELTMANN, K. D. & VIOL, W. 2013. Impact of Electrode Design, Supply Voltage and Interelectrode Distance on Safety Aspects and Characteristics of a Medical DBD Plasma Source. *Contributions to Plasma Physics*, 53, 623-638.
- HEUER, K., HOFFMANN, M. A., DEMIR, E., BALDUS, S., VOLKMAR, C. M., RÖHLE, M., FUCHS, P. C., AWAKOWICZ, P., SUSCHEK, C. V. & OPLÄNDER, C. 2015. The topical use of non-thermal dielectric barrier discharge (DBD): Nitric oxide related effects on human skin. *Nitric Oxide*, 44, 52-60.
- HIROBE, T. 2014. Keratinocytes regulate the function of melanocytes. *Dermatologica Sinica*, 32, 200-204.
- HOFFMANN, C., BERGANZA, C. & ZHANG, J. 2013. Cold Atmospheric Plasma: methods of production and application in dentistry and oncology. *Med Gas Res*, 3, 21.
- ISBARY, G., HEINLIN, J., SHIMIZU, T., ZIMMERMANN, J. L., MORFILL, G., SCHMIDT, H. U., MONETTI, R., STEFFES, B., BUNK, W., LI, Y., KLAEMPFL, T., KARRER, S., LANDTHALER, M. & STOLZ, W. 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, 404-10.
- ISBARY, G., MORFILL, G., SCHMIDT, H. U., GEORGI, M., RAMRATH, K., HEINLIN, J., KARRER, S., LANDTHALER, M., SHIMIZU, T., STEFFES, B., BUNK, W., MONETTI, R., ZIMMERMANN, J. L., POMPL, R. & STOLZ, W. 2010. A first prospective randomized controlled trial to decrease bacterial load using cold atmospheric argon plasma on chronic wounds in patients. *Br J Dermatol*, 163, 78-82.
- ISBARY, G. & SHIMIZU, T. 2016. Plasmabehandlung von Ulzera. In: H.-R. METELMANN, T. V. W., K.-D. WELTMANN (ed.) *Plasmamedizin*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- ISBARY, G., SHIMIZU, T., LI, Y. F., STOLZ, W., THOMAS, H. M., MORFILL, G. E. & ZIMMERMANN, J. L. 2013. Cold atmospheric plasma devices for medical issues. *Expert Rev Med Devices*, 10, 367-77.
- JANSEN, F. 2021. Effects of non-thermal atmospheric pressure plasma on human fibroblasts.
- KALGHATGI, S., FRIEDMAN, G., FRIDMAN, A. & CLYNE, A. M. 2010. Endothelial cell proliferation is enhanced by low dose non-thermal plasma through fibroblast growth factor-2 release. *Ann Biomed Eng*, 38, 748-57.
- KALGHATGI, S., KELLY, C. M., CERCHAR, E., TORABI, B., ALEKSEEV, O., FRIDMAN, A., FRIEDMAN, G. & AZIZKHAN-CLIFFORD, J. 2011. Effects of non-thermal plasma on mammalian cells. *PLoS One*, 6, e16270.
- KALGHATGI, S. U., FRIDMAN, A., FRIEDMAN, G. & CLYNE, A. M. 2009. Cell proliferation following non-thermal plasma is related to reactive oxygen species induced fibroblast growth factor-2 release. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2009, 6030-3.
- KRAMER, A., MATTHES, R., BEKESCHUS, S., BENDER, C., NAPP, M., LADEMANN, O., LADEMANN, J. & WELTMANN, K. D. 2016. Aktueller und perspektivischer Einsatz kalter Plasmen aus hygienischer Indikation. In: H.-R. METELMANN, T. V. W., K.-D. WELTMANN (ed.) *Plasmamedizin*. Berlin Heidelberg Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

- LANCASTER, J. R., JR. 1997. A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. *Nitric Oxide*, 1, 18-30.
- LAPOINTE, J. & HEKIMI, S. 2010. When a theory of aging ages badly. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67, 1-8.
- LAROUSSE, M. & LEIPOLD, F. 2004. Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure. *International Journal of Mass Spectrometry*, 233, 81-86.
- LAWRENCE, W. T. 1998. Physiology of the acute wound. *Clin Plast Surg*, 25, 321-40.
- LENDECKEL, D., EYMANN, C., EMICKE, P., DAESCHLEIN, G., DARM, K., O'NEIL, S., BEULE, A. G., VON WOEDTKE, T., VOLKER, U., WELTMANN, K. D., JUNGER, M., HOSEMANN, W. & SCHARF, C. 2015. Proteomic Changes of Tissue-Tolerable Plasma Treated Airway Epithelial Cells and Their Relation to Wound Healing. *Biomed Research International*.
- LIEW, F. Y. & COX, F. E. G. 1991. Nonspecific Defense-Mechanism - the Role of Nitric-Oxide. *Immunoparasitology Today-a Combined Issue of Immunology Today and Parasitology Today*, A17-A21.
- LIU, D. & LU, X. 2010. Introduction. In: CHU, P. K. & LU, X. (eds.) *Low Temperature Plasma Technology Methods and Applications*. 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300: Taylor & Francis Group.
- LIU, F. X., SUN, P., BAI, N., TIAN, Y., ZHOU, H. X., WEI, S. C., ZHOU, Y. H., ZHANG, J., ZHU, W. D., BECKER, K. & FANG, J. 2010. Inactivation of Bacteria in an Aqueous Environment by a Direct-Current, Cold-Atmospheric-Pressure Air Plasma Microjet. *Plasma Processes and Polymers*, 7, 231-236.
- LLOYD, G., FRIEDMAN, G., JAFRI, S., SCHULTZ, G., FRIDMAN, A. & HARDING, K. 2010. Gas Plasma: Medical Uses and Developments in Wound Care. *Plasma Processes and Polymers*, 7, 194-211.
- M.SELLERS, R. 1990. Spectrophotometric Determination of Hydrogen Peroxide Using Potassium Titanium(IV) Oxalate.
- MAISCH, T., SHIMIZU, T., LI, Y. F., HEINLIN, J., KARRER, S., MORFILL, G. & ZIMMERMANN, J. L. 2012. Decolonisation of MRSA, *S. aureus* and *E. coli* by cold-atmospheric plasma using a porcine skin model in vitro. *PLoS One*, 7, e34610.
- MASHAYEKH, S., RAJAEI, H., AKHLAGHI, M., SHOKRI, B. & HASSAN, Z. M. 2015. Atmospheric-pressure plasma jet characterization and applications on melanoma cancer treatment (B/16-F10). *Physics of Plasmas*, 22.
- METELMANN, H.-R., VU, T. T., DO, H. T., LE, T. N. B., HOANG, T. H. A., PHI, T. T. T., LUONG, T. M. L., DOAN, V. T., NGUYEN, T. T. H., NGUYEN, T. H. M., NGUYEN, T. L., LE, D. Q., LE, T. K. X., VON WOEDTKE, T., BUSSIAHN, R., WELTMANN, K.-D., KHALILI, R. & PODMELLE, F. 2013. Scar formation of laser skin lesions after cold atmospheric pressure plasma (CAP) treatment: A clinical long term observation. *Clinical Plasma Medicine*, 1, 30-35.
- METELMANN, H. R., VON WOEDTKE, T. & WELTMANN, K. D. 2016. *Plasmamedizin*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- METELMANN, H. R., VON WOEDTKE, T., WELTMANN, K. D., RUTKOWSKI, R., HAMMES, S. & PODMELLE, F. 2018. Ästhetische Plasmamedizin. *Energie für die Haut*. Gerd Kautz Hautarztpraxis Konz, Germany © Springer-Verlag GmbH Deutschland, ein Teil von Springer Nature 2018.

- MIKKELSEN, R. B. & WARDMAN, P. 2003. Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene*, 22, 5734-5754.
- MORRISON, J. A. & LAGOW, R. J. 1977. Radiofrequency Plasma as a Synthetic Method - Preparation of Tris(Trifluoromethyl)Bismuth. *Inorganic Chemistry*, 16, 1823-1824.
- MOWBRAY, M., TAN, X. J., WHEATLEY, P. S., ROSSI, A. G., MORRIS, R. E. & WELLER, R. B. 2008. Topically applied nitric oxide induces T-lymphocyte infiltration in human skin, but minimal inflammation (vol 128, pg 352, 2008). *Journal of Investigative Dermatology*, 128, 2546-2546.
- NATHAN, C. & DING, A. H. 2010. Nonresolving Inflammation. *Cell*, 140, 871-882.
- NATHAN, C. & XIE, Q. W. 1994. Nitric-Oxide Synthases - Roles, Tolls, and Controls. *Cell*, 78, 915-918.
- NGUYEN, L., LU, P., BOEHM, D., BOURKE, P., GILMORE, B. F., HICKOK, N. J. & FREEMAN, T. A. 2018. Cold atmospheric plasma is a viable solution for treating orthopedic infection: a review. *Biol Chem*, 400, 77-86.
- OEHMIGEN, K., HÄHNEL, M., BRANDENBURG, R., WILKE, C., WELTMANN, K. D. & VON WOEDTKE, T. 2010. The Role of Acidification for Antimicrobial Activity of Atmospheric Pressure Plasma in Liquids. *Plasma Processes and Polymers*, 7, 250-257.
- QUEVEDO, W. C., JR. & FLEISCHMANN, R. D. 1980. Developmental biology of mammalian melanocytes. *J Invest Dermatol*, 75, 116-20.
- RACHMILEWITZ, D., STAMLER, J. S., BACHWICH, D., KARMELI, F., ACKERMAN, Z. & PODOLSKY, D. K. 1995. Enhanced colonic nitric oxide generation and nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut*, 36, 718-23.
- RAUSCHER, H., KYLIAN, O., BENEDIKT, J., VON KEUDELL, A. & ROSSI, F. 2010. Elimination of biological contaminations from surfaces by plasma discharges: chemical sputtering. *Chemphyschem*, 11, 1382-9.
- RISTOW, M. & SCHMEISSER, S. 2011. Extending life span by increasing oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 51, 327-336.
- SCHLAG, S., NERZ, C., BIRKENSTOCK, T. A., ALTENBEREND, F. & GOTZ, F. 2007. Inhibition of staphylococcal biofilm formation by nitrite. *Journal of Bacteriology*, 189, 7911-7919.
- SCHLOSSMANN, J., FEIL, R. & HOFMANN, F. 2003. Signaling through NO and cGMP-dependent protein kinases. *Annals of Medicine*, 35, 21-27.
- SCHMIDT, A., DIETRICH, S., STEUER, A., WELTMANN, K. D., VON WOEDTKE, T., MASUR, K. & WENDE, K. 2015. Non-thermal Plasma Activates Human Keratinocytes by Stimulation of Antioxidant and Phase II Pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 290, 6731-6750.
- SCHMIDT, R., LANG, F. & HECKMANN, M. 2010. *Physiologie des Menschen*, Heidelberg: Springer.
- SCHNEIDER, C. A., RASBAND, W. S. & ELICEIRI, K. W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9, 671-675.
- SCHÖNEBECK, R. & WANDKE, D. 2016. Plasmamedizingeräte auf dem deutschen Markt. In: H.-R. METELMANN, T. V. W., K.-D. WELTMANN (ed.) *Plasmamedizin*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- SHI, X. M., XU, G. M., ZHANG, G. J., LIU, J. R., WU, Y. M., GAO, L. G., YANG, Y., CHANG, Z. S. & YAO, C. W. 2018. Low-temperature Plasma Promotes Fibroblast Proliferation in

- Wound Healing by ROS-activated NF-kappaB Signaling Pathway. *Curr Med Sci*, 38, 107-114.
- SHIN, D. & MINN, K. W. 2004. The effect of myofibroblast on contracture of hypertrophic scar. *Plast Reconstr Surg*, 113, 633-40.
- SINGER, A. J. & CLARK, R. A. 1999. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*, 341, 738-46.
- SONEJA, A., DREWS, M. & MALINSKI, T. 2005. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. *Pharmacological Reports*, 57, 108-119.
- SONG, H. P., KIM, B., CHOE, J. H., JUNG, S., MOON, S. Y., CHOE, W. & JO, C. 2009. Evaluation of atmospheric pressure plasma to improve the safety of sliced cheese and ham inoculated by 3-strain cocktail *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol*, 26, 432-6.
- STAPELMANN, K., FIEBRANDT, M., RAGUSE, M., AWAKOWICZ, P., REITZ, G. & MOELLER, R. 2013. Utilization of low-pressure plasma to inactivate bacterial spores on stainless steel screws. *Astrobiology*, 13, 597-606.
- SUNG, H., FERLAY, J., SIEGEL, R. L., LAVERSANNE, M., SOERJOMATARAM, I., JEMAL, A. & BRAY, F. 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 71, 209-249.
- SUSCHEK, C. V., OPLANDER, C. & VAN FAASSEN, E. E. 2010. Non-enzymatic NO production in human skin: Effect of UVA on cutaneous NO stores. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry*, 22, 120-135.
- SUSCHEK, C. V., SCHEWE, T., SIES, H. & KRONCKE, K. D. 2006. Nitrite, a naturally occurring precursor of nitric oxide that acts like a 'prodrug'. *Biological Chemistry*, 387, 499-506.
- TENDERO, C., TIXIER, C., TRISTANT, P., DESMAISON, J. & LEPRINCE, P. 2006. Atmospheric pressure plasmas: A review. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 61, 2-30.
- THOMAS, D. D., RIDNOUR, L. A., ISENBERG, J. S., FLORES-SANTANA, W., SWITZER, C. H., DONZELLI, S., HUSSAIN, P., VECOLI, C., PAOLOCCI, N., AMBS, S., COLTON, C. A., HARRIS, C. C., ROBERTS, D. D. & WINK, D. A. 2008. The chemical biology of nitric oxide: Implications in cellular signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, 45, 18-31.
- TIEDE, R. & EMMERT, S. 2016. Plasmabehandlung von Wunden. In: H.-R. METELMANN, T. V. W., K.-D. WELTMANN (ed.) *Plasmamedizin*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- TOBIN, D. J. 2006. Biochemistry of human skin - our brain on the outside. *Chemical Society Reviews*, 35, 52-67.
- VAN DER PAAL, J., VERHEYEN, C., NEYTS, E. C. & BOGAERTS, A. 2017. Hampering Effect of Cholesterol on the Permeation of Reactive Oxygen Species through Phospholipids Bilayer: Possible Explanation for Plasma Cancer Selectivity. *Sci Rep*, 7, 39526.
- VON WOEDTKE, T., HAERTEL, B., WELTMANN, K. D. & LINDEQUIST, U. 2013. Plasma pharmacy - physical plasma in pharmaceutical applications. *Pharmazie*, 68, 492-498.
- VON WOEDTKE, T., SCHMIDT, A., BEKESCHUS, S. & WENDE, K. 2016. Wissenschaftliche Grundlagen, Stand und Perspektiven der

- Plasmamedizin. In: H.-R. METELMANN, T. V. W., K.-D. WELTMANN (ed.) *Plasmamedizin*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- WANG, X. F., FANG, Q. Q., JIA, B., HU, Y. Y., WANG, Z. C., YAN, K. P., YIN, S. Y., LIU, Z. & TAN, W. Q. 2020. Potential effect of non-thermal plasma for the inhibition of scar formation: a preliminary report. *Sci Rep*, 10, 1064.
- WELLER, R., PATTULLO, S., SMITH, L., GOLDEN, M., ORMEROD, A. & BENJAMIN, N. 1996. Nitric oxide is generated on the skin surface by reduction of sweat nitrate. *J Invest Dermatol*, 107, 327-31.
- WENDE, K., REUTER, S., VON WOEDTKE, T., WELTMANN, K. D. & MASUR, K. 2014. Redox-Based Assay for Assessment of Biological Impact of Plasma Treatment. *Plasma Processes and Polymers*, 11, 655-663.
- WERNER, S. & GROSE, R. 2003. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev*, 83, 835-70.
- YAN, D., SHERMAN, J. H. & KEIDAR, M. 2017. Cold atmospheric plasma, a novel promising anti-cancer treatment modality. *Oncotarget*, 8, 15977-15995.
- ZEMKE, A. C., SHIVA, S., BURNS, J. L., MOSKOWITZ, S. M., PILEWSKI, J. M., GLADWIN, M. T. & BOMBERGER, J. M. 2014. Nitrite modulates bacterial antibiotic susceptibility and biofilm formation in association with airway epithelial cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 77, 307-316.
- ZIUZINA, D., PATIL, S., CULLEN, P. J., KEENER, K. M. & BOURKE, P. 2013. Atmospheric cold plasma inactivation of *Escherichia coli* in liquid media inside a sealed package. *J Appl Microbiol*, 114, 778-87.