Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie der

Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Leiter: Univ.-Prof. Dr. Windolf

Die Auswirkungen von kaltem, atmosphärischem Plasma auf die Durchblutung

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der

Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

von Michael Wurth

2023

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

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

Zusammenfassung

Chronische Wunden, stellen vor allem im Rahmen zunehmender, zivilisatorischer Erkrankungen, wie die pAVK oder der Diabetes mellitus, ein großes Problem für die Betroffenen dar, welche mit einer deutlichen Reduktion der Lebensqualität einhergeht. Des Weiteren sind sie auch eine enorme Belastung für die Ressourcen unseres Gesundheitssystems. Neue Behandlungsmethoden, welche einfach, kostengünstig und effektiv sind, sind daher aktuell notwendiger denn je. Eine alternativeTherapieoption, wäre die Anwendung von kaltem, atmosphärischem Plasma, welchesein ionisiertes und elektrisch leitendes Gas darstellt und bei Raumtemperatur erzeugtwerden kann und reaktive Sauerstoffspezies und Stickstoffmonoxid und dessen Derivate produzieren kann. Diese wiederum sind wichtige Mediatoren bei Wundheilungsprozessen und nehmen Einfluss auf die Durchblutung und Immunreaktionen. Diese Arbeit beschäftigt sich vorrangig damit, ob Einflüsse auf die Durchblutung durch Anwendung direkten, kalten Plasmas vorhanden sind und ob diese durch verschiedene Einflussfaktoren wie Feuchtigkeit der Haut, erzeugte UV-Strahlung, (welche bei Plasmagenerierung anfällt) Anwendungsdauer der Plasmabehandlung oder durch Druck auf die Behandlungsstelle beeinflusst werden kann. Hierbei wurde eine direkte, atmosphärische DBD (dielectric-barrier-discharge) Plasmaquelle verwendet, welche über ein Handgerät verfügt, welches das Plasma direkt auf die Behandlungsstelle bringen kann. Die Durchblutungsparameter wie die relative Sauerstoffsättigung, relative Hämoglobinmenge, relativer Blutfluss und Blutflussgeschwindigkeit wurde durch Laser-Doppel-Spektroskopie in oberflächlichen und tiefen Hautschichten an derBehandlungsstelle erfasst. Hierfür wurde ein O2C-Gerät der Firma „LEA-Medizin- Technik-Gießen“ verwendet, welche die Parameter durch Auflegen einer fiberoptischen Glassonde direkt erfassen kann. Insgesamt wurden 24 Probanden einer Plasmabehandlung unterzogen, aufgeteilt auf verschiedene Behandlungszeiten. Die Durchblutungsparameter wurden unter standardisieren Bedingungen erfasst, um Störfaktoren möglich gering zu halten. Es wurden mehrere Referenzmessungen vor der Behandlung durchgeführt und unmittelbar nach der Plasmabehandlung in regelmäßigen zeitlichen Abständen die Parameter protokolliert. In meiner Arbeit konnte kein signifikanter Effekt auf die Durchblutung, sowohl in

oberflächlichen, als auch in tieferen Hautschichten nachgewiesen werden. Auch eine Erhöhung der Behandlungszeit auf 360s änderte daran nichts. Mögliche effektsteigernde oder effektsenkende Einflüsse, wie die Feuchtigkeit der Haut, oder UV-Strahlung nahmen ebenfalls keinen signifikanten Einfluss darauf.

Abstract

Chronic wounds, especially in the context of increasing civilizational diseases, such as PAD or diabetes mellitus, represent a major problem for those affected, which is accompanied by a significant reduction in quality of life. Furthermore, they are also an enormous burden on the resources of our health system. New treatment methods that are simple, cost-effective and effective are therefore currently more necessary than ever. An alternative therapy option would be the application of cold, atmospheric plasma, which is an ionized and electrically conductive gas and can be generated at room temperature and can produce reactive oxygen species and nitric oxide and its derivatives. These in turn are important mediators in wound healing processes and influence blood circulation and immune reactions. This thesis is primarily concerned with whether influences on blood circulation are present through the application of direct, cold plasma and whether this can be influenced by various influencing factors such as moisture of the skin, UV radiation generated, (which occurs during plasma generation) application period of the plasma treatment, or pressure generated by the handheld device on the treatment site. A direct, atmospheric DBD (dielectric-barrier-discharge) plasma source was used, which has a handheld device that can deliver the plasma directly to the treatment site.The blood flow parameters such as relative oxygen saturation, relative hemoglobin amount, relative blood flow and blood flow velocity were recorded by laser double spectroscopy in superficial and deep skin layers at the treatment site. For this purpose, an O2C device from the company "LEA-Medizin-Technik-Gießen" was used, which can directly record the parameters by placing a fiber-optic glass probe. A total of 24 subjects underwent plasma treatment, divided into different treatment times. The blood flow parameters were recorded under standardized conditions in order to keep disturbing factors as low as possible. Several reference measurements were carried out before the treatment and the parameters were logged at regular intervals immediately after the plasma treatment. In my work, no significant effect on blood circulation could be detected, both in superficial and deeper skin layers. Even increasing the treatment time to 360s did not change this.Possible effect-enhancing or effect-reducing influences, such as the moisture of the skin, or UV radiation also had no significant influence on this.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ca2+	Calcium
cm	Zentimeter
CVI	chronische venöse Insuffizienz
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DBD	Dielectric barrier discharge
DM	Diabetes mellitus
ect.	etcetera
EGF	Epidermal Growth Factor
eNOS	endotheliale NO-Synthase
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Hour (Stunde)
Hb	Hämoglobin
H2O	Wasser
H2O2	Wasserstoffperoxid
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
m	Meter
m2	Quadratmeter
Mg2+	Magnesium
mg	Milligramm
min	Minute
M	Mol
mm	Millimeter
mM	Millimol
NaCl	Natriumchlorid
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NO2	-Nitrit
NO3	Nitrat
NOD	NO-Derivate
NOO-	Peroxynitrit

NOS	NO-Synthase
O2	Sauerstoff
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphat buffered Solution
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RNOS	Reaktive Stickstoffspezies
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
TNF	Tumornekrosefaktor
TUNEL	Terminal Transferase mediated dUTP Nick End Labeling
UV	Ultraviolett
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
z.B.	Zum Beispiel
µm	Mikrometer
µM	Mikromol
°C	Grad Celsius

Abbildungsverzeichnis

1. Modifizierte Abbildung über den Aufbau der Hautschichten -09-
2. Abbildung eines PlasmaDerma Flex 9060 der Firma Cinogy -10-
3. Schematische Darstellung der Messung mit einem O2C Gerät -21-
4. Mittlere Blutflusswerte nach Druckbehandlung -27-
5. Mittlere Sauerstoffsättigungswerte nach Druckbehandlung -29-
6. Mittlere Blutflussgeschwindigkeit nach Druckbehandlung -30-
7. Mittlere relative Hb-Sättigung nach Druckbehandlung -32-
8. Mittlere Blutflusswerte nach Trockenbehandlung -33-
9. Mittlere Sauerstoffsättigungswerte nach Trockenbehandlung -35-
10. Mittlere Blutflussgeschwindigkeit nach Trockenbehandlung -37-
11. Mittlere relative Hb-Sättigung nach Trockenbehandlung -38-
12. Mittlere Blutflusswerte nach Feuchtbehandlung -40-
13. Mittlere Sauerstoffsättigungswerte nach Feuchtbehandlung -41-
14. Mittlere Blutflussgeschwindigkeit nach Feuchtbehandlung -42-
15. Mittlere relative Hb-Sättigung nach Feuchtbehandlung -43-
16. Mittlere Blutflusswerte nach Folienbehandlung -45-
17. Mittlere Sauerstoffsättigungswerte nach Folienbehandlung -46-
18. Mittlere Blutflussgeschwindigkeit nach Folienbehandlung -47-
19. Mittlere relative Hb-Sättigung nach Folienbehandlung -48-
20. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der TUNEL Färbung -49-

Tabellenverzeichnis

1. Gegenüberstellung der verschiedenen Kaltplasmaquellen -09-
2. Aufführung verwendeter Laborgeräte -14-
3. Aufführung verwendeter Software -15-
4. Aufführung von Verbrauchsmaterialien -16-
5. Aufführung von Chemikalien und Lösungen -18-
6. Besp. von Beziehungen und Verhältnisse der Durchblutungsparameter -22-
7. Protokoll zur TUNEL-Färbung nach erfolgter Entparaffinierung -25-
8. Werte der UV-A und UV-B Strahlung in mW/cm². Jeweils ohne Folie, sowie mit eingespannter Folie, mit und ohne Faltenwurf -44-
9. Mittelwerte der Apoptoseraten -49-

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung -I-
Abstract -III-
Abkürzungsverzeichnis -IV-
Abbildungsverzeichnis -VI-
Tabellenverzeichnis -VII-
1. Einleitung -1-
1.1. Die Haut und ihre Schichten -1-
1.2. Die Wundheilung -2-
1.2.1. Die Phasen der Wundheilung -3-
1.2.2. Die chronische Wunde -4-
1.2.3. Stickstoffmonoxid und dessen Einfluss auf die Wundheilung -5-
1.3. Physikalisches Plasma und dessen Eigenschaften -7-
1.3.1. Plasmaquellen -8-
1.3.2. Entwicklungsgeschichte der DBD -11-
1.3.3. Effekte und Anwendungsbereiche von Plasma -11-
2. Ziele der Arbeit -13-
3. Material und Methoden -14-
3.1. Material -14-
3.1.1. Laborgeräte -14-
3.1.2. Software -15-
3.1.3. Verbrauchsmaterialien -16-
3.1.4. Chemikalien und Lösungen -17-
3.2. Methoden -19-
3.2.1. Durchführung der Probandenstudie -19-
3.2.2. Bestimmung der Durchblutungsparameter -20-
3.2.3. Messprotokolle -23-
3.2.3.1. Erster Teil des Messprotokolls: Druckkontrolle -23-
3.2.3.2. Zweiter Teil des Messprotokolls: Trockenbehandlung -23-
3.2.3.3. Dritter Teil des Messprotokolls: Feuchtbehandlung -24-
3.2.3.4. Vierter Teil des Messprotokolls: Folienbehandlung -24-
3.2.4. Bestimmung der Apoptoserate/Toxizitätstest -24-
3.2.5. Statistische Methoden -24-

4. Ergebnisse -25-
4.1. Auswirkung des Plasmaderm auf die Durchblutung -25-
4.1.1. Druckbehandlung -25-
4.1.1.1. Blutflusswerte -25-
4.1.1.2. Saustoffsättigung -29-
4.1.1.3. Blutflussgeschwindigkeit -30-
4.1.1.4. Relative Hb-Sättigung -32-
4.1.2. Trockenbehandlung -33-
4.1.2.1. Blutflusswerte -33-
4.1.2.2. Sauerstoffsättigung -35-
4.1.2.3. Blutflussgeschwindigkeit -37-
4.1.2.4. Relative Hb-Sättigung -38-
4.1.3. Feuchtbehandlung -40-
4.1.3.1. Blutflusswerte -40-
4.1.3.2. Sauerstoffsättigung -41-
4.1.3.3. Blutflussgeschwindigkeit -42-
4.1.3.4. Relative Hb-Sättigung -43-
4.1.4. Folienbehandlung -44-
4.1.4.1. Bestimmung des Effektes der UV-Reduktion -44-
4.1.4.2. Blutflusswerte -45-
4.1.4.3. Sauerstoffsättigung -46-
4.1.4.4. Blutflussgeschwindigkeit -47-
4.1.4.5. Relative Hb-Sättigung -48-
5. Diskussion -50-
5.1. Durchblutungssteig. Effekte in oberfl. und tiefen Hautschichten -50-
5.2. Sauerstoffsättigung in oberflächlichen und tiefen Hautschichten -52-
5.3. UV-Strahlungseffekte auf die Durchblutung und Oxygenierung -53-
5.4. Feuchtigkeitsvermittelte Effekte auf die Durchblutung und Oxygenierung -53-
5.5. Sind toxische Effekte durch eine Plasmabehandlung vorhanden
Literaturverzeichnis -55-
Danksagung -60-

1 Einleitung

1.1 Die Haut und ihre Schichten

Die Haut ist das größte Organ des menschlichen Körpers. Sie umfasst je nach Körpergröße eine Fläche von bis zu 2 m² und dient vor allem als Schutzbarriere vor schädlichen, äußeren Einflüssen. Zudem ist sie zugleich Sinnesorgan, welches mechanische oder thermische Reize übermittelt und ist wichtig für die Thermoregulation des gesamten Körpers.

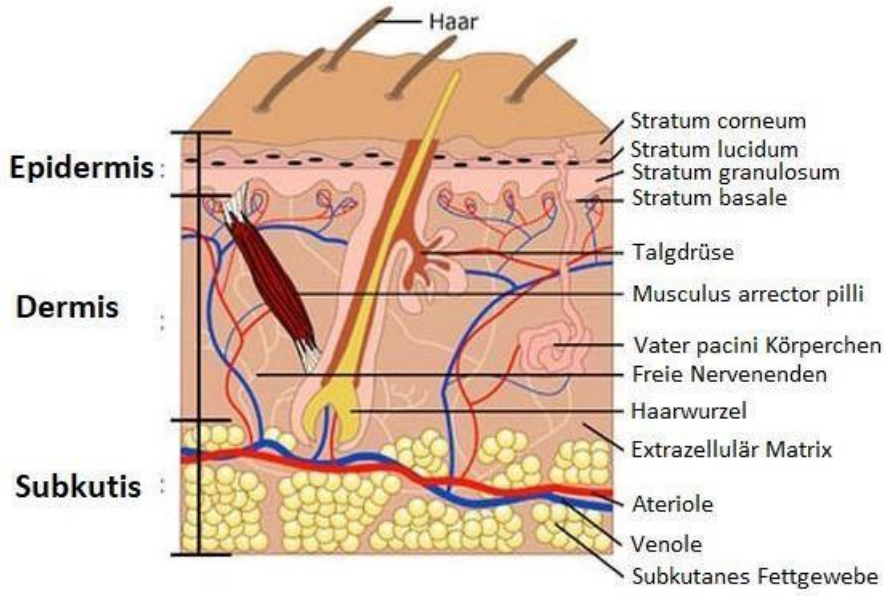


Abb. 1: Modifizierte Abbildung über den Aufbau der Hautschichten (entnommen von Cicatrix e.V.)

Die Hautdecke besteht zum einen aus der Kutis (Haut) und der Subkutis (Unterhaut). Die Kutis wiederum, setzt sich aus der obersten Schicht der Epidermis und der darunter liegenden Dermis zusammen. Die Epidermis kann in unterschiedliche Schichten eingeteilt werden, welche jeweils ein Differenzierungsschritt darstellen. Hierbei kann beginnend von basal nach oberflächlich zwischen Stratum basale (Basalzellschicht), Stratum spinosum (Stachelzellschicht), Stratum granulosum (Körnerschicht), und Stratum corneum (Hornschicht) unterteilt werden.

Die Epidermis hat eine Dicke von 0,05mm bis 0,1mm und besteht aus einem mehrschichtig, verhornten Plattenepithel, welches durch Keratinozyten im Stratum basale gebildet wird und bis zur Oberfläche die verschiedenen Differenzierungsschritte durchlaufen. Das Plattenepithel dient vor allem dem Schutz vor chemischen und mechanischen Einflüssen, zudem ist es eine wasserdichte Abdeckung. Weitere Zellen, welche in der Epidermis zu finden sind, sind die Melanozyten, welche die Pigmentierung der Haut hervorrufen. Das von ihnen gebildete Melanin absorbiert UV-Strahlung und bietet dadurch Schutz. Ein weiterer Zelltyp, der sich in der Epidermis befindet, sind die Langerhans-Zellen. Diese immunkompetenten Zellen, verfügen über lange dendritische Ausläufer, mit denen sie den T-Zellen Antigene präsentieren können. Sie sind somit entscheidend für die Immunantwort gegen kutan eindringende Antigene. In der Epidermis sind keine Blutgefäße zu finden, sie wird ausschließlich aus Kapillaren versorgt.

Die Dermis ist der darunterliegende, blutführende, bindegewebige Anteil der Kutis. Diese besteht aus der papillären Dermis, wovon jede Papille Kapillaren und Venolen führt und damit wesentlich für die Versorgung der Epidermis ist. Zudem beinhalten die Papillen ein dichtes Netz aus freien Nervenendigungen zur Vermittlung von Juck- und Schmerzreiz. Die retikuläre Dermis ist durch die verschiedenen, maschenhaft verlaufenden Fasern (überwiegend Kollagen Typ I) vor allem wichtig für die typischen, mechanischen Eigenschaften der Haut und damit für deren Reißfestigkeit und Dehnbarkeit.

Die Subkutis besteht vor allem aus Fett und straffen Bindegewebe und ist Verbindung zwischen den Faszien des Körpers und der Haut. (Bennighoff, Drenckhahn, Band 2, Anatomie)

1.2 Die Wundheilung

Eine Wunde ist eine Verletzung, beziehungsweise eine Beschädigung von ursprünglich intaktem Gewebe, welches im Falle einer kutanen Wunde, seine Barriere- und damit seine Schutzfunktion verliert. Daher ist es wichtig, dass die körpereigenen Mechanismen, welche für die Wundheilungsprozesse notwendig sind,ohne Störungen ablaufen. Jedoch kann es durch diverse, zivilisatorische Erkrankungen zu Problemen eben genau dieser Heilungsprozesse kommen, insbesondere dann, wenn die Durchblutung des Gewebes gestört ist oder sich die

Wunde infiziert. Dabei kann es zu der Entwicklung von chronischen Wunden kommen, welche mit erheblichen Schmerzen und Leiden für die Betroffenen und mit starken Einschränkungen für die Lebensqualität einhergehen. Erkrankungen wie die pAVK (periphere arterielle Verschlusskrankheit) oder die Folgen eines DM (Diabetes mellitus), sowie eine CVI (chronisch venöse Insuffizienz), stellen hier einen besonderen Risikofaktor dar und verursachen enorme Kosten für das Gesundheitssystem. (Sen, C.K., et al 2009; Janßen H., B.R) Die Entwicklung von unterstützenden, effektiven und kostengünstigen Behandlungsverfahren ist sowohl zur Erhöhung der Lebensqualität von Patienten, als auch zur Dämpfung der Folgekosten für das Gesundheitssystem von großer Relevanz und damit von Interesse gegenwärtiger Forschung.

1.2.1 Die Phasen der Wundheilung

Der Ablauf des Heilungsprozesses einer kutanen Wunde lässt sich, wie folgt, in verschiedenen Phasen unterteilen und wird durch diverse Botenstoffe, wie beispielsweise Zytokine, gesteuert. Zu beachten ist, dass die verschiedenen Phasen nicht strikt getrennt voneinander verlaufen, sondern teilweise in ihrer zeitlichen Abfolge überlappen.

1. Exsudative- / Entzündungsphase

Unmittelbar nach einer Verletzung, kommt es zur Aktivierung der Gerinnungskaskade und zur Vasokonstriktion. Die Permeabilität des betroffenen Areals erhöht sich und durch Botenstoffe wird die Einwanderung von immunkompetenten Zellen vermittelt. (Guo, S. and L.A. Dipietro, 2010)

2. Proliferationsphase

Es kommt zur Immigration von Fibroblasten und Endothelzellen und zur Ausbildung eines stark vaskularisierten Granulationsgewebes. Die eingewanderten Fibroblasten bilden im weiteren Verlauf eine neue extrazelluläre Matrix, insbesondere durch Kollagen und Proteoglykanen. Der Zusammenzug bzw. die Kontraktion des Wundareals, wird primär durch Myofibroblasten hervorgerufen. Diese differenzieren sich aus Fibroblasten, welche durch diverse Zytokine stimuliert worden sind. Myofibroblasten haben kontraktile Eigenschaften und verbinden dadurch das umgebende Gewebe miteinander. (Gosain, A. and L.A. DiPietro, 2004) (Hinz, B., et al, 2001.)

3. Remodelling:

Granulationsgewebe wird zu Narbengewebe umgebaut.

4. Re-Epithelisierung:

Bereits früh, während des Prozesses der Wundheilung, kommt es durch Keratinozyten zur Re-Epithelisierung des defekten Hautareals und im weiteren Verlauf zur abschließenden Wundheilung.

Eine frische, adaptierte Wunde hat zunächst gute Heilungschancen. Problematisch wird es, wenn Abläufe gestört werden und sich eine Wunde chronifiziert.

1.2.2 Die chronische Wunde

Laut einem S3-Leitlinienreport zur Behandlung chronischer Wunden, konnte keine eigenständige Definition herausgestellt werden, ab wann eine Wunde als chronisch zu bezeichnen ist. So wurde der Begriff unterschiedlich aufgefasst, je nach zugrunde liegender Erkrankung und Behandlungsdauer. Als Expertenkonsens galt, dass eine Wunde als ‚chronisch' bezeichnet werden kann, wenn diese bei mehr als 4 bis 12 Wochen konsequenter Behandlung, nicht zu heilen beginnt. (S3 Leilinienreport, Deutsche Gesellschaft für Wundheilung e.V., 2012). Eine Chronifizierung kommt häufig dann zustande, wenn die Wunde aufgrund einer Erkrankung eine gestörte Blutzirkulation aufweist. Dabei stagniert der Heilungsprozess häufig in der exsudativen Phase. (Loots, M.A., et al., 1998) (Greenman, R.L., et al., 2005) Dementsprechend, weisen vor allem Patienten mit Diabetes mellitus, chronischer venöser Insuffizienz oder pAVK eine hohe Chronifizierungsrate auf. (Guo, S. and L.A. Dipietro, 2010). Es existieren zwar bereits Behandlungskonzepte, um chronische Wunden zu therapieren, beispielsweise die Vakuumversiegelungstherapie oder diverse, spezielle Wundauflagen, jedoch kommt es noch häufig als Ultima ratio zur Amputation des betroffenen Areals. (Diener, H., et al., 2010) Allein in Deutschland leiden knapp 2,7 Millionen Menschen an chronischen Wunden und in den nächsten Jahrzehnten wird eine Verdopplung erwartet, bedingt durch die Zunahme an zivilisatorischen Erkrankungen und den demographischen Wandel. Die Kosten belaufen sich gegenwärtig in Deutschland auf über 5 Milliarden Euro pro Jahr. (Köster, I. and D.I. Schubert, 2015) (Karl, T., A. Gussmann, and M. Storck, 2007) Die Betroffenen leiden zudem erheblich an einer deutlich reduzieren Lebensqualität, bedingt durch die

dauerhaften Schmerzen und der Mobilitätseinschränkung. (Augustin, M., et al., 2010) Die Entwicklung einer effektiven und kostengünstigen Behandlungsmethode ist daher aktuell Gegenstand der wissenschaftlichen Forschung. Die Plasmamedizin wäre vor diesen Hintergrund ein vielversprechendes, zukunftsträchtiges Feld, welches in der Lage wäre, genau diese Anforderungen zu erfüllen. (von Woedtke et al., 2013)

Es existieren bereits einzelne Quellen auf dem Medizinproduktemarkt, die zur Wundheilung und Reduktion des Keimbefalls eingesetzt werden, wie beispielsweise der kINPen® MED von neoplas tools GmbH in Greifswald, (Bekeschus et al., 2014) (Haertel et al., 2014) (Isbary et al., 2013) sowie der Plasma ONE von Plasma MEDICAL SYSTEMS® GmbH in Bad Ems oder aber der PlasmaDerm® vonCINOGY GmbH in Duderstadt, welcher in dieser Arbeit als Plasmaquelle verwendet wurde. (Brehmer et al., 2015; Emmert et al., 2013)

1.2.3 Stickstoffmonoxid und dessen Einfluss auf die Wundheilung

NO (Stickstoffmonoxid) ist ein freies Radikal mit einem ungepaarten Elektron, welches aufgrund seiner geringen Masse und hydrophoben Eigenschaften mit Leichtigkeit durch die Zellmembranen diffundieren kann, um seine Wirkungen zu entfalten und besitzt in biologischen Medien nur eine sehr kurze Halbwertszeit. Bis vor Kurzem wurde eine räumlich und zeitlich sehr begrenzte biologische Wirksamkeit von NO angenommen (Liao et al., 1999). Studien deuten jedoch auf die Existenz eines zirkulierenden NO-Speichers im Blut hin, indem NO in Form stabiler Derivate transportiert und systemisch wirksam gemacht wird. (Rassaf et al., 2002a, 2002b; Stamler et al., 1992) So könnten zum Beispiel S-Nitriothiol Gruppen, welche durch Nitrisolierung von an Cystein gebundenen Thiolgruppen entstehen, die Halbwertszeit von NO deutlich erhöhten und als NO-Donatoren fungieren, welche unabhängig von der NO-Synthetaserate die Bioverfügbarkeit steigern. (Foster, M.W., T.J. McMahon, and J.S. Stamler, 2003)

Im menschlichen Körper wird jedoch das Molekül im Wesentlichen durch die NO-Synthetasen gebildet, von denen drei Isoformen existieren. (Weller, 2003). Das im vaskulären Endothelium, durch die endotheliale NO-Synthetase (eNOS) gebildete NO, diffundiert sowohl in die Gefäßwand, als auch in das Gefäßlumen und ist u. a. an der Regulation der Thrombozytenadhäsion und Thrombozytenaggregation, sowie an der Steuerung der initiierenden Schritte der Entzündung beteiligt (He et al., 1997; Jung

et al., 1998). In erster Linie ist NO jedoch für der Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase verantwortlich (Furchgott and Vanhoutte, 1989), dem zentralen Enzym der Gefäßrelaxation und somit für die Blutdruckregulation, sowie die Gewebsdurchblutung von äußerster Wichtigkeit. Das endothelial gebildete NO, hat jedoch auch eine essenzielle Bedeutung, bei der Aufrechterhaltung der Gefäßfunktion, sowie der Gefäßstruktur (Kelm and Schrader, 1990). Eine endotheliale Dysfunktion ist unter anderem durch eine verminderte NO-Syntheserate charakterisiert und somit durch eine verminderte NO-Verfügbarkeit. In den häufig schlecht heilenden Wunden, von an DM erkrankten Patienten, konnte beispielsweise ein Mangel an NO-Derivaten festgestellt werden. (Luo, J.D., et al., 2004) Dies wiederrum bestärkt die Resultate einiger Studien, welche NO als einen wichtigen Mediator und Regulator in der Wundheilung indentifizieren konnten (Broughton et al., 2006; Frank et al., 2002). Besonders eindrücklich konnte dies bei einem Experiment mit Knockout-Mäusen gezeigt werden. Hier wurde die durch inflammatorische Prozesse induzierbare NO-Synthetase (iNOS) inaktiviert und in der Folge eine insuffiziente, verzögerte Wundheilung festgestellt. Nachdem dieses Defizit beseitigt wurde, liefen die Heilungsprozesse deutlich schneller und effektiver ab. (Yamasaki, K., et al., 1998). Ein Grund dafür könnte eine durch NO vermittelte, vermehrte Ausschüttung bzw. Aktivierung von „vascular enodothelial growth factor“ (VEGF) sein, welches die für die Wundheilung sehr wichtige Neoangiogenese stimuliert. (Xiong, M., et al., 1998) Verdeutlicht werden konnte dies an isolierten Fibroblasten aus an DM erkrankten Mäuse, welche signifikant weniger VEGF freisetzen, was wiederum Auswirkung auf die Wundheilung hat. (Lerman, O.Z., et al. 2003) Einen weiteren Einfluss könnte NO auf die Wirksamkeit von Makrophagen in Wunden und damit auf die bakterizide Wirkung haben. Hier gibt es Hinweise, dass unter Verbrauch von NO mehr bakterizides, zytotoxisches Peroxynitrit durch die Makrophagen gebildet werden kann und damit Auswirkung auf die Wundsterilität hat. (Alvarez, M.N., et al, 2011) Des Weiteren scheint NO an der Ausschüttung von Zytokinen maßgeblich beteiligt zu sein. So stimuliert es durch Aktivität der iNOS die Freisetzung von Interleukin 1 (IL-1) in Wunden, welches sich wiederum positiv auf die Rekrutierung von Keratinozyten auswirkt, welche maßgeblich für die Hauterneuerung und damit für den Wundverschluss sind. Zudem wird durch NO das Zytokin Interleukin 8 (IL-8) vermehrt freigesetzt und damit verbundenen die chemotaktisch vermittelte Migration von an der Wundheilung beteiligten Zellen stimuliert. (Villarete, L.H. and D.G. Remick, 1995).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass NO auf vielerlei Weise Einfluss auf das komplexe Zusammenspiel diverser Parameter nimmt, welche entscheidend für eine ungestörte Wundheilung sind. Es beeinflusst die Durchblutung, wirkt antibakteriell und ist in der Lage Biofilme zu zerstören und verschiedenartig Entzündungs- und Wundheilungsprozesse zu meditieren. (Opländer et al., 2009) (Miller et al., 2004).

1.3 Physikalisches Plasma und dessen Eigenschaften

In der Physik wird das Plasma als vierter Aggregatzustand bezeichnet. Hierbei handelt es sich um ein stark ionisiertes, elektrisch leitendes Gas. Durch Zuführung von thermischer Energie erhöht sich das Energieniveau und der Freiheitsgrad (Translation, Vibration, Rotation) der in der Materie befindlichen Partikel und überführtdiese vom festen, über den flüssigen, zum gasförmigen Zustand, welcher durch weitere energetische Zuführung zu den des Plasmas wird. Der allergrößte Teil der im Universum vorkommenden sichtbaren Materie befindet sich im Aggregatzustand des Plasmas. So besteht die Korona der Sonne und die von ihr ausgehenden elektrisch geladenen Partikel, welche als Sonnenwinde bezeichnet werden, aus Plasma. Trifft dieser energiegeladene Strom aus Partikeln in Polkappennähe auf unser Erdmagnetfeld, so finden wir als Plasmaphänomen das Polarlichts, welches durch Anregung von Sauerstoff und Stickstoffatomen in der oberen Erdatmosphäre und deren anschließende Emittierung von Lichtquanten entsteht. (Fridman, 2012). Ein weiteres Beispiel für natürliche vorkommende Plasmazustände in unserer Erdatmosphäre ist der Blitz, welcher durch die elektrische Entladung ein heißes, thermales Plasma erzeugt, und so für unser Auge wahrnehmbar wird (Ebert, 2009). All diese thermalen, heißen Plasmen, welche also mit recht hohen Temperaturen verbunden sind, sind üblicherweise natürlich vorkommende Zustände. Diese müssen unterschieden werden von nicht thermalen, kalten Plasmen, bei denen die Elektronen eine wesentlich höhere Temperatur aufweisen als ihre Umgebung (Moleküle, Ionen, ungeladene Teilchen). Bei thermischen, heißen Plasmen hingegen weisen alle Teilchen die gleiche Temperatur zueinander auf. (Fridman et al., 2005) Dabei setzt sich jedes Plasma, aus verschiedenen Komponenten zusammen, welche je nach Erzeugungsart unterschiedlich gewichtet sind. (Heinlin et al., 2011)

- Ultraviolette Strahlung (UV-A, UV-B, UV.C)
- Reaktive Sauerspezies (O, OH, H2O2, O3)

- Reaktive Stickstoffspezies (NO)
- Geladene Teilchen (Elektronen, Ionen)
- Elektrische Felder
- Thermische Energie

Mittlerweile existieren verschiedene technische Geräte auf dem Markt, welche in der Lage sind die Eigenschaften von thermalen als auch nicht thermalen, kalten Plasma für uns nutzbar zu machen.

1.3.1 Plasmaquellen

Seit Jahrzehnten finden bereits thermale, heiße Plasmen in der Chirurgie Anwendung, wie etwa die Argon-Plasma-Koagulatoren (APC), welche sich auch für endoskopische Eingriffe eignen und ohne Gewebekontakt Tumore abtragen und akute Blutungen stillen können. (Ginsberg et al., 2002). Diese Wirkung beruht vornehmlich auf Proteindenaturierung und Austrocknung. Die Weiterentwicklung der Plasmageräte, welche heutzutage bereits bei niedrigen Temperaturen und unter atmosphärischen Druckbedingungen in der Lage sind, ein Plasma zu generieren, eröffnen mittlerweile auch die Möglichkeit zum Einsatz am lebenden Gewebe, ohne dieses zu schädigen (Daeschlein et al., 2012). Diese niedertemperatur Plasmaquellen kann man im Wesentlichen in drei Arten unterscheiden:

- Indirektes Plasma: Hierbei wird das Plasma an anderer Stelle gezündet und mittels eines Edelgases an die zu behandelnde Stelle gebracht. Dabei wird ein wenige Millimeter dünner Plasma-Jet erzeugt, welcher sich im Gegensatz zu den direkten Plasmaquellen im unterschiedlichen, variablen Abstand zur Behandlungsstelle befinden kann. Durch den Zusammenschluss mehrerer solcher Jets bietet sich die Möglichkeit größere Areale zu behandeln. (Cao et al., 2009; Shimizu et al., 2008)
- Direktes Plasma: Hier handelt es sich im Wesentlichen um „*Dielectrical Barrier Discharge Devices (DBD),* wobei die Haut in diesem Falle als Gegenelektrode fungiert und das Plasma direkt an Ort und Stelle erzeugt wird. Der Abstand zur Haut ist hierbei nicht variabel und beträgt in der Regel wenige Millimeter. So

fließen bei direktem Plasma, neben dem Gas, auch minimale, elektrische Ströme durch die Haut (Fridman et al., 2008; Kuchenbecker et al., 2009)

- Hybrid-Plasma: Hierbei handelt sich um eine Technik, welche die der direkten und indirekten Plasmaerzeugung miteinander verbindet. Sie werden wie direkte Plasmen erzeugt, jedoch fließt auf Grund eines geerdeten Elektroden Netzes kein Strom durch die Haut. (Heinlin et al., 2011).

	Indirektes-Plasma	**Direktes-Plasma**	**Hybrid-Plasma**
Technische Geräte	Plasma-Needel Plasma-Torch	Plasma-Derm	Barrier-coronal discharges
Gasart	Edelgas	Luft	Luft
UV-Strahlung	Hoch	Niedrig	Niedrig
Abstand zum Behandlungsareal	mm bis cm	Ca.1mm	Kann der Oberfläche direkt aufliegen
Plasmadichte	Hoch	Niedrig	Niedrig
Temperatur	-Erzeugungsstelle hoch -Am Behandlungsort niedrig	Raumtemperatur	Raumtemperatur
Reaktive Spezies	Durch Beimischung von Luft und Plasma erzeugt	Im Plasma erzeugt	Hauptsächlich im Plasma erzeugt

Tabelle Nr.1: Gegenüberstellung der verschiedenen Kaltplasmaquellen. Modifiziert nach Heinlein et al., 2011

Die in dieser Arbeit verwendete Plasmaquelle ist der PlasmaDerm Flex 9060 von der Firma Cinogy GmbH in Duderstadt und ist eine neue DBD basierte, direkte Kaltplasmaquelle, welche bei atmosphärischem Druck und normalen Umgebungstemperaturen ein Plasma erzeugt. Sie besteht aus der Control Unit und einer auf die Behandlungsstelle aufzubringenden Elektrode.

Abb.Nr. 2: Abbildung eines PlasmaDerm Flex 9060 Gerätes der Firma Cinogy, Duderstadt. In der oberen linken Hälfte ist die Control-Unit abgebildet. Im unteren Bereich sieht man das Handgerät, an dessen Ende sich die Elektrode befindet, welche während einer Behandlung auf die Haut gedrückt wird. Die Elektrode deckt eine effektive Fläche von 22,5cm² ab.

Diese flexible Elektrode, welche sich am Ende des Handgerätes befindet, sitzt einen Schaumstoffstück auf und passt sich somit den Verlauf der Hautoberfläche durch leichten Druck an. Sie kann nach jeder Behandlung ausgetauscht werden und wird steril verpackt geliefert. (http://www.cinogy.de/_DE/plasmaderm.php)

Kennzeichnend für eine DBD ist das Dielektrikum zwischen Gasraum und Elektrode (Trampert, 2008). So wird eine DBD in der Regel zwischen zwei planaren Elektroden gezündet, welche durch ein oder zwei Dielektrika voneinander getrennt sind. Die Permittivität des gewählten Dielektrikums (üblicherweise Glas Keramik, Quarzglas, Emaillie), welche die Durchlässigkeit eines Stoffes für elektrische Felder charakterisiert, die Dicke des Dielektrikums und die Steilheit des Spannungsanstiegs ,bestimmt die Größe des Verschiebungsstroms. Um einen Stromfluss zwischen den Entladungsspalt fließen zu lassen, muss das elektrische Feld stark genug sein, um eine Entladung hervorzurufen. Man spricht auch von einem „Gasdurchbruch“. Der Entladungsspalt kann eine Größe von weniger als 0,1mm oder einige wenige cm betragen. Um eine Entladung unter atmosphärischen Druckbedingungen zwischen den beiden Elektroden zu zünden, bedarf es je nach Anordnung mehrere hundert bis einige kV. (Kogelschatz, 2003).

1.3.2 Die Entwicklungsgeschichte der Dielectric-Barrier-Discharges

Der Begriff des Plasmas wurde von Irving Langmuir geprägt, da ihn die Zusammensetzung aus Elektrolyten und Molekülen an das des Blutplasmas erinnerte (Fridman, 2012; Langmuir, 1928). Obwohl die Plasmamedizin aktuell im Fokus der medizinischen Forschung steht, so ist das Prinzip der DBD nicht neu und mehr als ein Jahrhundert alt. Erste experimentelle Untersuchungen dieser Art, wurden bereits von Werner von Siemens 1857 vorgenommen, allerdings zielten diese mehr auf die Erzeugung von Ozon ab (Siemens, 1857). Wenige Jahre nach der Veröffentlichung von Siemens, prägten Andrew und Tait den Begriff des „silent discharge“, der stillen Entladung, welcher auch heute noch sehr häufig in englischer, deutscher und französischsprachiger Fachliteratur verwendet wird. (Andrews and Tait, 1860). Vor ungefähr 30 Jahren war die Erzeugung von Ozon das Hautanwendungsgebiet der DBD und fand vor allem Anwendung bei der Wasseraufbereitung in Ozonisatoren. In den 1970er Jahren machte die Plasmaforschung starke Fortschritte und zielte zunächst darauf ab ein besseres Verständnis über das physikalische Plasma und über die Funktionsweise der Ozonisatoren zu erlagen (Kogelschatz, 2003). Durch zunehmende Erkenntnisse vergrößerten sich sehr schnell die Anwendungsmöglichkeiten, so dass am Ende des 20. Jahrhunderts die Plasmaforschung eine der Schlüsseltechnologien in vielen Anwendungsbereichen darstellte, beispielsweise bei der Entwicklung von Energiesparlampen, Behandlung von Polymeren und dadurch Verbesserung von Verpackungsmaterialien und Materialeigenschaften, Microelektronik und Flachbildschirme.(d’Agostino et al., 2005; Bonizzoni and Vassallo, 2002; Suchentrunk et al., 1997).

1.3.3 Effekte und Anwendungsbereiche von Plasma

Der potenzielle Anwendungsbereich der modernen Plasmamedizin ist breit gefächert und Gegenstand intensiver Forschung. Im Bereich der Klinikhygiene, welche angesichts zunehmender Kontaminierung mit multiresistenten Keimen vor enormen Herausforderungen steht, bieten Kaltplasmaquellen eine neue und ökonomische Möglichkeit der Desinfektion. (Morfill et al., 2009). Zudem eröffnet es die Perspektive auch hitzelabile Kunststoffe und chemische, empfindliche Oberflächen zu

desinfizieren bzw. sterilisieren. Der Effekt wird vermutlich vermittelt durch bakterielle DNA-Schädigungen, sowie der Erzeugung von reaktiven Spezies und hierdurch erzeugte toxische Effekte, welche eine Destruktion von Proteinen hervorruft. (Brun, P.,et al., 2018) (Michel Moisan, J.B., Marie-Charlotte Crevier, 2002) Auch in der Zahnmedizin wäre die Anwendung von Plasma von großem Nutzen, da es seine antimikrobiellen Eigenschaften selbst in kleinsten oralen Zahnzwischenräumen entfalten kann. Hier konnten erste positive Resultate erzielt werden (Delben et al., 2016) (Jablonowski, Fricke et al. 2016). Auch im kosmetischen Bereich ist der Einsatz von Plasma ein Bestandteil der gegenwärtigen Forschung. Hier wäre ein Nutzen denkbar, beispielsweise in der Behandlung von Akne und Verbesserung der Regeneration der Haut (Elsaie and Kammer, 2008).

Einer der wichtigsten Anwendungsspektren bleibt jedoch die Behandlung von chronischen Wunden, hierauf wurde insbesondere in den Kapitel 1.2.2 und 1.2.3 ausführlich eingegangen. In einigen tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Plasmabehandlung signifikant zur Reduktion der bakteriellen Wundbesiedlung beitrug und zudem konnte ein signifikant schnellerer Wundverschluss bzw. Wundverkleinerung erreicht werden. (Chatraie, M., et al., 2018) (Xu, G.M., et al., 2015). Ursächlich hierfür könnte ein gesteigertes Migrationsverhalten von Keratinozyten und Fibroblasen sein, welches in einigen Studien belegt werden konnte.Des Weiteren konnte eine vermehrte Bildung von Kollagen I festgestellt werden, sowie eine geförderte Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten (Arndt, S., et al.,2013) (Arjunan, K.P., et al., 2012). Arndt et al. konnte zudem nachweisen, dass es durch Steigerung von Zytokinausschüttungen zu einer geförderten Gefäßneubildung kommt. Zudem sind die in Kapitel 1.2.3 behandelten, durch NO vermittelten positiven Effekte, eine Möglichkeit der Plasmaanwendung.

2. Ziele der Arbeit

Noch ist die Wirksamkeit des im Kapitel 1.3.1 vorgestellten PlasmaDerm Flex 9060 lediglich für oberflächliche Schichttiefen von 1-2mm belegt (Kisch et al., 2016). Eine Frage, welche sich stellt, ist, ob auch tiefere Schichten von 6-7mm von der Anwendung profitieren, beispielsweise durch gesteigerte Effekte auf die Durchblutung. Zudem ist nicht abschließend geklärt, wodurch ein solcher vermeintlicher Effekt hervorgerufen wird, dadurch sind auch mögliche Nebenwirkungen noch nicht überschaubar. Eine mögliche Erklärung bietet die Entstehung und Einwirkung von NO und dessen Derivaten an der Behandlungsstelle, wie in Kapitel 1.2.3 beschrieben. So kann die direkte Bildung von NO durch das Plasma, die Absenkung des pH-Wertes als auch die Einwirkung von UV-Strahlung diesen Effekt meditieren. In diesen Zusammenhangist es das Ziel der Arbeit folgende Fragen zu beantworten:

1. Gibt es einen durchblutungssteigernden Effekt in oberflächlichen Hautschichten von 1-2mm und in tieferen Hautschichten von 6-7mm?
2. Ist durch Anwendung des PlasmaDerm eine stärkere Oxygenierung der Behandlungsstelle zu erreichen?
3. Hat die während der Behandlung entstehende UV-Strahlung Einfluss auf die Durchblutung?
4. Hat die während der Behandlung bestehende, oberflächliche Feuchtigkeit der Haut einen Einfluss auf die Durchblutung oder die Oxygenierung?
5. Gibt es toxische Nebenwirkungen durch die Behandlung, bzw. steigt die Apoptoserate?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Laborgeräte

Gerät	Handelsname	Hersteller
Absauganlage	Vacuboy	INTEGRA Biosciences AG, Zizers Schweiz
Absaugpumpe	LABOPORT	KNF Neuberger GmbH, Freiburg, BRD
Autoklav	Laboklav	SPH Steriltechnik AG, Denzel Schloss/Satuelle, BRD
Gefrierschrank -20GC	Premium NoFrost	LIEBHERR-International AG, Bulle, Schweiz
Heizplatte und Rührer	IKAMAG RH	IKA-Werk GmbH & Co KG, Staufen, BRD
Kamera	Canon Power Shot S5IS 8.0 Megapixel	Canon, Tokio, Japan
Kühlschrank 4GC		LIEBHERR International AG, Bulle, Schweiz
Microtom	CUT 6062	SLEE, Mainz, BRD
Mikroskop	Axiovert. A1, 10x	Carl Zeiss AG, Oberkochen, BRD
Mulipette	Multipette Plus	Eppendorf AG, Hamburg, BRD
O2C Messergerät	„Oxygen to see“	LEA Medizintechnik GmbH, Gießen
O2C Flach-Messsonde	O2C Messsonde LF-2	LEA Medizintechnik GmbH, Gießen

Paraffinausgießstation	TPS 1 EVO II	PathoHisto
pH-Meter	Labor-pH-Meter 766	Knick, Berlin, BRD
Pipette 100-1000µl	Eppendorf Research Plus	Eppendorf AG, Hamburg, BRD
Pipette 10-100µl	Eppendorf Research Plus	Eppendorf AG, Hamburg, BRD
Pipette 1-10µl	Eppendorf Research Plus	Eppendorf AG, Hamburg, BRD
Pipette 5ml	ErgoOne	STARLAB GmbH, Hamburg, BRD
Pipettierhilfe	Accu jet pro	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, BRD
Rundläufer (Paraffineinbettung)	Citadel 1000	Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts
Waage	Kern ABJ	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, BRD
Wärme Bad	Aqualine AL 12	LAUDA Dr. R. WOBSER GmbH& Co KG, Lauda Königshofen, BRD

Tabelle 2: Aufführung verwendeter Laborgeräte.

3.1.2. Software

Gerät	Hersteller
GraphPad Prism 5	GraphPad-Prism-Software, Inc., USA
AxioVision	Oberkochen, BRD
Excel und Word 365	Microsoft, USA

Tabelle 3: Aufführung der verwendeten Software

3.1.3. Verbrauchsmaterialien

Produkte	Handelsname	Hersteller
6 Well Platte	CytoOne 6-Well Plate with Lid	STARLAB GmbH, Hamburg, BRD
Biopsiekassetten	Histosette	Simport, Canada
Biopsie-Stanze	pfm-medical 8mm	Pfm medical, Köln, BRD
Eppendorfgefäß 2ml	Eppendorf-Tube	Eppendorf, Hamburg, BRD
Falcons/ Zentrifugenröhrchen	Cellstar Tubes (15ml/50ml)	Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA
Glaspipetten	Pasteurpipetten aus Glas	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, BRD
Handschuhe L	Micro-Touch Nitrile, Powder free	Ansell GmbH, München, BRD
Müllbeutel	Vernichtungsbeutel	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, BRD
Multipetten-Spitzen (0,5ml;5ml;10ml)	Combitips Plus steril/unsteril	Eppendorf AG, Hamburg, BRD
Parafilm	Parafilm „M“	Bemis Company, Inc., Neenah, WI, USA
Petrischale	Cellcoat, Zellkulturschale 60x15mm	International, Kremsmünster, AT
Pipettenspitze 10µl	XL graduated filter tip	STARLAB GmbH, Hamburg, BRD
Pipettenspitze 100µl	XL graduated filter tip	STARLAB GmbH, Hamburg, BRD
Pipettenspitze 1000µl	XL graduated filter tip	STARLAB GmbH, Hamburg, BRD

Pipettenspitze 10ml	Costar Stripette	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Pipettenspitze 25ml	Costar Stripette	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Pipettenspitze 2ml	Costar Stripette	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Pipettenspitze 5ml	Costar Stripette	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Spritze 10ml	Inject	Braun Melsungen AG, Melsungen, BRD
Spritze 20ml	Luer Solo Inject	Braun Malsungen AG, Melsungen, BRD
Spritze 50ml	Original Perfusor Spritze, Luer Lock Solo	Braun Melsungen AG, Melsungen, BRD
Spritze 5ml	Omnifix/ Luer Lock Solo	Braun Melsungen AG, Melsungen, BRD
Tonne für klinischen Abfall	Konaminationsabfall	MAUSER GmbH, Brühl, BRD

Tabelle 4: Aufführung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

3.1.4 Chemikalien und Lösungen

Produkt	Handelsname	Hersteller
Aqua dest	Demi- Wasser	Otto Fischar GmbH & Co KG, Saarbrücken, BRD
Aqua dest	Distilled water	Life Technologies Ltd., Paisly, UK
D-(+)-Glucose	D-(+)-Glucose	Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA
Eichlösung	Buffersolution pH 4.008 +/- 0,02	Carl Roth GmbH + Co KG Karlsruhe
Eichlösung	Buffersolution pH 7,00 +/- 0,02	Carl Roth GmbH + Co KG Karlsruhe

Ethanol (70%)	Wet Task	Kimberly-Clark Corporation, Neenah, WI, USA
Ethanol (90%)	Ensure, Ethanol for analysis	Merck KGaA Darmstadt, BRD
Hoechst 33342	Bis Benzimide H 33342	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Natrium Nitit	Natrium Nitrit	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natrium Nitrat	Natrium Nitrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
PBS	Dulbecco's PBS; without Ca & Mg; sterile	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT
TUNEL System	DeadEnd Fluorometric	Promega, Madison , Wisconsin, USA

Tabelle 5: Aufführung der verwendeten Chemikalien und Lösungen.

3.2. Methoden

3.2.1 Durchführung der Probandenstudie

Um Rückschlüsse auf die Wirksamkeit und des Wirkmechanismus des PlasmaDerm auf den menschlichen Körper zu erhalten, wird eine klinische Studie durchgeführt. Hierbei haben sich 24 gesunde Probanden im Bekanntenkreis des Untersuchers und in der Belegschaft, welche nicht in einem Abhängigkeitsverhältnis zu diesen stehen, freiwillig zur Verfügung gestellt. Zuvor wurde ein entsprechender Antrag bei der Ethikkommission eingereicht und im weiteren Verlauf genehmigt. (Studiennummer: 5014R) Einschlusskriterien bei der Studie sind hierbei: Gesunde, einwilligungsfähige Probanden zwischen 18 bis 69 Jahren

- schriftliche Einverständniserklärung des Probanden
- guter und stabiler Allgemeinzustand nach Selbsteinschätzung

Als Ausschlusskriterien gelten:

- Schwangerschaft
- Herzrhythmusstörungen
- Herzschrittmacher oder anderes implantiertes Medizinprodukt
- Neigung zu epileptischen Anfällen
- bekannte Überempfindlichkeit gegenüber Ozon
- Hauterkrankungen oder Wunden an den Teststellen (Unterarme)
- Tätowierungen an der Teststelle (Unterarme)
- gleichzeitige Teilnahme an anderen klinischen Studien

Jeder Proband wird darüber informiert, dass er die Studie jederzeit ohne Angabe von Gründen abbrechen kann. Die Untersuchung erfolgt je nach Wunsch des Probanden entweder direkt an einem oder an zwei Tagen. Alter und Geschlecht werden vorab im Protokoll erfasst. Alle Messdaten der Probanden werden unter Vergabe von Probandenidentifikationsnummern anonymisiert. Das Messprotokoll der Studie

untergliedert sich in vier Teile und ermittelt verschiedene Parameter. Vor jedem einzelnen Teil des Messprotokolls werden alle Parameter (Durchblutungswerte, Oxygenierung) gemessen und als Referenzwert angenommen. Um eine Aussage eventueller Abhängigkeiten über die Gesamtdauer der Behandlungszeit mit dem PlasmaDerm treffen zu können, werden 8 Probanden mit einer einfachen Behandlungszeit von 90s, 7 Probanden mit der doppelten Behandlungszeit von 180s und abschließend weitere 9 Probanden mit einer Gesamtbehandlungszeit von 360s behandelt. Vor Beginn jeder Teilmessung wird der Behandlungsbereich vorab auf den Unterarm des Probanden markiert. Des Weiteren wird darauf geachtet, dass die Probanden sich vor Beginn der Messungen in einen 5 min Ruhezustand befinden.

3.2.1 Bestimmung der Durchblutungsparameter

Um die Änderung der Durchblutungsparameter

- relative Sauerstoffsättigung (SO2) des Hämoglobins
- Relative Hämoglobinmenge (Gefäßfüllungszustand)
- Relativer Blutfluss
- Blutflussgeschwindigkeit

ermitteln zu können, wurde ein O2C Messgerät der Firma „LEA Medizin Technik Gießen“ verwendet. Dieses erlaubt es, durch auflegen einer fiberoptischen Glassonde, mittels einer Laser-Doppler-Spektroskopie zum einen, den relativen Blutfluss und dessen Geschwindigkeit zu ermitteln und zum anderen ist es möglich durch eine Weisslichtspektroskopie die relative Hämoglobinmenge und die Sauerstoffsättigung des Hämoglobins zu erfassen. Die Messwerte des Blutflusses, derGeschwindigkeit des Blutflusses, sowie der relativen Hämoglobinsättigung, werden in
A.U. (Arbitrary Units) angegeben, was eine beliebige Einheit darstellt. Der Grund dafür liegt in der Messmethode. Die gemessenen Signale, welche Rückschlüsse auf den Blutfluss, dessen Geschwindigkeit und der relativen Hämoglobinmenge geben, sind elektrische Größe, bestehend aus Frequenz und Amplitude und lassen sich nicht ohne vorherige organspezifische Kalibrierung umwandeln.

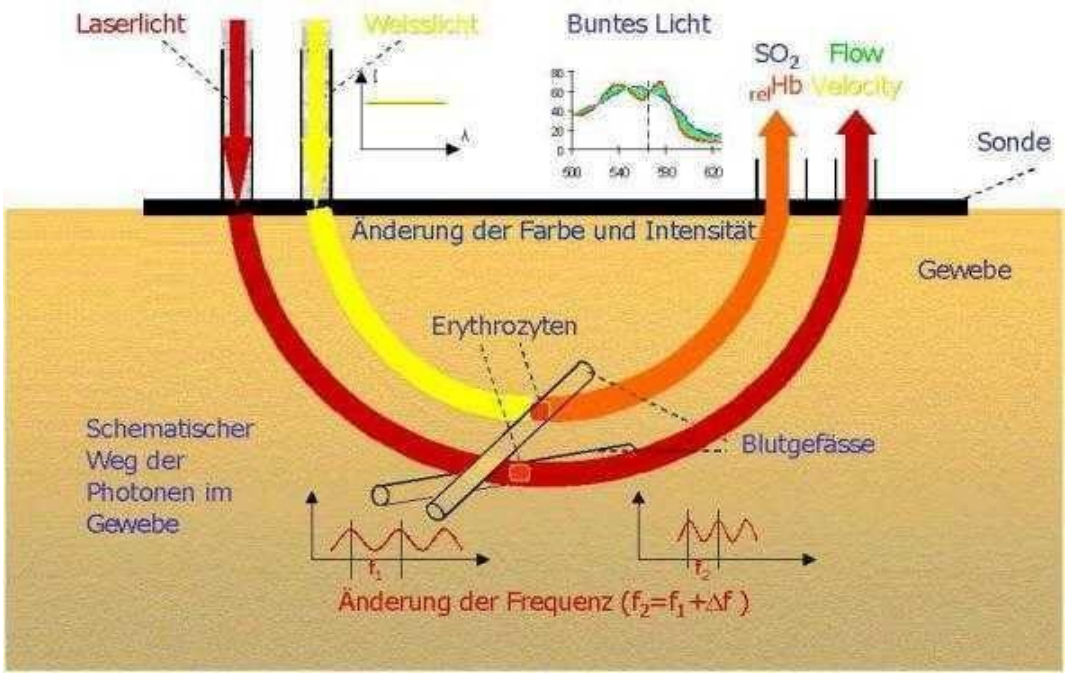


Abbildung Nr.3: Schematische Darstellung der Messung mit einem O2C-Gerät der Firma LEA-Medizin Technik (Abbildung von LEA- Medizin Technik). Abgebildet ist die Flachsonde, welche der Haut direkt aufliegt. Durch Frequenzveränderung, des am anderen Ende wieder detektierten Laserstrahls durch die sich bewegenden Erythrozyten, berechnet das Gerät intern den Fluss und die Geschwindigkeit. Durch Veränderung des Farbspektrums des ausgesendeten Weißlichtes, ist das Gerät in der Lage, die Sauerstoffsättigung und die relative Hämoglobin-Konzentration zu ermitteln.

Die ermittelten Werte werden alle zu dem entsprechenden Messzeitpunkt in einen vom O2C-Gerät generierten Ordner erfasst und einer Nummer zugeordnet. Diese Nummern werden im Messprotokoll am jeweiligen Messzeitpunkt notiert, um den Ordnernummern und den darin beinhalteten Messwerten, die richtigen Messzeitpunkte zuordnen zu können. Mit diesen nicht invasiven Verfahren, ist es möglich, diese Parameter zu jedem beliebigen Zeitpunkt in einer Hauttiefe von 1-2 mm, sowie von 6-8 mm zu erfassen. Verwendet wird eine spezielle 2 Kanal Flachsonde des Typs LF-2, welche parallel zur Gewebeoberfläche die Durchblutungsparameter erfassen kann. Da es innerhalb eines markierten Testfeldes, je nach Hautstelle am Unterarm, an dem die Sonde aufgelegt wird, zu unterschiedlichen Werten kommen kann, wird die genaue Messstelle vor Beginn der Messung markiert, wo die Referenzmessung durchgeführt wird. Alle folgenden Messungen werden dann innerhalb dieses markierten Bereiches vorgenommen.

Die Besonderheit des O2C Geräte besteht darin, dass es im kapillär-venösen Bereich misst, anders als beispielsweise bei der Pulsoxymetrie, bei der im arteriellen Teil des Gefäßsystems die Sauerstoffsättigung gemessen wird. Dementsprechende fallenauch die Sättigungswerte niedriger aus, zudem besteht eine größere Heterogenität der Sättigungswerte in der Mikrozirkulation.

Zur Beurteilung der lokalen Sauerstoffversorgung des Gewebes, sind sowohl die kapillär-venöse Sättigungen als auch der Blutfluss von Bedeutung. Beispielsweise kann ein Grund für eine lokal erniedrigte Sättigung eine erhöhte Sauerstoffabgabe des Blutes an das umgebende Gewebe sein, oder aber ein verminderter Blutfluss. Zudem erlaubt das O2C Messgerät Rückschlüsse, auf die im durchleuchteten Gewebevolumen vorhandene relative Hämoglobinmenge. Ist im durchleuchteten Messvolumen, eine größere Menge an Blut vorhanden, so wird vom Hämoglobin, welches der größte Lichtabsorber ist, eine größere Menge an Licht aufgenommen und entsprechend weniger von der aufliegenden Sonde detektiert. Ein Effekt, welcher eine größere Menge an Blutvolumen in einem Messbereich hervorrufen könnte, wäre beispielsweise eine Vasodilatation im Untersuchungsareal.

Symptome/Beispiele	**Blutfluss**	**Hb-Menge**	**O2-Sättigung**	**Ursachen**
1.Langsame Abnahme des Blutflusses	Langsame Abnahme des Blutflusses	Anstieg	Langsamer Abfall SO2	Venöser Stau
2.Abfall Blutfluss und SO2	Abfall / Erniedrigung	Kleiner Abfall oder keine Veränderung	Abfall der SO2	Arterielle Ischämie
3.Messung in einem Tumor	Hoch	Hoch	Hoch	Hoher Metabolismus
4. Messung an einer offenen Wunde	Hoch	Hoch	Hoch	Hyperämie als Zeichen der Entzündung
5.Diabetischer Patient	Hoch	Normal	Hoch	Hyperämie durch vegetative Neuropathie

6.Arteriosklerotischer Patient	Niedrig	Niedrig	Niedrig	Arterielle Ischämie
7.Arterioskleroischer Patient	Niedrig	Niedrig	Sehr hoch	Erniedrigter Stoffwechsel durch ischämische Schädigung

Tabelle 6: Beispiele von Beziehungen und Verhältnisse der Durchblutungsparameter zueinander und deren mögliche Ursachen (Modifizierte Tabelle von LEA Medizintechnik)

3.2.3. O2C Messprotokolle

3.2.3.1. Erster Teil des Messprotokolls: Druckkontrolle

Während einer Plasmabehandlung muss die Elektrode, also das Handteil des PlasmaDerm, durch den Behandler mit permanentem, leichtem Druck auf die Behandlungsstelle aufgebracht werden. Um den Einfluss des Drucks auf die Durchblutungsparameter beurteilen zu können, wird die Elektrode für die entsprechende Behandlungszeit ohne Aktivierung der PlasmaDerm Contol-Unit und damit ohne Erzeugung eines Plasmas auf die vormarkierte Behandlungsstelle gedrückt und anschließend alle Parameter in verschiedenen Zeitabständen (0,2.5,5,10 min ect.) erfasst. Vor Beginn der eigentlichen Behandlung wurden 3 Referenzmessungen im vorab markierten Behandlungsbereich durchgeführt und deren Mittelwerte als Ausgangpunkt verwendet. Die Referenzmessungen wurden in allen weiteren Teilen des Messprotokolls auf dieselbe Weise ermittelt. Des Weiteren wurden die Messungen mit unterschiedlichen Behandlungszeiten durchgeführt (90s,180s und 360s). Dies betrifft die Druckbehandlung, als auch alle weiteren Teilabschnitte des Messprotokolls.

3.2.3.2. Zweiter Teil des Messprotokolls: Trockene Plasmabehandlung

In diesem Abschnitt des Messprotokolls wird die Behandlung mit dem PlasmaDerm so durchgeführt, wie es nach Herstellerangaben empfohlen wird. Das vorab markierte Testfeld wird nach Ermittlung der Referenzwerte behandelt. Direkt im Anschluss daran, werden alle Parameter zu den verschiedenen Zeitpunkten erfasst bis maximal

t=40 Minuten ermittelt. Es wurden verschiedene Behandlungszeiten durchgeführt. (90s,180s und 360s)

3.2.3.3. Dritter Teil des Messprotokolls: Feucht-Behandlung

Um den Einfluss der Feuchtigkeit der Haut beurteilen zu können, und damit eventuelle Einflüsse auf den pH-Wert, wurde in diesen Abschnitt vor Durchführung der Plasmabehandlung die Behandlungsstelle mit einen auf 37 °C temperierten Lappen für 1 min behandelt und behutsam, ohne stake Durchausübung, das überschüssige Wasser abgetupft. Dann wurde nach Erfassung der Referenzwerte mit dem PlasmaDerm über die einfache oder doppelte Behandlungszeit (90s und 180s) die markierte Stelle behandelt.

3.2.3.4. Vierter Teil des Messprotokolls: Folien Behandlung

Im letzten Abschnitt des Protokolls werden zunächst alle Referenzwerte im markierten Bereich erfasst und daran anschließend die Stelle mit einer handelsüblichen Küchenfolie (Ja! Frischhaltefolie, Quickpack Haushalt + Hygiene GmbH; Renningen) überspannt. Hierbei wird darauf geachtet, dass die Folie möglichst glatt und ohne Faltenwurf der Haut direkt anliegt. Dabei soll der Einfluss, der während der Messung freiwerdenden UV- Strahlung beurteilt werden.

Vor Durchführung dieses Teilabschnitts des Messprotokolls, werden zur Überprüfung des UV abmildernden Effektes der Folie mehrere Messungen mit einem UV-Messgerät durchgeführt (Dr. Göbel, RM21). Das Messgerät besteht aus 2 verschiedenen UV-Quellen, von der jeweils eine UV-A und die andere UV-B Strahlung emittiert. Des Weiteren verfügt das Gerät über einen Sensor, der die jeweilige UV-Strahlung in mW/cm² misst. Zunächst werden mehrere Referenz-Messungen, sowohl von der UV-A, als auch von der UV-B Lampe in abgedunkelter Kammer durchgeführt. Im Anschluss wird zwischen den Lampen und den Sensor die Folie einmal mit Faltenwurf und einmal ohne Faltenwurf gespannt, um den durch die Folie verursachten UV reduzierenden Effekt zu ermitteln.

3.2.4 Bestimmung der Apoptoserate / Toxizitätstest

Um Aussagen über eventuell toxische Eigenschaften der Behandlung mit dem Plasmaderm treffen zu können, wird Spalthaut unterschiedlicher Dicke (3mm und

7mm) mit dem Plasmaderm behandelt und eine TUNEL Methode (Terminale Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling) durchgeführt. Durch dieses etablierte, hochsensitive Verfahren ist es möglich apoptotische Zellen im Flureszenzmikroskop sichtbar zu machen. Die bei Apoptose durch aktive Endonukleasen erzeugten DNA Doppelstrang oder Einzelstrangbrüche, werden mit Flurescein dUDP Moleküle markiert, welche durch die Zugabe von terminalen Desoxynucleotidyl Transferasen dem DNA-Ende anlagert werden. Diese nun markierten Enden, können im Flureszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

Substanz	**Wirkung**	**Dauer**
Proteinase K Lösung(100µl/Schnitt)	Permeabilisierung	8-10min
PBS	Reinigen der Schnitte	5min
Formaldehyd 4%	Nachfixierung	5min
PBS	Reinigung der Schnitte	5min
Equilibrationsbuffer	Vorbereitung auf Inkubationspuffer	10min
Inkubationspuffer (Nucleotide+rTdT)	TUNEL Reaktion /Im Dunkeln	60min
SSC Puffer	Stopp der rTDT-Enzym	15min
3 x PBS	Reinigen der Schnitte	5min
Mountflour	Eindeckeln	30min

Tabelle Nr.7: Protokoll zur TUNEL Färbung nach erfolgter Entparaffinierung

Als spätere Positiv-Kontrolle werden einige Schnitte mit einer DN'ase behandelt. Diese spaltet die DNA fast aller auf den Schnitten befindlichen Zellen und sollte demnach, bei korrekter Durchführung der Färbung, alle Zellen, sowohl bei Kernfärbung, als auch bei der TUNEL- Färbung, sichtbar machen. Als Negativ- Kontrolle werden einige Schnitte mit einen Inkubationspuffer behandelt, dem das rTdT-Enzym fehlt. Demnach können den Zellen dieser Schnitte, keine dUDP markierten Moleküle dem DNA-Brüchen angelagert werden und sollten dementsprechend, bei korrekter Durchführung der TUNEL Methode, nur bei Kernfärbung sichtbar sein.

Um alle anderen auf den Schnitten befindlichen Zellen anzufärben, wird eine Hoechst Kernfärbung (2′-(4-Ethoxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5′-bi-1*H*-benzimidazol trihydrochlorid) verwendet, welche sich an zelluläre DNA bindet und

somit alle Zellkerne anfärbt. Auch diese Färbung kann unter den Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Zur Bestimmung der Apoptoserate, wird die Gesamtzahl aller durch Hoechst angefärbten Zellen pro Gesichtsfeld, denen der in Apoptose befindlichen Zellen pro Gesichtsfeld gegenübergestellt. Als zu färbende Präparate wird Spalthaut unterschiedlicher Dicke (3mm / 7mm) verwendet, welche mehrfach mit PBS gewaschen und im getrockneten Zustand 90s oder 360s mit dem PlasmaDerm behandelt wird. Anschließend werden Stanzbiopsien von 8mm Durchmesser entnommen. Zudem wird ebenfalls nicht behandelte Haut biopsiert als spätere Kontrolle bzw. als Referenz. Die Biopsien wurden in ein Nährmedium gelegt und über Nacht in den Brutschrank überführt, anschließend mehrfach mit PBS gewaschen und mit 4% Formaldehyd zur Fixierung bei Raumtemperatur ebenfalls über Nacht gelagert. Daran anschließend werden die Proben mit Biopsiekassetten durch den Rundläufer (Thermo Corporation SHADON Citadel 1000) in Paraffin eingebettet. Die nun mit Paraffin durchzogenen Proben werden mit einen Microtom in 4 µm Schichten geschnitten und auf Objektträger (76mmx26mmx1mm) übertragen und über Nacht im Trockenschrank bei 37 °C getrocknet. Um die anschließende TUNEL Färbung durchzuführen, wird nun das Paraffin aus den Proben mittels Xylene und einer absteigenden Alkoholreihe herausgelöst und mehrere Minuten in 0,85 % NaCl-Lösung gelegt und daran anschließend in PBS gewaschen.

3.2.5. Statistische Methoden

Für die statistische Auswertung wurde das Programm Graph Pad Prism Version 7 und 5 verwendet. Die statistische Analyse zwischen und innerhalb der Gruppen der unterschiedlichen Behandlungszeiten und Behandlungsarten der Probandenstudie, erfolgte durch eine one way repeated measures ANOVA. Bei Verletzung der Shärizität wurde eine Greenhouse-Geisser Korrektur durchgeführt.

Als Siginifikanzniveau wurde Alpha 0,05 angenommen.

4. Ergebnisse

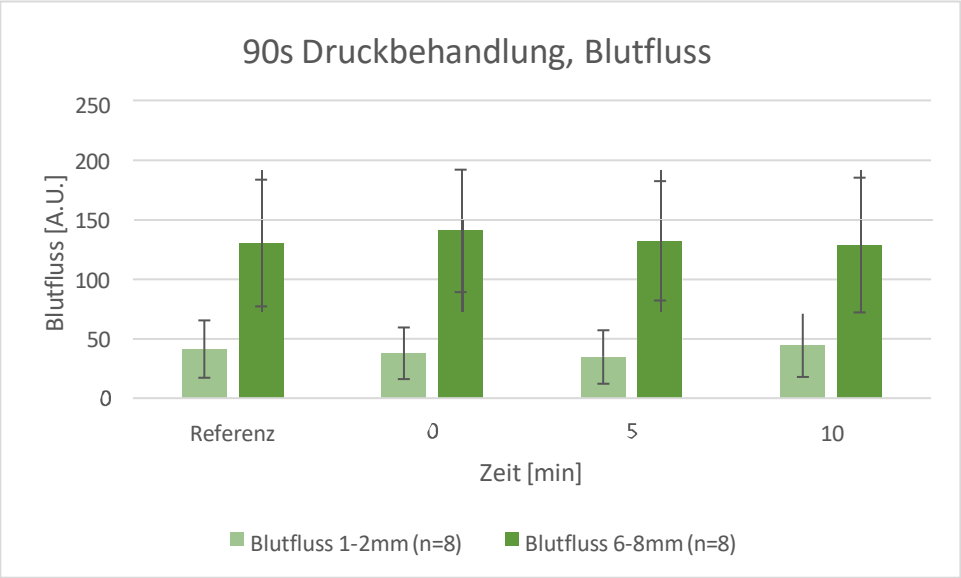
4.1. Auswirkungen des PlasmaDerm auf die Durchblutung

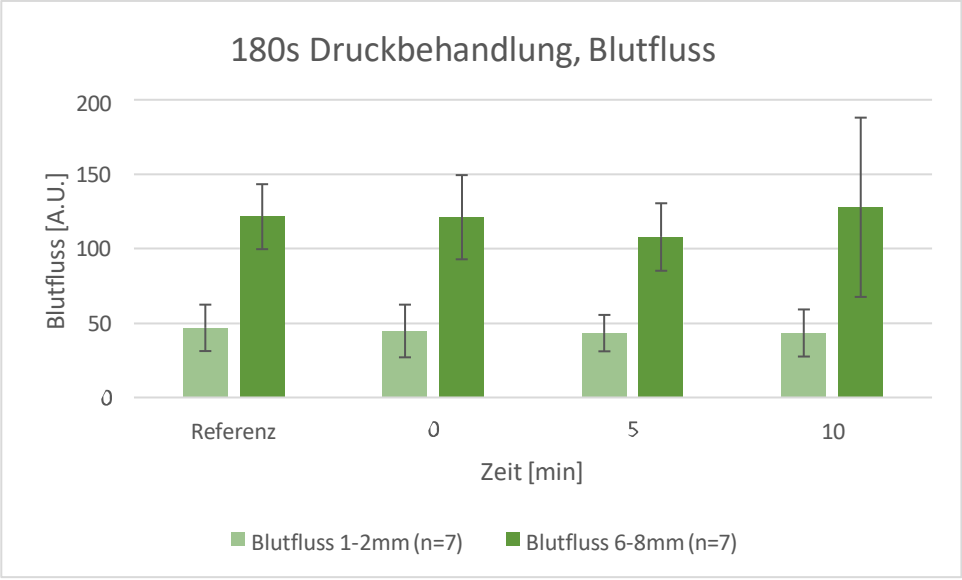
Ein Ziel der Arbeit ist die Untersuchung des vermuteten, durchblutungssteigernden Effektes, welche durch die Plasma Behandlung induziert werden sollte.

Hierbei wurde, wie in Kapitel 2.2.7 beschrieben, eine Behandlung der Stelle durchgeführt, wie es der Hersteller des Gerätes vorsieht. Die vom Hersteller empfohlene Behandlungszeit beträgt 90s. Es wurde, nach vorherigem Ausschluss von toxischen, schädigenden Wirkungen, weitere Behandlungszeiten von 180s und 360s in die Studie mit aufgenommen. Zudem wurden, wie im Methodenteil beschrieben, verschiedene Behandlungsmodifikationen vorgenommen, um Störgrößen einschätzen zu können (Druckbehandlung ohne Plasmaaktivierung, Behandlung mit Folie und angefeuchteter Haut)

4.1.1. Druckbehandlung

4.1.1.1. Blutflusswerte und deren Verlauf nach erfolgter Druckbehandlung mit unterschiedlichen Behandlungszeiten ohne Plasmaaktivierung.





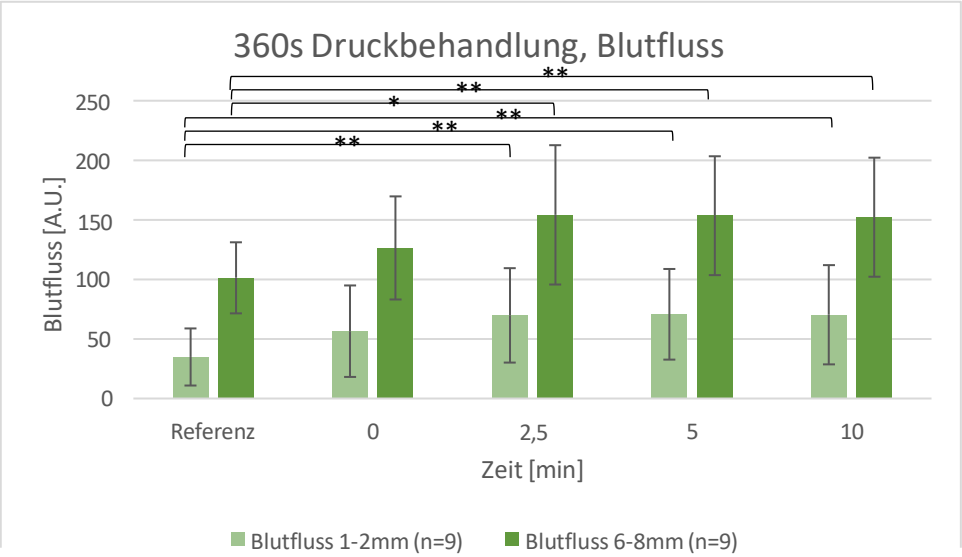


Abbildung 4: Mittlere Blutflusswerte in [A.U.] bei unterschiedlichen Druckbehandlungszeiten. Die Abbildungen zeigen alle mittleren Blutflusswerte, zu den jeweiligen Messzeitpunkten, nach Druckbehandlung in 1-2mm und 6-8mm Hautschichttiefe. Der erste Balken stellt jeweils den Referenzwert vor Beginn der Behandlung dar. Der 0 Minutenwert zeigt den mittleren Blutflusswert unmittelbar nach Beendigung der Druckbehandlung.

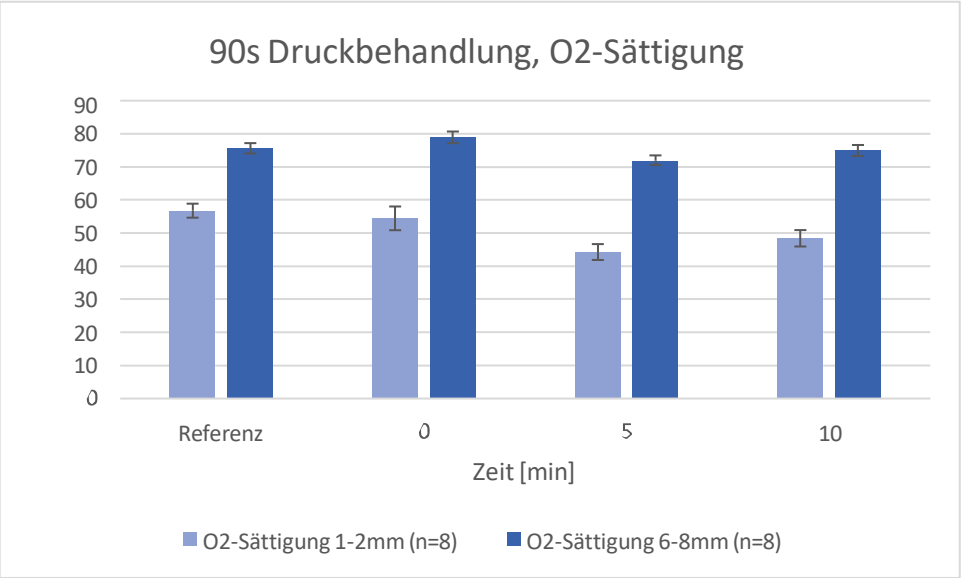
Bei 90s und 180s Behandlungszeit konnte kein signifikanter Unterschied in derANOVA im Vergleich zum Referenzwert festgestellt werden.

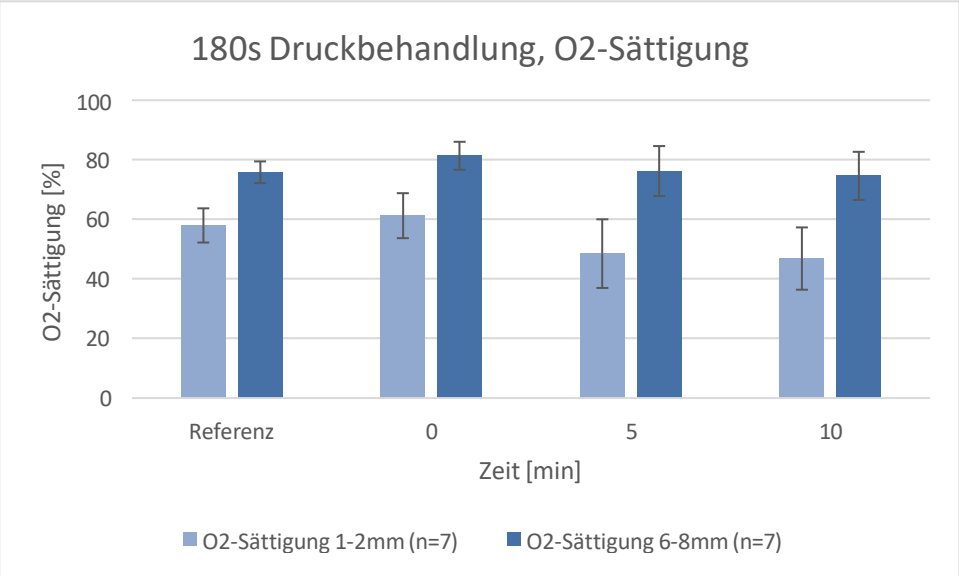
Nach der 360s Druckbehandlung konnte ein signifikanter Unterschied, sowohl in den oberflächlichen als auch in den tieferen Hautschichten festgestellt werden. In den oberflächlichen Schichten zeigte sich in der durchgeführten, einfachen, *repeated measured ANOVA,* dass ein signifikanter Unterschied zwischen den Messungen bestand. In den anschließenden *Bonferroni Post-Hoc-Test* ergab sich zumZeitpunkt 2,5 min, 5min und 10min in Bezug zum Referenzwert ein hochsignifikanter Unterschied.

In den tieferen Hautschichten zeigte sich in der *repeated measured ANOVA*, dass ein

hochsignifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Messungen bestand. In dem anschließend durchgeführten *Bonferroni Post-Hoc-Test,* ergab sich zum Zeitpunkt 2,5 min ein signifikanter Unterschied und zum Zeitpunkt 5 min und 10 min in Bezug auf den Referenzwert ein hochsignifikanter Unterschied. (α=0,05)

4.1.1.2. Sauerstoffsättigung und deren Verlauf nach erfolgter Druckbehandlung mit unterschiedlichen Behandlungszeiten ohne Plasmaaktivierung





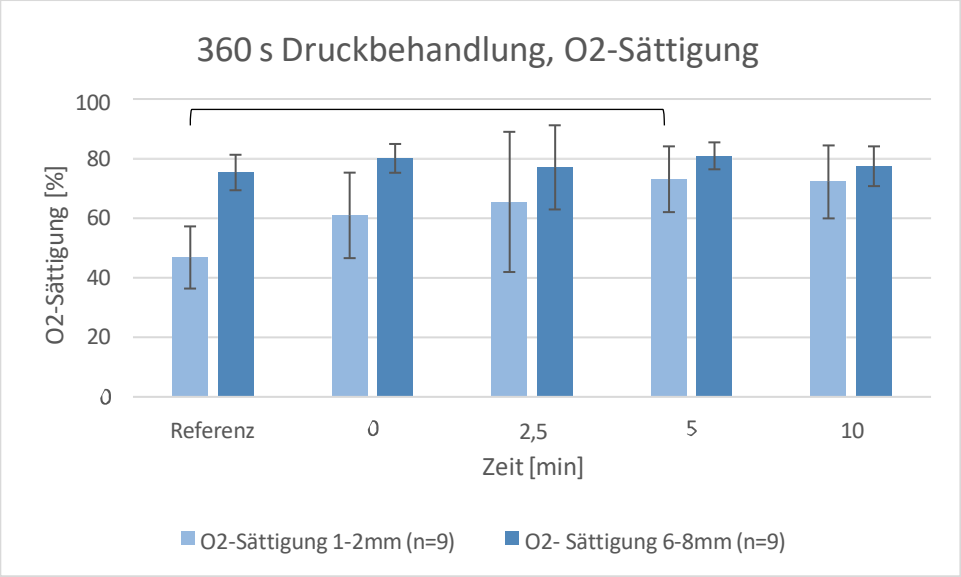
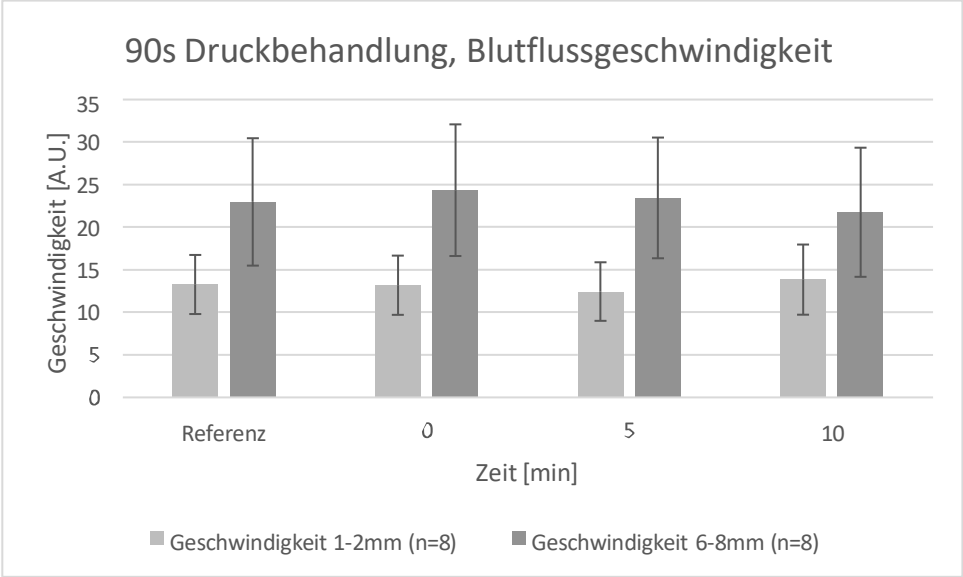
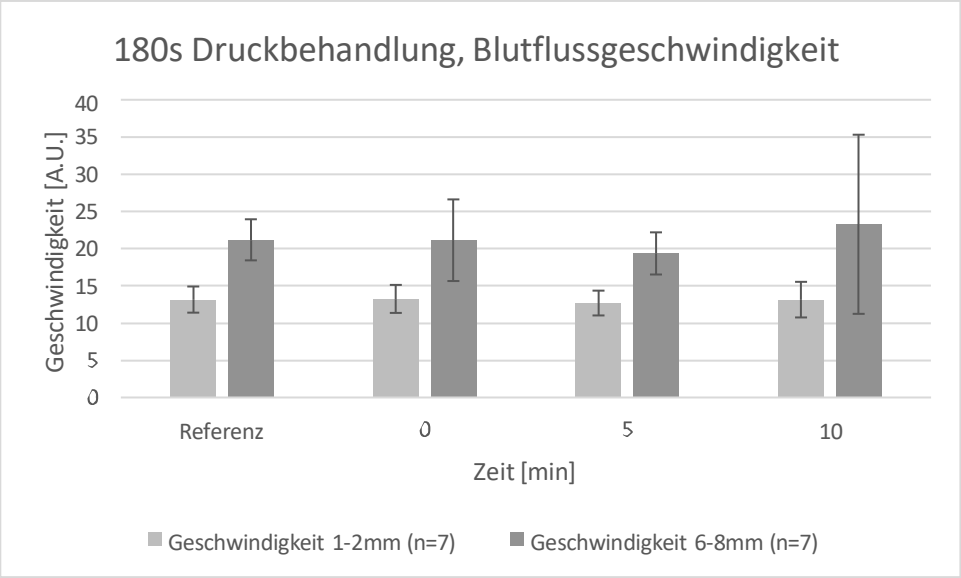


Abbildung 5: O2-Sättigungswerte in [%] bei unterschiedlichen Druckbehandlungszeiten. Die Abbildungen zeigen alle mittleren O2-Sättigungswerte, zu den jeweiligen Messzeitpunkten, nach Druckbehandlung in 1-2mm und 6-8mm Hautschichttiefe. Der erste Balken stellt jeweils den Referenzwert vor Beginn der Behandlung dar. Der 0 Minutenwert zeigt die O2-Sättigung unmittelbar nach Beendigung der Druckbehandlung.

Bei den 90s und 180s Druckbehandlungen, konnten keine signifikante Unterschiede im Vergleich zum Referenzwerte ermittelt werden. Bei der 360s Druckbehandlung, konnte in den oberflächlichen Hautschichten in der einfachen, *repeated measured ANOVA,* ein signifikanter Unterschied zwischen den Messungen ermittelt werden. In den anschließenden *Bonferroni Post-Hoc-Test*, ergab sich zum Zeitpunkt 5 min, ein-signifikanter Unterschied in Bezug auf den Referenzwert. (α=0,05)

4.1.1.3. Blutflussgeschwindigkeit und dessen Verlauf nach erfolgter Druckbehandlung mit unterschiedlichen Behandlungszeiten ohne Plasmaaktivierung





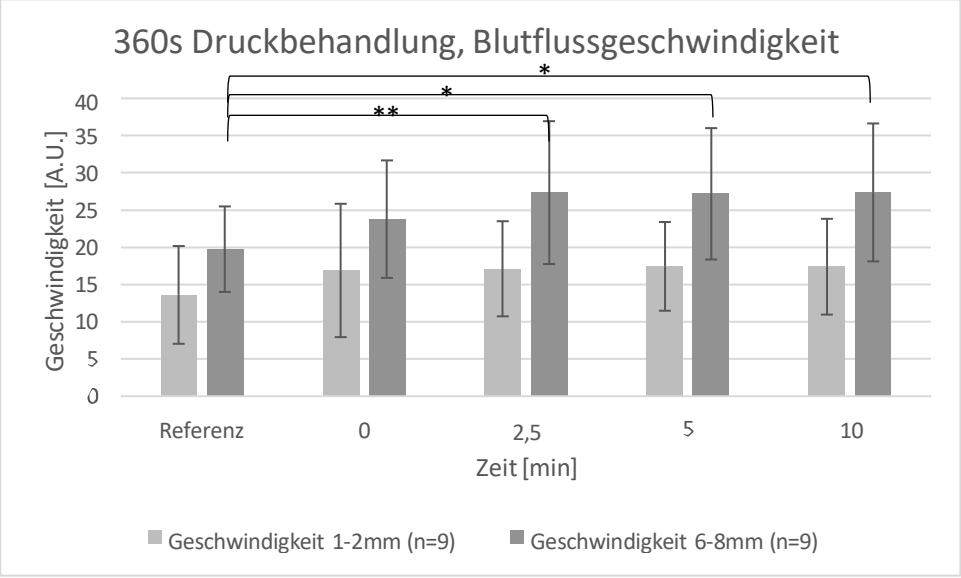
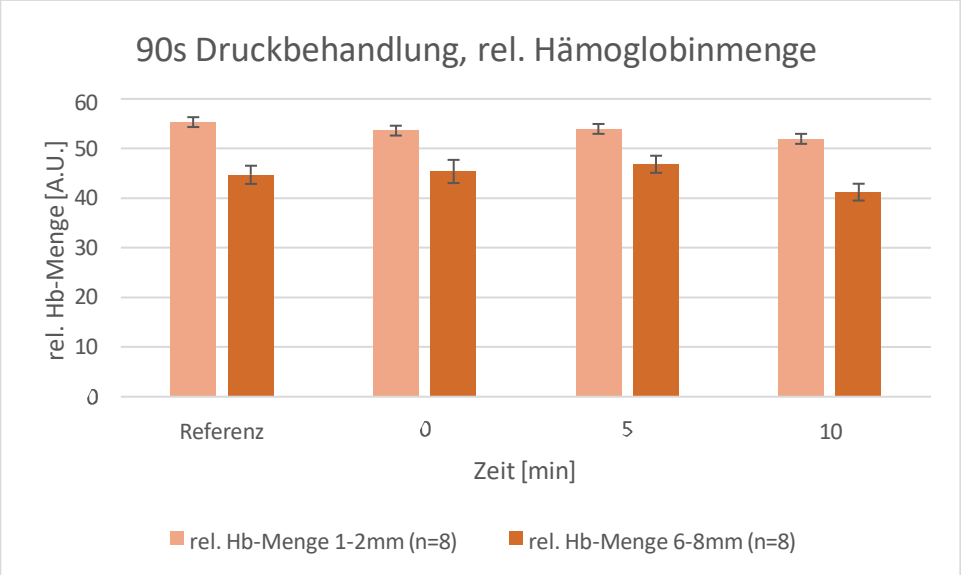
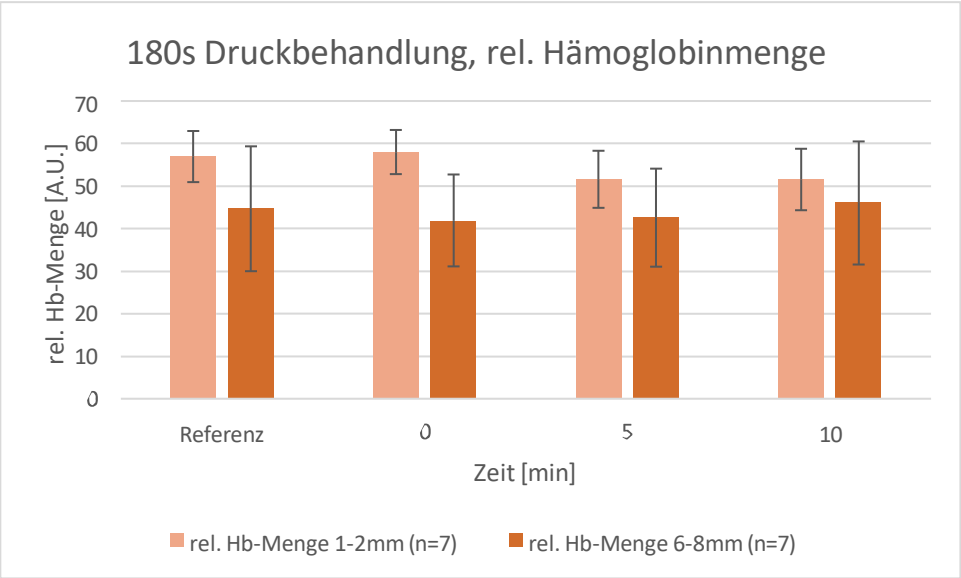


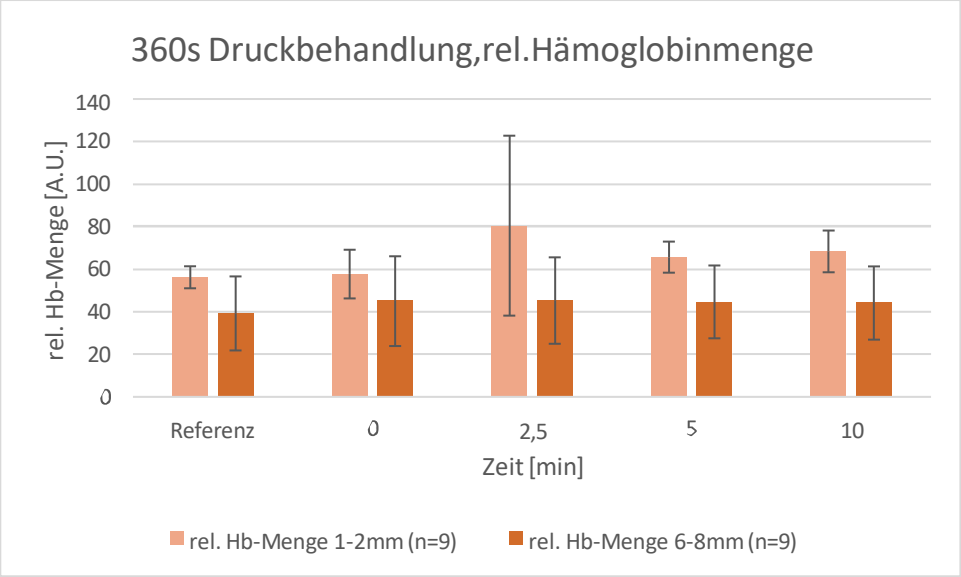
Abbildung 6: Blutflussgeschwindigkeit in [A.U.] bei unterschiedlichen Druckbehandlungszeiten: Die Abbildungen zeigen alle mittleren Blutflussgeschwindigkeiten, zu den jeweiligen Messzeitpunkten, nach Druckbehandlung in 1 - 2mm und 6-8mm Hautschichttiefe. Der erste Balken stellt jeweils den Referenzwert vor Beginn der Behandlung dar. Der 0 Minutenwert zeigt die Blutflussgeschwindigkeit unmittelbar nach Beendigung der Druckbehandlung.

Bei den 90s und 180s Behandlungszeiten, konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Bei einer Behandlungszeit von 360s, konnte in den tieferen Hautschichten, in der *repeated measured ANOVA,* ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Messungen ermittelt werden. In den anschließend durchgeführten *Bonferroni Post-Hoc-Test,* ergab sich zum Zeitpunkt 2,5 min ein hoch-signifikanter Unterschied und zum Zeitpunkt 5 min und 10 min ein signifikanter Unterschied, jeweils im Bezug zum Referenzwert. (α=0,05)

4.1.1.4. Relative Hämoglobinmenge und dessen Verlauf nach erfolgter Druckbehandlung mit unterschiedlichen Behandlungszeiten ohne Plasmaaktivierung





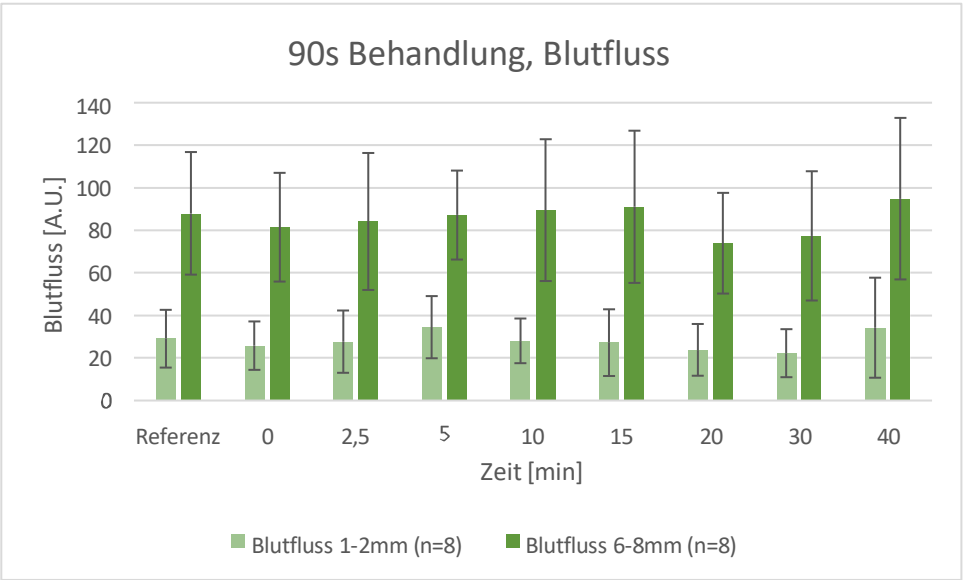


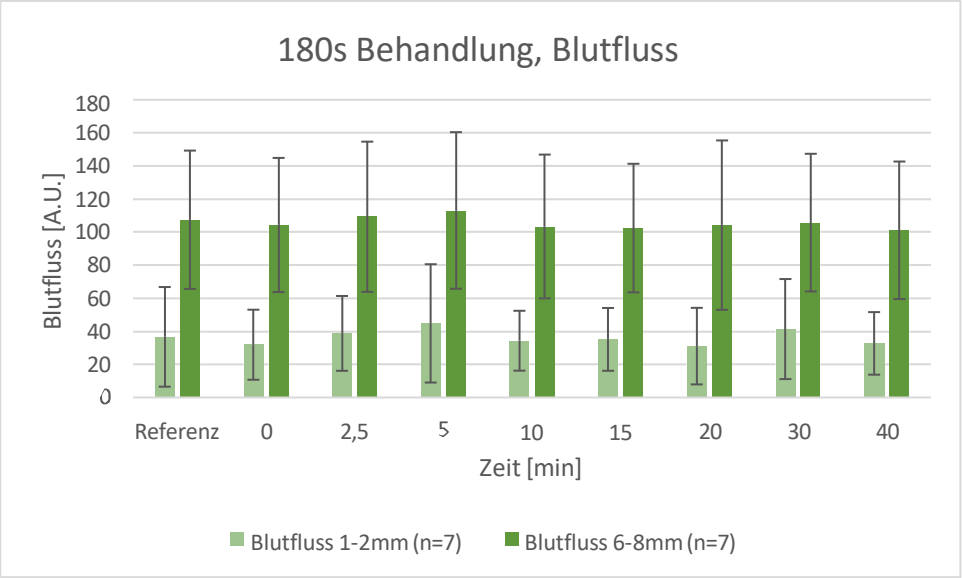
Abbildungen 7: Relative Hämoglobinmenge in [A.U.] bei unterschiedlichen Druckbehandlungszeiten. Die Abbildungen zeigen alle relativen Hämoglobinmengen, zu den jeweiligen Messzeitpunkten, nach Druckbehandlungin 1-2mm und 6-8mm Hautschichttiefe. Der erste Balken stellt jeweils den Referenzwert vor Beginn der Behandlung dar. Der 0 Minutenwert zeigt die rel. Hb-Menge unmittelbar nach Beendigung der Druckbehandlung.

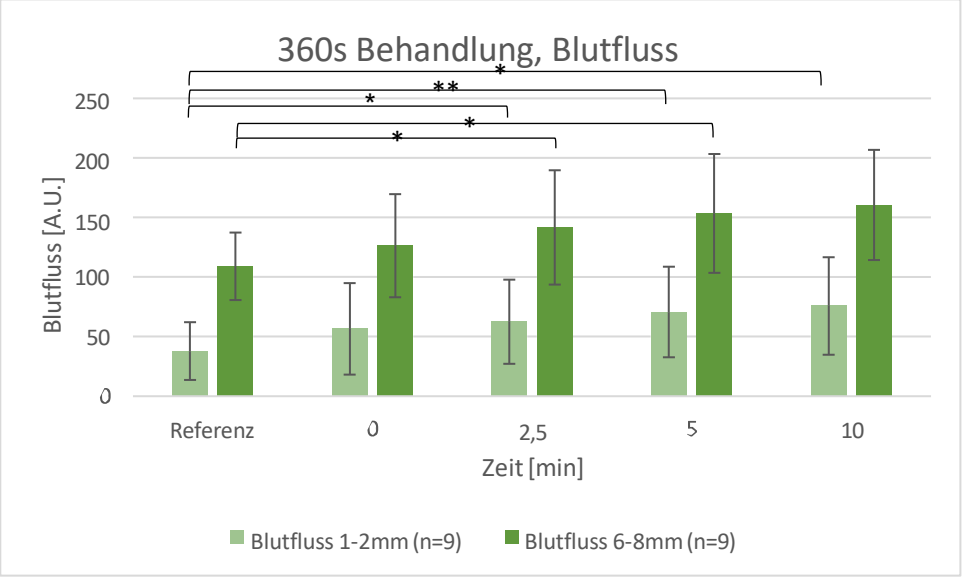
Bei allen Messungen konnten keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf den Referenzwert festgestellt werden. (α=0,05)

4.1.2. Trockenbehandlung

4.1.2.1. Blutflusswerte und deren Verlauf nach erfolgter Behandlung mit unterschiedlichen Behandlungszeiten.





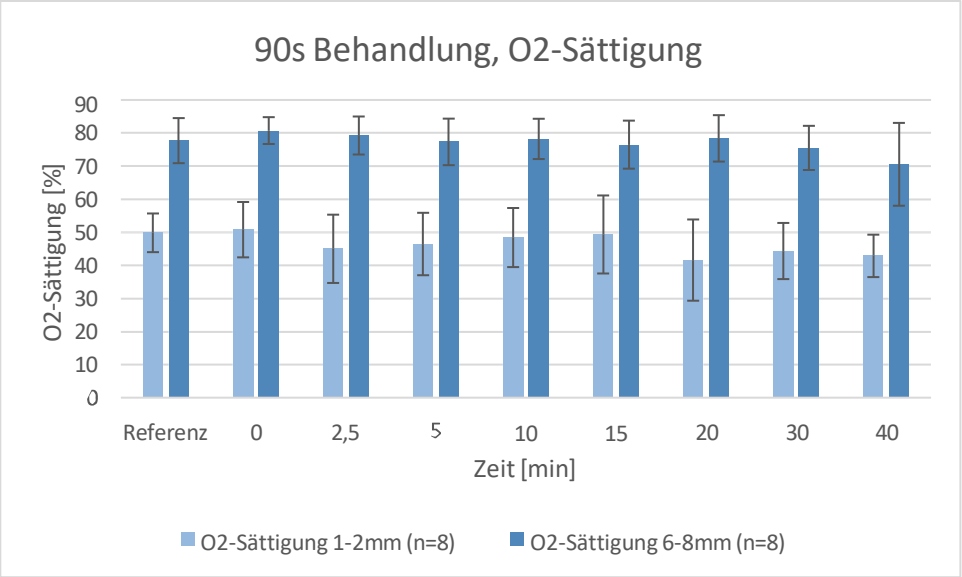


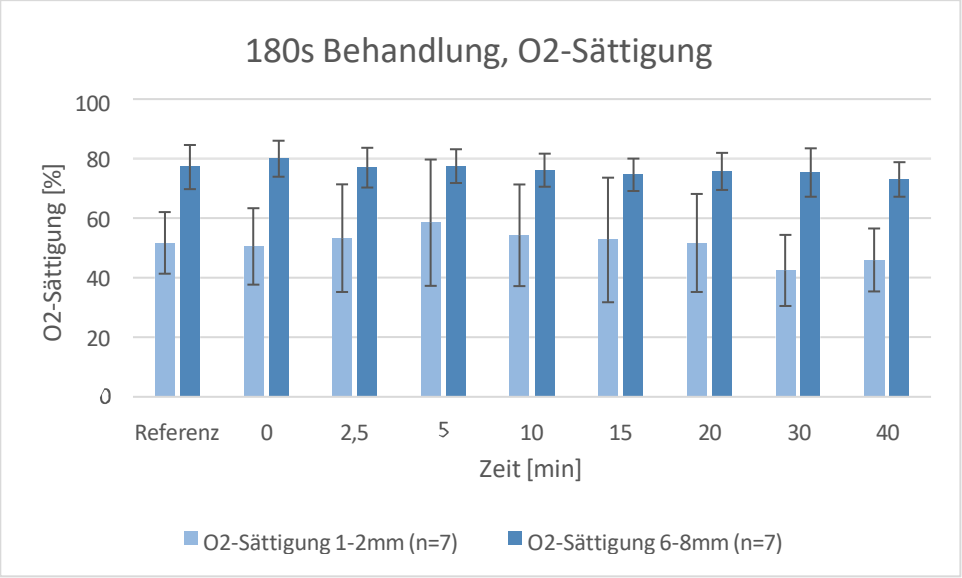
Abbbildungen 8: Mittlere Blutflusswerte in [A.U.] bei unterschiedlichen Behandlungszeit. Die Abbildung zeigt alle mittleren Blutflusswerte, zu den jeweiligen Messzeitpunkten, nach Behandlung in 1-2mm und 6-8mm Hautschichttiefe. Der erste Balken stellt den Referenzwert vor Beginn der Behandlung dar. Der 0 Minutenwert stellt den Blutfluss unmittelbar nach Beendigung der Plasmabehandlung dar.

In der 90s und 180s Behandlung, zeigte sich kein signifikanter Unterschied in Bezug auf den Referenzwert. Bei der 360s Behandlung zeigte sich in den oberflächlichen Schichten, in der durchgeführten, einfachen *repeated measured ANOVA,* dass ein höchst-signifikanter Unterschied zwischen den Messungen bestand. In den anschließenden *Bonferroni Post-Hoc-Test*, ergab sich zum Zeitpunkt 2,5 min und 10 min ein signifikanter Unterschied in Bezug auf den Referenzwert und zum Zeitpunkt 5min ein hochsignifikanter Unterschied in Bezug auf den Referenzwert. (α=0,05)

In den tieferen Hautschichten zeigte sich in der *repeated measured ANOVA*, dass ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Messungen bestand. In den anschließend durchgeführten *Bonferroni Post-Hoc-Test,* ergab sich zum Zeitpunkt 2,5 min und 5 min ein signifikanter Unterschied im Verhältnis zum Referenzwert. (α=0,05)

4.1.2.2. Sauerstoffsättigung und deren Verlauf nach erfolgter Behandlung mit unterschiedlichen Behandlungszeiten.





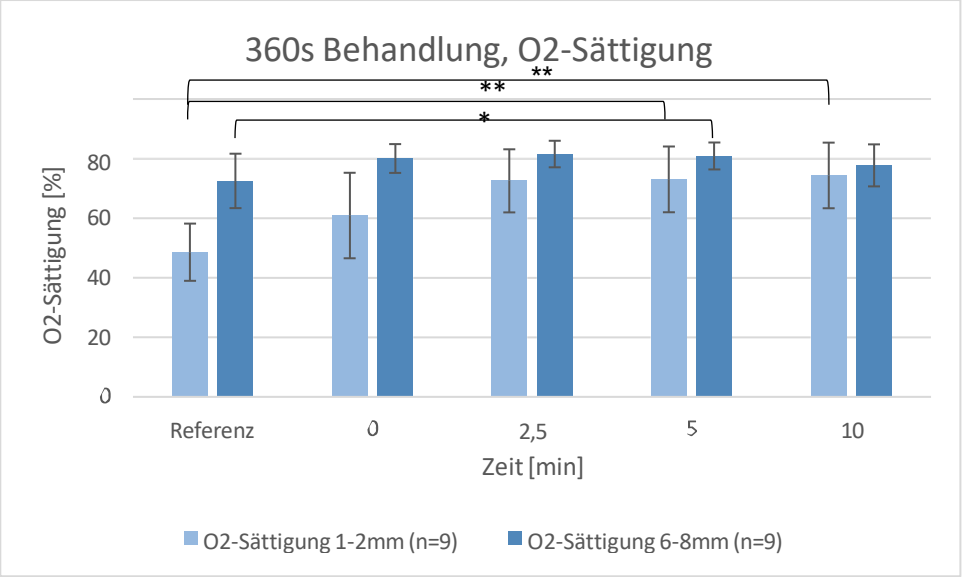
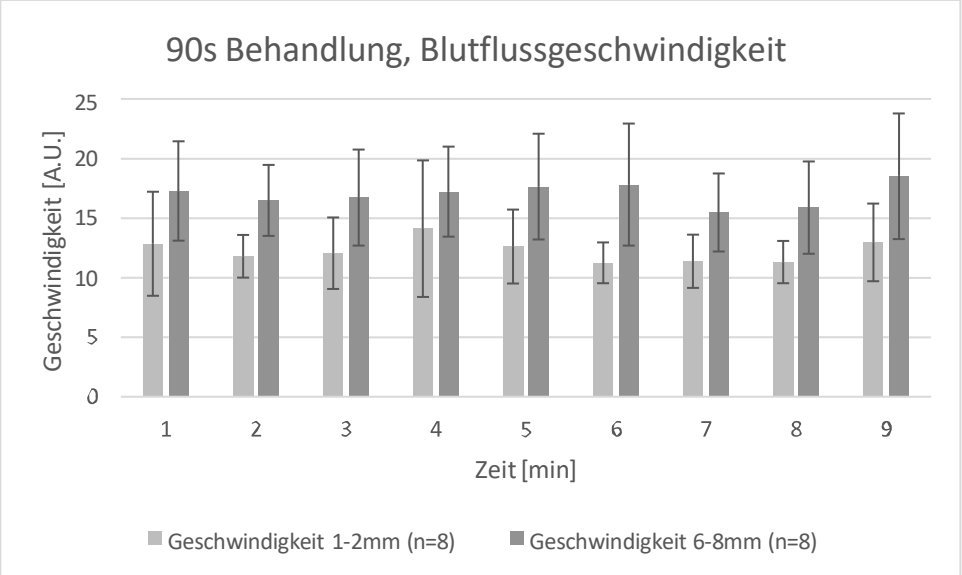


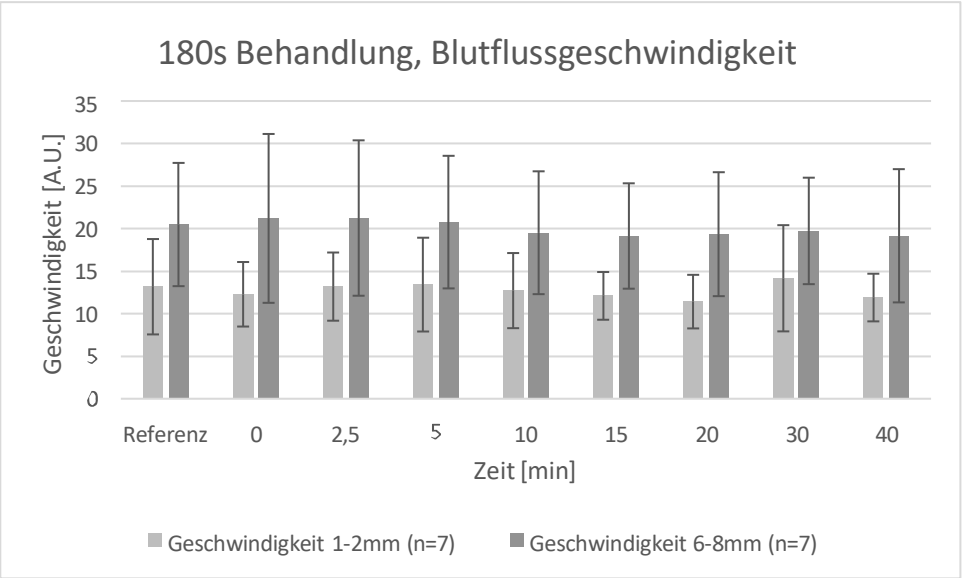
Abbildung 9: Mittlere Sauerstoffsättigungswerte in [%] bei unterschiedlichen Behandlungszeit. Die Abbildungen zeigen alle Sättigungswerte, zu den jeweiligen Zeitpunkten nach der Behandlung in 1-2 und 6-8mm Hautschichttiefen. Der erste Balken stellt den Referenzwert vor Beginn der Behandlung dar. Der 0 Minutenwert stellt die Sauerstoffsättigung unmittelbar nach Beendigung der Plasmabehandlung dar.

Bei der 90s und 180s Behandlungszeit ergab sich kein signifikanter Unterschied. Bei der 360s Behandlungszeit ergab sich, in den oberflächlichen Hautschichten, in der einfachen *repeated measured ANOVA,* ein signifikanter Unterschied. Beim anschließenden *Bonferroni Post-Hoc-Test*, ergab sich zum Zeitpunkt 5 min und 10min, in Bezug auf den Referenzwert, ein hoch-signifikanter Unterschied. (α=0,05)

Die einfache *repeated measured ANOVA* in den tieferen Hautschichten ergab einen signifikanten Unterschied. Beim anschließenden *Bonferronie Post-Hoc-Test,* ergab sich zum Zeitpunkt 5 min, in Bezug auf den Referenzwert, ein signifikanter Unterschied. (α=0,05)

4.1.2.3. Blutflussgeschwindigkeit und dessen Verlauf nach erfolgter Behandlung mit unterschiedlichen Behandlungszeiten.





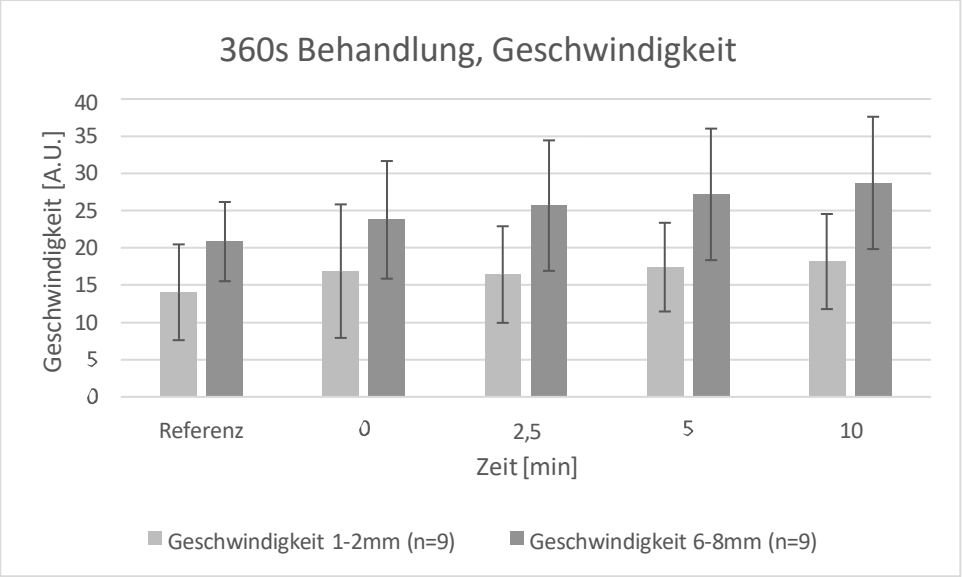
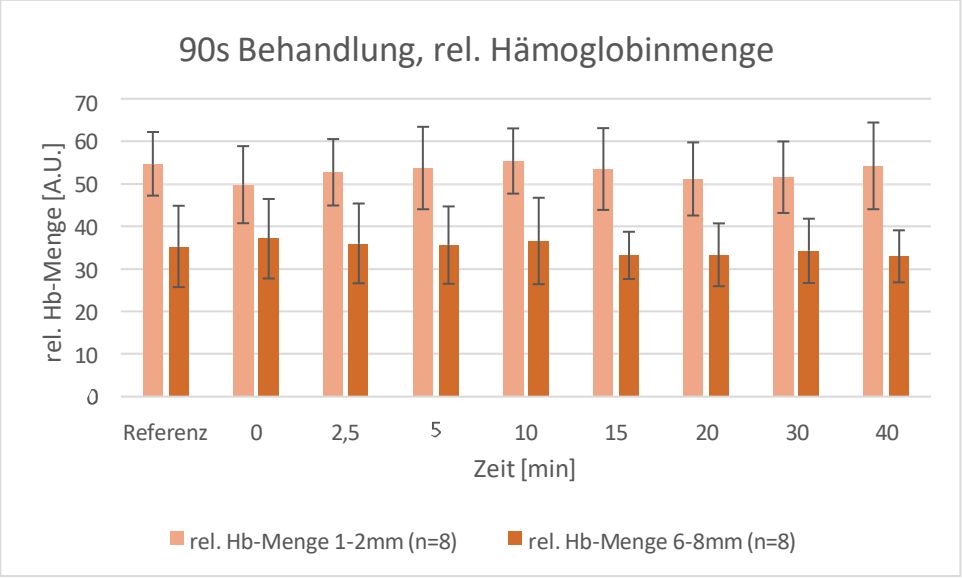
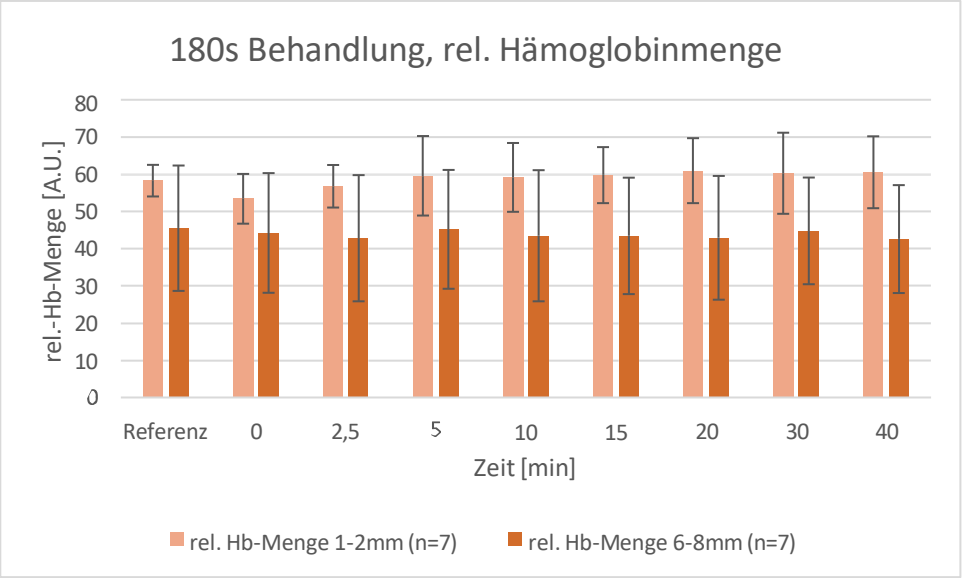


Abbildung 10: Blutflussgeschwindigkeit in [A.U.] bei unterschiedlichen Behandlungszeit. Die Abbildungen zeigen alle mittleren Blutflussgeschwindigkeitswerte, zu den jeweiligen Messzeitpunkten, nach Behandlung in 1-2mm und 6-8mm Hautschichttiefe. Der erste Balken stellt den Referenzwert vor Beginn der Behandlung dar. Der 0 Minutenwert stellt die mittlere Blutflussgeschwindigkeit unmittelbar nach Beendigung der Plasmabehandlung dar

Es ergab sich kein signifikanter Unterschied bei allen durchgeführten Behandlungszeiten und Hautschichten.

4.1.2.4. Relative Hämoglobinmenge und deren Verlauf nach erfolgter Behandlung mit unterschiedlichen Behandlungszeiten.





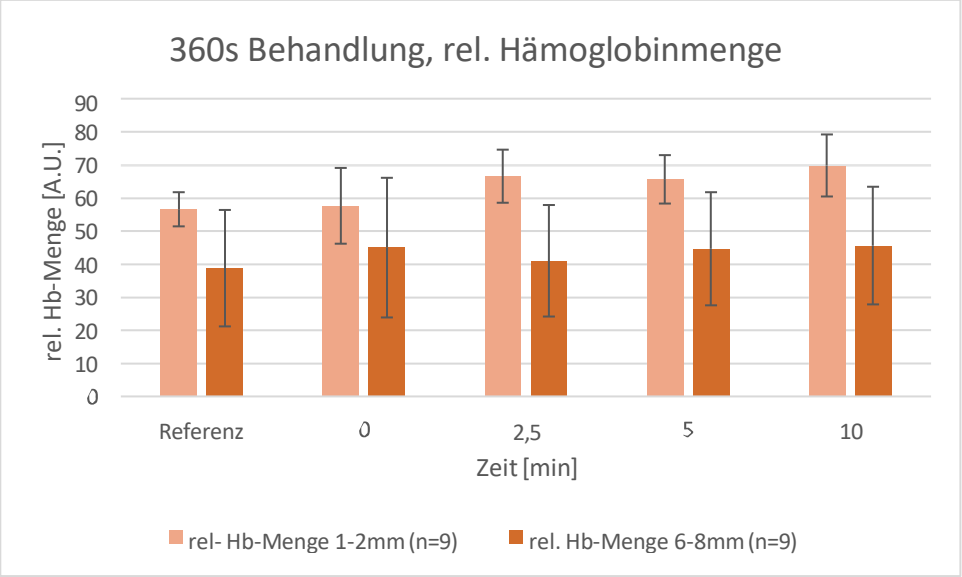
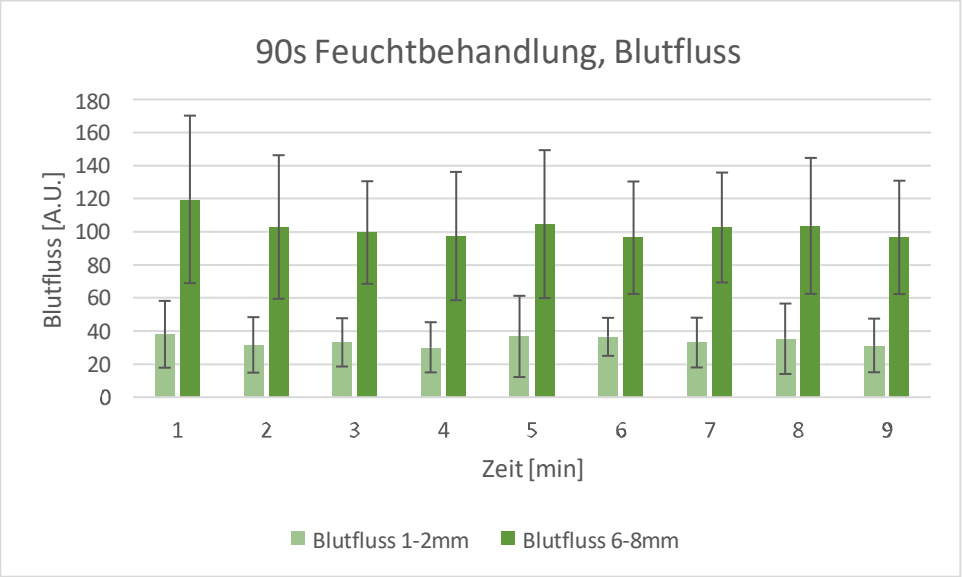


Abbildung 11: Relative Hämoglobinmenge in [A.U.] bei unterschiedlichen Behandlungszeiten. Die Abbildungen zeigen alle relativen Hämoglobinmengen, zu den jeweiligen Messzeitpunkten, nach Behandlung in 1-2mm und 6-8mm Hautschichttiefe. Der erste Balken stellt den Referenzwert vor Beginn der Behandlung dar. Der 0 Minutenwert stellt die relative Hämoglobinmenge unmittelbar nach Beendigung der Plasmabehandlung dar.

Es ergab sich kein signifikanter Unterschied bei allen durchgeführten Behandlungszeiten und Hautschichten.

4.1.3. Behandlungen bei angefeuchteter Haut

4.1.3.1. Blutfluss und dessen zeitlicher Verlauf bei angefeuchteter Haut und anschließender Plasmabehandlung.



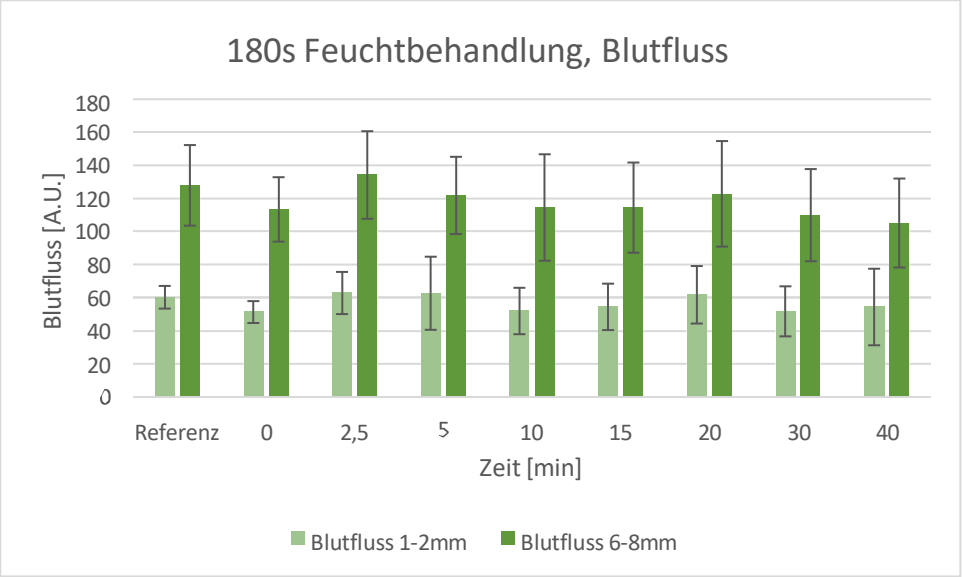
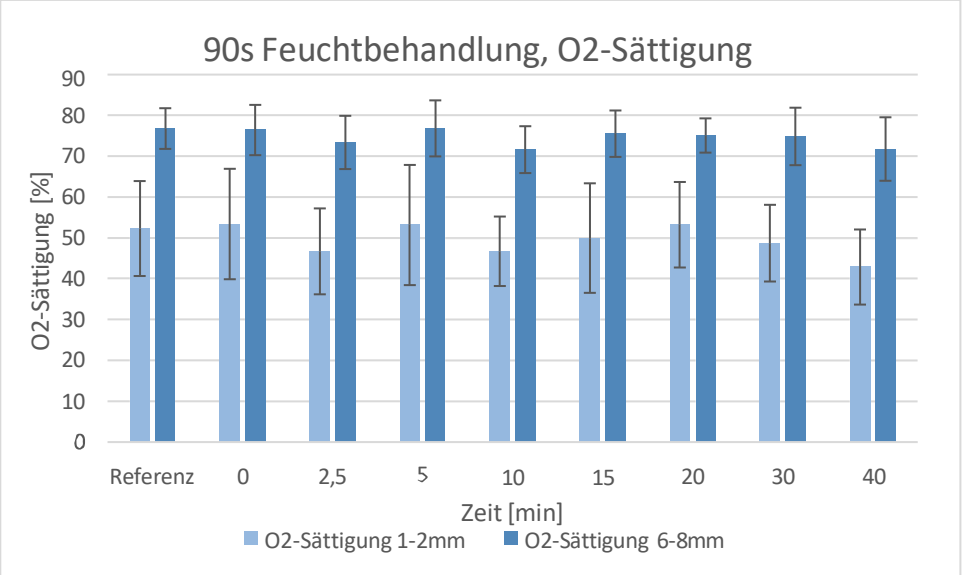


Abbildung 12: Mittlere Blutflusswerte in [A.U.] bei unterschiedlichen Behandlungszeiten. Die Abbildungen zeigen alle mittleren Blutflusswerte, zu den jeweiligen Messzeitpunkten, nach Behandlung in 1-2mm und 6-8mm Hautschichttiefe. Der erste Balken stellt den Referenzwert vor Beginn der Behandlung dar. Der 0 Minutenwert stellt die mittleren Blutflusswerte unmittelbar nach Beendigung der Plasmabehandlung dar.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. (α=0,05)

4.1.3.2. Sauerstoffsättigung und dessen zeitlicher Verlauf bei angefeuchteter Haut und anschließender Plasmabehandlung



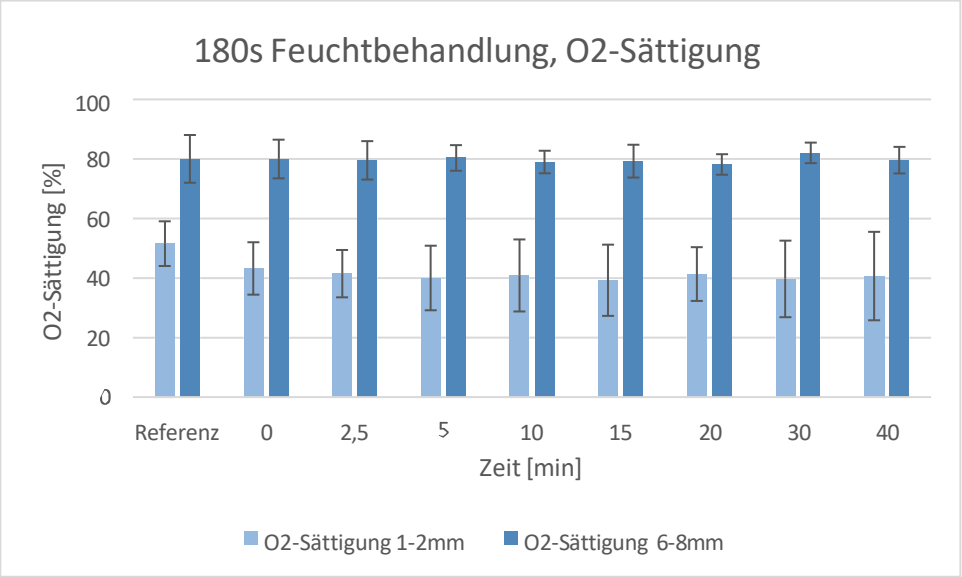
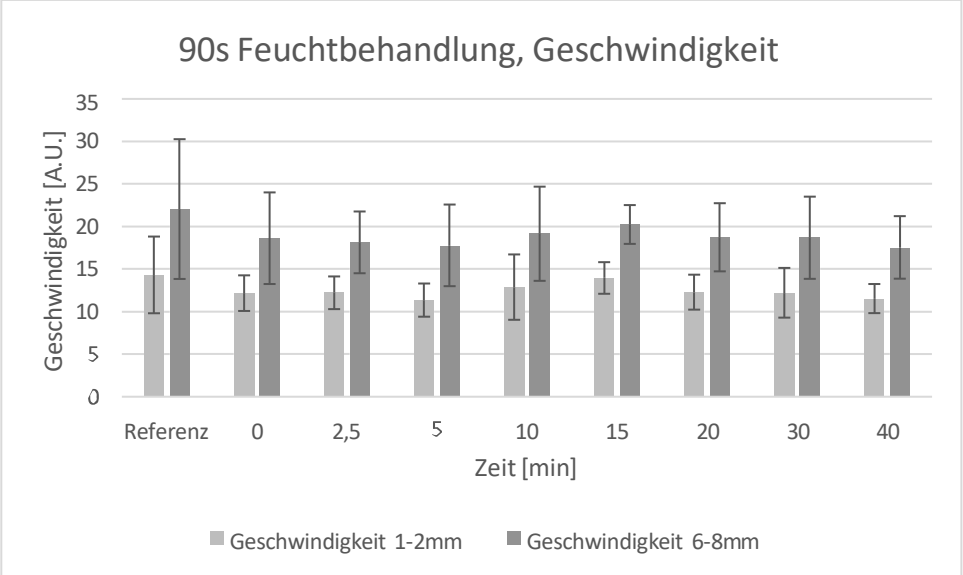


Abbildung 13: Mittlere Sauerstoffsättigung in [%] bei unterschiedlichen Behandlungszeiten. Die Abbildungen zeigen alle mittleren Sauerstoffsättigungswerte, zu den jeweiligen Messzeitpunkten, nach Behandlung in 1-2mm und 6-8mm Hautschichttiefe. Der erste Balken stellt den Referenzwert vor Beginn der Behandlung dar. Der 0 Minutenwert stellt die mittlere Sauerstoffsättigung unmittelbar nach Beendigung der Plasmabehandlung dar.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. (α=0,05)

4.1.3.3. Mittlerer Blutflussgeschwindigkeit und dessen zeitlicher Verlauf bei angefeuchteter Haut und anschließender Plasmabehandlung



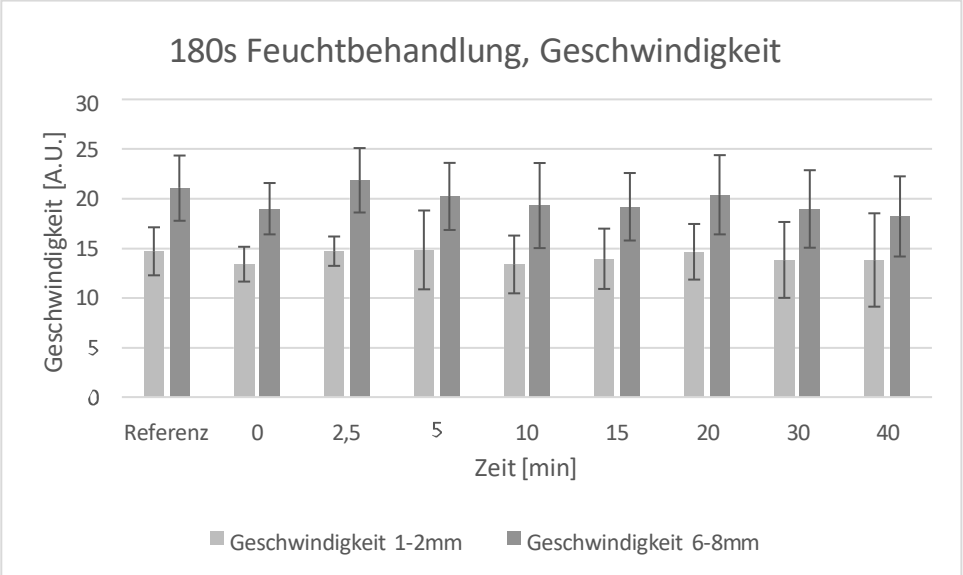
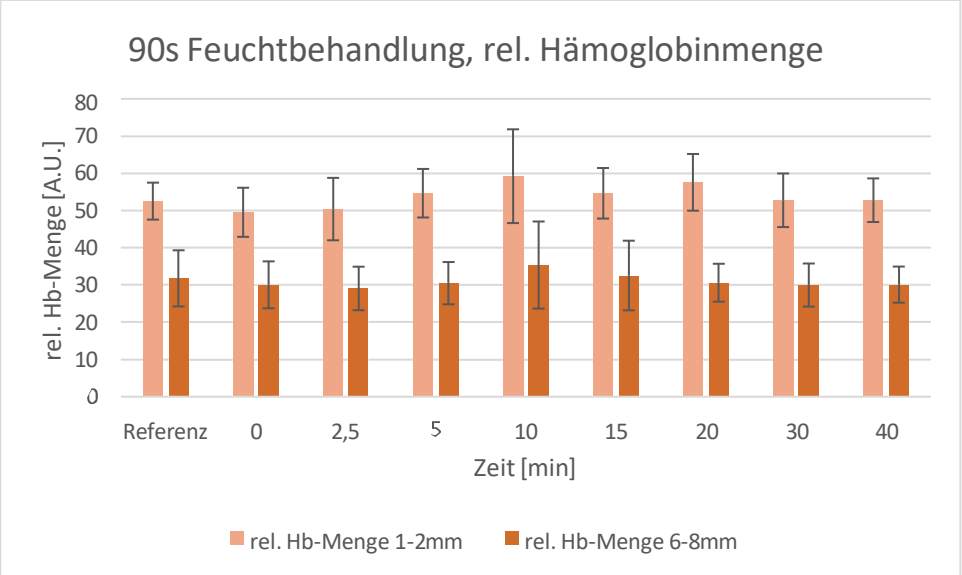


Abbildung 14: Mittlere Blutflussgeschwindigkeit in [A.U.] bei unterschiedlichen Behandlungszeiten. Die Abbildungen zeigen alle mittleren Blutflussgeschwindigkeiten, zu den jeweiligen Messzeitpunkten, nach Behandlung in 1-2mm und 6-8mm Hautschichttiefe. Der erste Balken stellt den Referenzwert vor Beginn der Behandlung dar. Der 0 Minutenwert stellt die mittlere Blutflussgeschwindigkeit unmittelbar nach Beendigung der Plasmabehandlung dar.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. (α=0,05)

4.1.3.4. Relative Hämoglobinmenge und dessen zeitlicher Verlauf bei angefeuchteter Haut und anschließender Plasmabehandlung



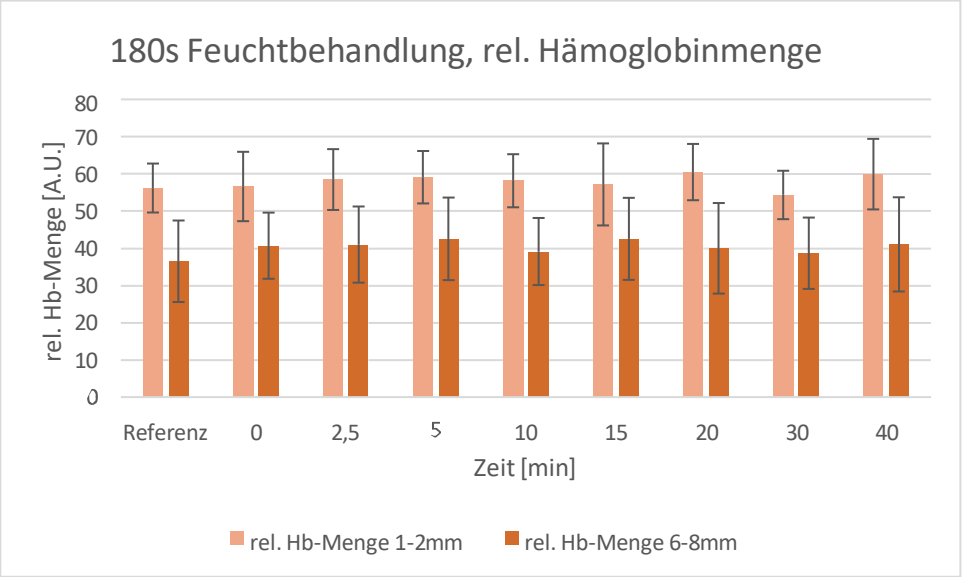


Abbildung 15: Relative Hämoglobinmenge in [A.U.] bei unterschiedlichen Behandlungszeiten. Die Abbildungen zeigen alle relativen Hämoglobinmengen, zu den jeweiligen Messzeitpunkten, nach Behandlung in 1-2mm und 6-8mm Hautschichttiefe. Der erste Balken stellt den Referenzwert vor Beginn der Behandlung dar. Der 0 Minutenwert stellt die relative Hämoglobinmenge unmittelbar nach Beendigung der Plasmabehandlung dar.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. (α=0,05)

4.1.4. Folienbehandlung

4.1.4.1. Bestimmung des Effektes der UV-Reduktion durch die Folie

Vor Durchführung der Behandlung mit der Folie, wurde zunächst, der durch die Folie hervorgerufene UV reduzierende Effekt untersucht. Dabei wurde unterschieden, ob sich die Folien im gespannten Zustand zwischen UV-Lampe und Messergerät befand, oder die Folie Falten geworfen hat. Als Referenzmessung galt jeweils eine Untersuchung ohne Folie

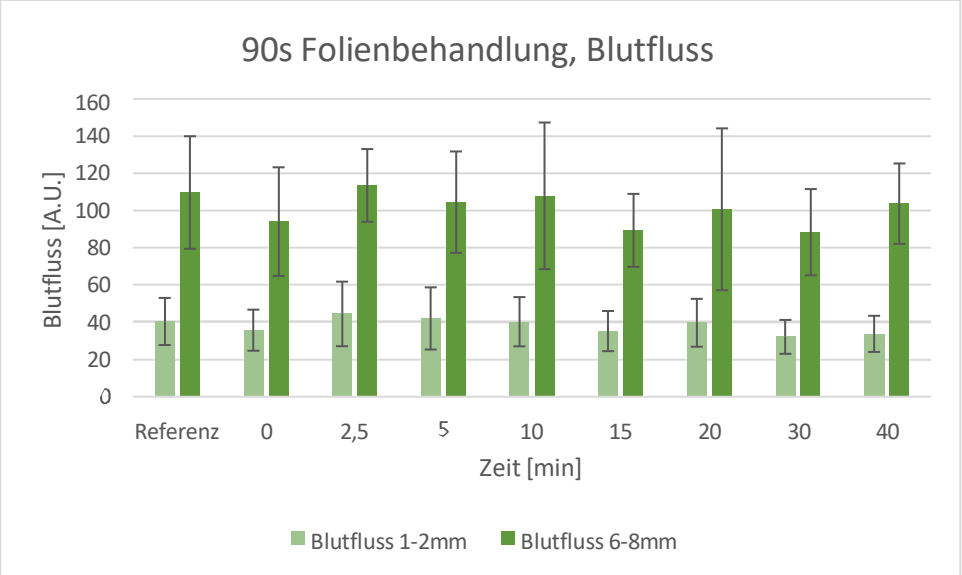
	UV-A	UV-B
Ohne Folie (n=5)	5,682 mW/cm² (SD +/- 0,130)	4,3468 mW/cm² (SD +/- 0,096)
Mit Folie ohne Faltenwurf (n=5)	5,3818 mW/cm² (SD +/- 0,006)	4,095 mW/cm² (SD +/-0,005)
Mit Folie mit Faltenwurf (n=5)	4,996 mW/cm² (SD +/- 0,021)	3,9464 mW/cm² (SD +/- 0,004)

Tabelle Nr.8: Werte der UV-A und UV-B Strahlung in mW/cm². Jeweils ohne Folie, sowie mit eingespannter Folie mit und ohne Faltenwurf.

- Bei angespannter Folie, konnte eine Reduktion der UV-A von 5,53% und der UV-B Strahlung von 6,15% erreicht werden, im Vergleich zur Referenzmessung ohne Folie.
- Bei Folie mit Faltenwurf, konnte eine Reduktion der UV-A Strahlung von 13,7% und der UV-B Strahlung von 10,1% erreicht werden, im Vergleich zur Referenzmessung ohne Folie.

Bei den Behandlungen mit eingespannter Folie zwischen der Hautoberfläche und der Elektrode des Plasmaderm, wurde darauf geachtet, dass die Folie möglichst ohne Falten der Haut eng anlag. Jedoch ließ sich ein Faltenwurf nicht immer komplett vermeiden, so dass der reduzierende Einfluss der Folie, prozentual für die UV-A und UV-B Strahlung zwischen den beiden Werten (mit und ohne Folie) anzunehmen ist.

4.1.4.2. Mittlerer Blutfluss und dessen zeitlicher Verlauf bei anliegender Folie auf der Haut und anschließender Plasmabehandlung



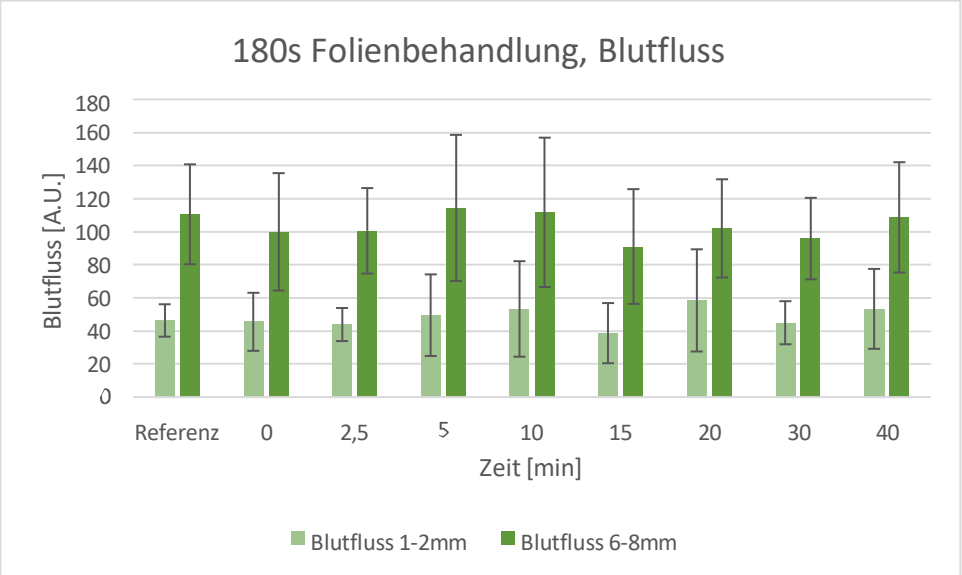
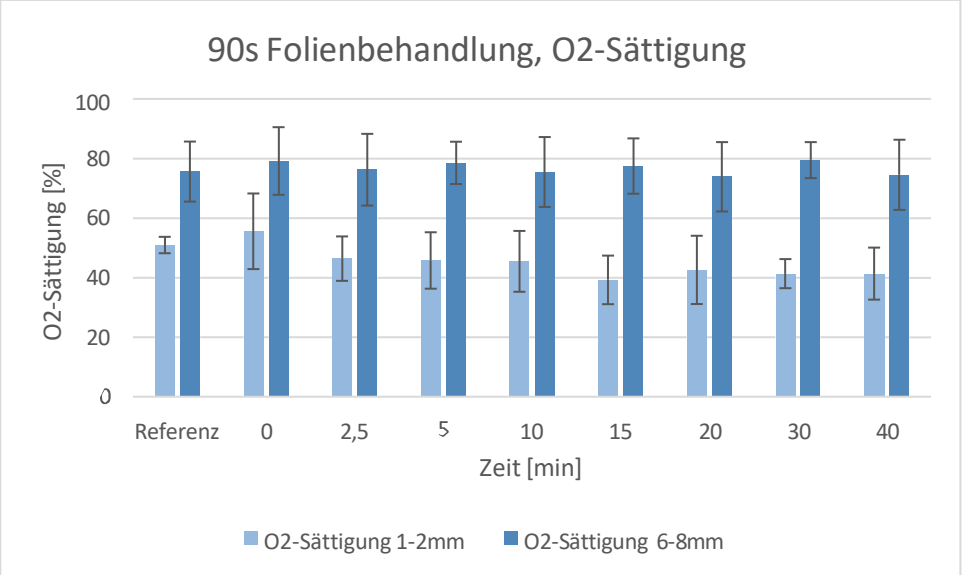


Abbildung 16: Mittlerer Blutfluss in [A.U.] bei unterschiedlichen Behandlungszeiten. Die Abbildungen zeigen alle mittleren Blutflusswerte, zu den jeweiligen Messzeitpunkten, nach Behandlung in 1-2mm und 6-8mm Hautschichttiefe. Der erste Balken stellt den Referenzwert vor Beginn der Behandlung dar. Der 0 Minutenwert stellt die mittleren Blutflusswerte unmittelbar nach Beendigung der Plasmabehandlung dar.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. (α=0,05)

4.1.4.3. Mittlere Sauerstoffsättigung und dessen zeitlicher Verlauf bei anliegender Folie auf der Haut und anschließender Plasmabehandlung



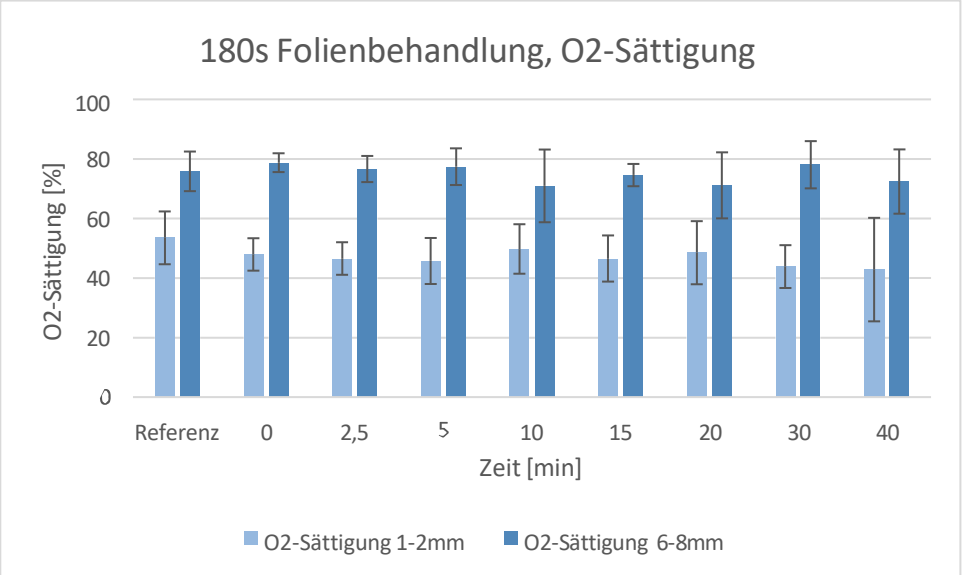
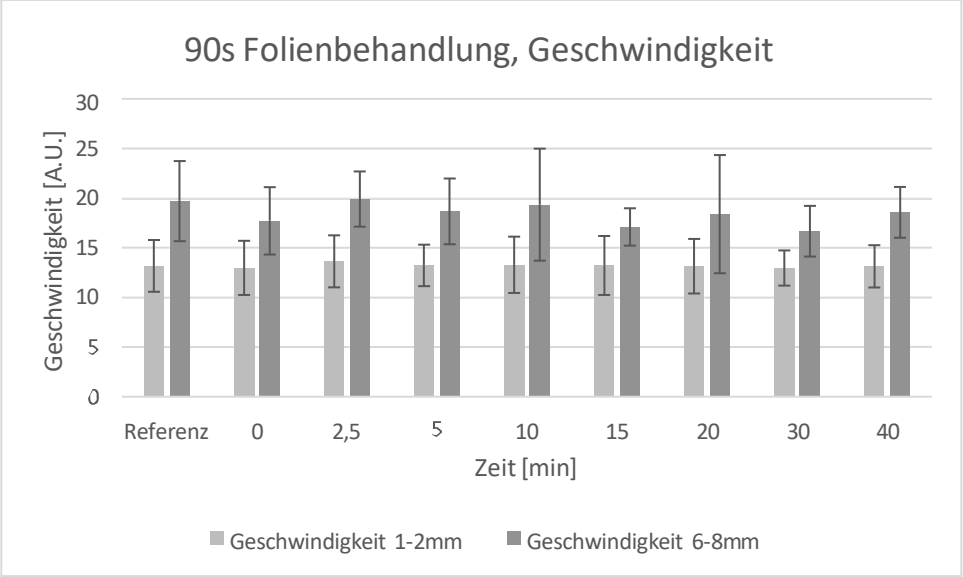


Abbildung 17: Mittlere Sauerstoffsättigung in [%] bei unterschiedlichen Behandlungszeiten. Die Abbildungen zeigen alle mittleren Sauerstoffsättigungswerte, zu den jeweiligen Messzeitpunkten, nach Behandlung in 1-2mm und 6-8mm Hautschichttiefe. Der erste Balken stellt den Referenzwert vor Beginn der Behandlung dar. Der 0 Minutenwert stellt die mittleren Sauerstoffsättigungswerte unmittelbar nach Beendigung der Plasmabehandlung dar.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. (α=0,05)

4.1.4.4. Mittlere Blutflussgeschwindigkeit und dessen zeitlicher Verlauf bei anliegender Folie auf der Haut und anschließender Plasmabehandlung



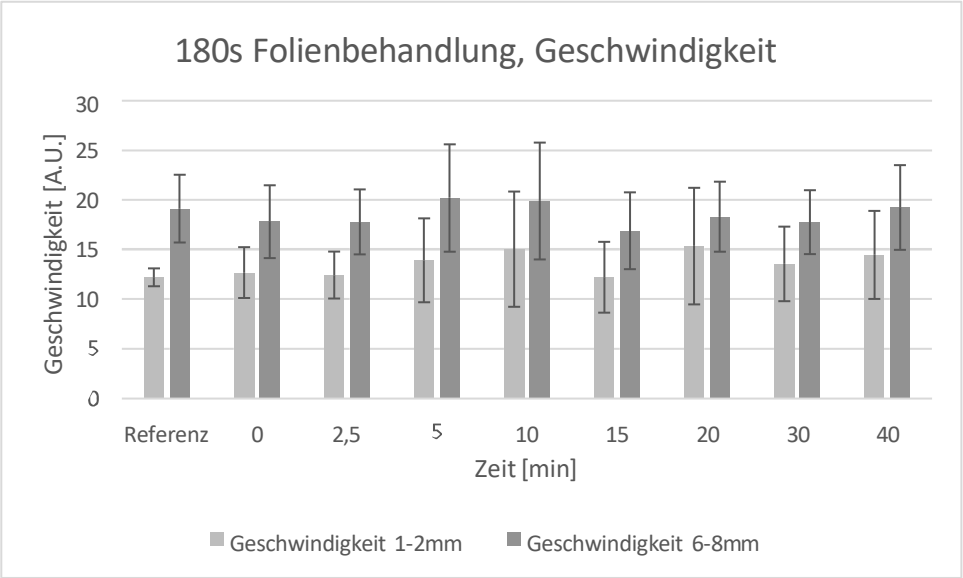
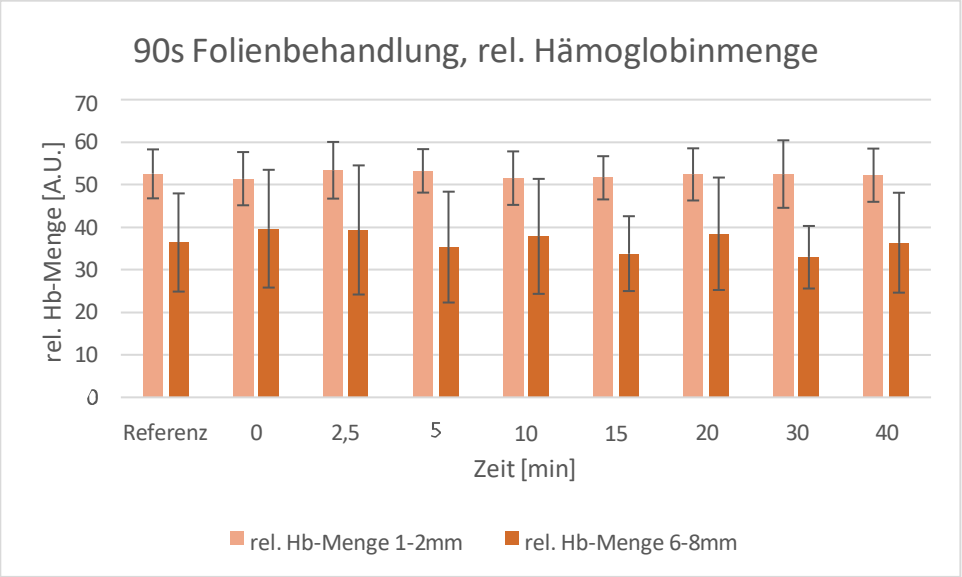


Abbildung 18: Mittlere Blutflussgeschwindigkeit in [A.U.] bei unterschiedlichen Behandlungszeiten. Die Abbildungen zeigen alle mittleren Blutflussgeschwindigkeiten, zu den jeweiligen Messzeitpunkten, nach Behandlung in 1-2mm und 6-8mm Hautschichttiefe. Der erste Balken stellt den Referenzwert vor Beginn der Behandlung dar. Der 0 Minutenwert stellt die mittlere Blutflussgeschwindigkeit unmittelbar nach Beendigung der Plasmabehandlung dar.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. (α=0,05)

4.1.4.5. Relative Hämoglobinmenge und dessen zeitlicher Verlauf bei anliegender Folie auf der Haut und anschließender Plasmabehandlung



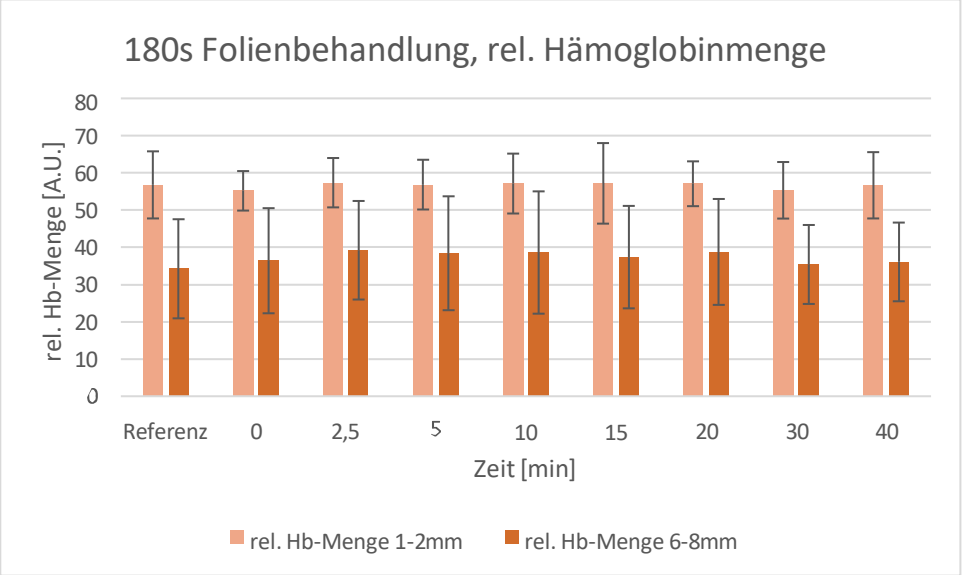


Abbildung 19: Relative Hämoglobinmenge in [A.U.] bei unterschiedlichen Behandlungszeiten. Die Abbildungen zeigen alle relativen Hämoglobinmengen, zu den jeweiligen Messzeitpunkten, nach Behandlung in 1-2mm und 6-8mm Hautschichttiefe. Der erste Balken stellt den Referenzwert vor Beginn der Behandlung dar. Der 0 Minutenwert stellt die relative Hämoglobinmenge unmittelbar nach Beendigung der Plasmabehandlung dar.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (α=0,05)

TUNEL-Färbungen

Apoptoserate [%]	3mm Schichttiefe	7mm Schichttiefe
90 Sekunden	0,0034% n=9	0,01% n=5
360 Sekunden	0,0039% n=11	0,0024% n=6
Negativ-Kontrolle	0,0035% n=11	0,0034% n=9

Tabelle Nr.9: Mittelwerte der Apoptoseraten der Spalthautpräparate von 3mm und 7mm Dicke, bei 90sekündiger und bei 360s Behandlungszeit mit dem Plasmaderm.

In den jeweiligen Vergleichen zur Negativkontrolle, ergab sich jeweils kein signifikanter Unterschied in einer anschließenden ANOVA.

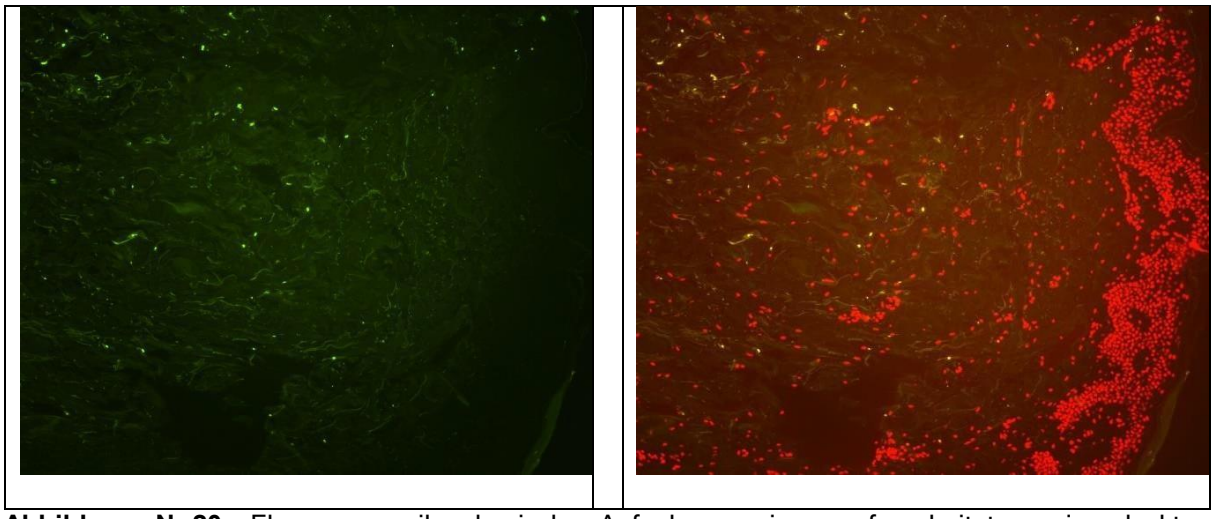


Abbildung Nr.20: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines aufgearbeiteten, eingedeckten Mikrotomschnittes. Links fluoreszieren alle durch DAPI-Färbung markierten, in Apoptose befindlichen Zellen. Rechts ist ein Überlagerungsbild zu sehen, welches das linke Bild, mit allen durch eine Hoechst Kernfärbung markierten, nicht in Apoptose befindlichen Zellen kombiniert. Durch Zählung aller sich im Gesichtsfeld befindlichen Zellen und anschließende in Verhältnissetzung der apoptotischen Zellen (DAPI Färbung), zu den intakten Zellen (Hoechst Färbung), lässt sich die Apoptoserate ermitteln.

5. Diskussion

5.1 Durchblutungssteigernde Effekte in oberflächlichen und tiefen Hautschichten

Während der Behandlung der Haut mit dem PlasmaDerm, mit der vom Hersteller empfohlenen Behandlungszeit von 90s, konnte über einen Beobachtungszeitraum von 40 Minuten kein durchblutungssteigernder Effekt festgestellt werden. Es konntenkeine signifikanten Steigerungen des Blutflusses, der relativen Hämoglobinmenge undder Durchblutungsgeschwindigkeit ermittelt wurden. Zudem hatte auch eine singuläre Druckbehandlung von 90s mit der Handelektrode, ohne Erzeugung eines Plasmas, keinerlei Auswirkungen auf diese Parameter. Auch eine Verdopplung der Behandlungszeit auf 180s änderte daran, über den Beobachtungszeitraum von 40min, nichts. Dies betraf sowohl die reine Druckbehandlung als auch die Plasmabehandlung mit der Handelektrode. Erst bei einer weiteren Erhöhung der Plasmabehandlungszeit auf 360s konnten signifikante Effekt festgestellt werden. Der Beobachtungszeitraum der 360s Behandlung erstreckte sich über 10 Minuten. In den oberflächlichen Schichten (1-2mm), wies der Blutfluss eine signifikante Erhöhung zumZeitpunkt 2,5 min und 10 min nach der Behandlung im Vergleich zur Referenzmessung auf. Zum Zeitpunkt 5 min nach Behandlung, zeigte sich sogar einehochsignifikante Erhöhung. In den tieferen Schichten (6-7mm) konnte eine signifikante Blutflusssteigerung zum Zeitpunkt 2,5 min und 5 min ermittelt werden. Allerdings waren auch in der 360s Druckbehandlung, in oberflächlichen Schichten, ohne Plasmaaktivierung, hochsignifikante Steigerungen des Blutflusses zum Zeitpunkt 2,5 min, 5 min und 10 min im Vergleich zur Referenzmessung detektierbar. In den tiefen Schichten (6-7mm) war zum Zeitpunkt 2,5 min ein signifikanter und zum Zeitpunkt 5min und 10 min ein hochsignifikanter Anstieg vorhanden. In Zusammenschau aller Ergebnisse und unter Berücksichtigung, der ebenfalls vorhandenen signifikanten Steigerungen im Behandlungszeitraum von 360s bei der Druckbehandlung, ohne Plasmaaktivierung, kann von keinem durchblutungssteigernden Effekt durch eine Plasmabehandlung ausgegangen werden.

Das Ergebnis widerspricht einigen vorrausgegangenen Studien, welche auf ähnliche Weise durchgeführt worden sind. Borchardt et al, konnte 2017, bei einer gleich angelegten Untersuchungsreihe, bestehend aus 10 Probanden, ebenfalls bei unterschiedlichen Behandlungszeiten von bis zu 270s, eine signifikante Steigerung des Blutflusses um mehr als das Doppelte nachweisen. Auch hier bei, wurde der

Einflussfaktor des Drucks ohne Plasmabehandlung auf das Behandlungsareal erfasst. Es wurde die gleiche Plasmaquelle, und zur Erfassung der Durchblutungsparameter wurde ebenfalls ein O2C-Gerät der Firma LEA-Medizin Technik verwendet. Der Druck hatte zwar einen tendenziell leichten Einfluss auf die Durchblutung, jedoch fiel dieser erst deutlich signifikant nach der Plasmabehandlung aus, so dass man zu dem Schluss kam, dass der Effekt spezifisch durch die Behandlung mit Plasma hervorgerufen wurde und die Druckeinwirkung keine wesentliche Rolle spielte. Eine weitere Studie von Kisch et al., kam 2016 mit 20 Probanden, welche 90s behandelt wurden, bei ähnlichen Untersuchungsbedingungen, mit gleichen Gerätschaften zu dem Schluss, dass eine Plasmabehandlung den Blutfluss signifikant steigern kann. Hierbei konnten Steigerungen von über 70% erfasst werden. Der Einflussfaktor des Drucks wurde in dieser Studie allerdings nicht berücksichtigt. Bei klinischen Studien über kaltes, atmosphärisches Plasma, erzeugt mit dem PlasmaDerm, konnten zudem günstige Beeinflussungen von chronisch, venösen Wunden nachweisen werden. (Brehmer et al 2015). Eine mögliche Erklärung der besseren Wundheilung, wäre beispielsweise eine verbesserte Mikrozirkulation oder aber auch eine desinfizierende Wirkung und damit günstige Beeinflussung des mikrobiellen Biofilms (Daeschlein et al. 2015).

Trotz aller Sorgfalt, die während der Durchführung meiner Untersuchungen aufgebracht wurde, sind rückblickend mögliche Einflussfaktoren, die das abschließende Ergebnis beeinträchtigen könnten, nicht mit gänzlicher Sicherheit auszuschließen. Vor allem, wenn man die, vergleichsweise, geringe Probandenzahl berücksichtigt und die relativ hohen Standardabweichungen, könnten solche Faktoren einen entscheidenden und großen Einfluss auf das Gesamtergebnis gehabt haben. Der ausgeübte Druck des O2C Sensors zur Erfassung der Durchblutungs- und Sättigungsparameter und der ausgeübte Druck durch das Plasmahandgerät, wurde in der Studie von Borchardt et al 2017 beispielsweise objektiv erfasst. So übte die Sensorelektrode einen definierten Druck von 10g/cm² und die Handelektrode des Plasmagerätes einen Druck von 130g/cm² aus. Selbstverständlich wurde auch in der von mir durchgeführten Studie darauf geachtet für alle Messungen den gleichen, ausreichenden und möglichst sanften Anpressdruck zu verwenden. Dies wurde jedoch subjektiv und nicht objektivierbar durchgeführt. Ein weiterer, bekannter Einflussfaktor auf die Durchblutung stellt die Temperatur dar. Zwar wurden die Untersuchungen immer in der gleichen Räumlichkeit, mit annährend gleicher Umgebungstemperatur

von knapp über 21°C durchgeführt. Jedoch gaben einige, wenige Probanden während des stillen und des notwendig bewegungsarmen Sitzens, eine Kälteempfindung an. Um abschließend die Frage beantworten zu können ob kaltes, atmosphärisches Plasma eine Auswirkung auf die Mikrozirkulation hat, sind weitere Studien notwendig, mit einer größeren Probandenzahl und mit feineren und objektivierbareren Untersuchungsbedingen. Hierbei wäre aus meiner Sicht unter anderen vor allem auf die Temperatur zu achten. So könnte eine Raumtemperatur von nur knapp über 21°C für einige Personen, beim stillen, bewegungsarmen, langen Sitzen eine Kälteempfindung auslösen, welche, letztendlich einen vermeintlichen, durch die Plasmabehandlung vasodilatatorischen Effekt verhindert oder minimiert. Für zukünftige Studien würde ich empfehlen, eine leicht höhere Raumtemperatur zu wählen von knapp 24-25°C und eine längere Akklimatisierungszeit der Probanden, von mindestens einer halben Stunde, statt 5 Minuten wie in meiner Studie, um ggf. Anpassungen vornehmen zu können. Die Ergebnisse meiner Studie, weisen auf einen Zusammenhang zwischen Druck und durchblutungssteigernden Effekt hin. Ich würde empfehlen auch dieses in zukünftigen, ähnlichen Studiendesigns zur Klärung der genannten Fragen zu berücksichtigen und mit objektivierbaren, ggf. auch wechselnden Drücken auf der Behandlungsstelle zu experimentieren, um einen etwaigen Einfluss auszuschließen oder klar definieren zu können.

5.2. Sauerstoffsättigung in oberflächlichen und tiefen Hautschichten

Ähnlich wie bei der Untersuchungsreihe bezüglich der durchblutungssteigernden Auswirkungen, konnte weder bei der 90s noch bei der 180s Untersuchungsreihe ein signifikanter Unterschied über einen Zeitraum von 40 Minuten beobachtet werden. Bei der 360s Behandlungszeit, konnte über einen Beobachtungszeitraum von 10 Minuten, eine hochsignifikante Erhöhung der Sauerstoffsättigung in den oberflächlichen Hautschichten zum Zeitpunkt 2,5 min und 5 min nach der Plasmabehandlung gemessen werden, im Vergleich zur Referenzmessung vor der Behandlung. In den tieferen Hautschichten konnte ein signifikanter Anstieg zum Zeitpunkt 5 min nach der Plasmabehandlung detektiert werden. Die reine Druckbehandlung, ohne Plasmaaktivierung, wies eine signifikante Erhöhung der Sauerstoffsättigung 5min nach der Behandlung in den oberflächlichen Schichten auf. In den tiefen Schichten konnte keine signifikante Änderung festgestellt werden. Auch hierbei lässt sich eine etwaige Auswirkung der Einflussgröße des Drucks nicht sicher ausschließen. Jedoch

fällt diese geringer aus als noch in den vorherigen Betrachtungen bezüglich der Durchblutungsparameter.
In einigen Studien mit ähnlichen Studiendesign, konnte eine Steigerung der Sauerstoffsättigung festgestellt werde. Beispielsweise konnte Kisch et al 2016, in oberflächlichen Hautschichten, signifikante Erhöhungen um 25% nachweisen, welche ca. 8 Minuten anhielten.
Auch hier bieten sich ähnliche Empfehlungen an, wie bei der Beantwortung der Frage bezüglich der etwaigen durchblutungssteigernden Effekte eine Plasmabehandlung. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Studien mit einer größeren Anzahl an Probanden und eine weitere Minimierung der Störgrößen, vor allem der Temperatur und Druckeinwirkung, vorgenommen werden sollten, um eine sichere abschließende Beurteilung vornehmen zu können.

5.3. UV-Strahlungseffekte auf die Durchblutung und Oxygenierung

Bei Entwicklung des Studiendesigns, wurde zunächst aufgrund einiger, weniger voraus gegangener Studien, von einer förderlichen Wirkung auf Durchblutung und Oxygenierung ausgegangen. Daher ist diese ursprünglich geplante Untersuchungsreihe, zur Beantwortung der Frage, ob es einen Einfluss gibt, welcher durch die UV-Strahlung vermittelt wird, irrelevant geworden bzw. kann nicht beantwortet werden.
Da bei Generierung eines Plasmas immer auch ein gewisser Anteil an UV-Strahlung emittiert wird (Heinlin et al., 2011), wäre es von Interesse gewesen, ob und wie groß ein hierdurch vermittelter Effekt auf die Durchblutung und Oxygenierung ist. Zusammenfassend sei hier vollständigkeitshalber nochmal erwähnt, dass während der Untersuchungsreihe mit UV-Strahlung reduzierender Folie, über den Beobachtungszeitraum von 40min, bei 90s und 180s Behandlungszeit, kein signifikanter Effekt auf die Durchblutung und/oder Oxygenierung festgestellt werden konnte. Ich würde für zukünftige Studien mit ähnlichen Studiendesgin, den Einsatz einer dickeren oder spezielleren Folie anraten, da der UV reduzierende Effekt, durch die gewählte handelsübliche Folie relativ gering ausfiel.

5.4. Feuchtigkeitsvermittelte Effekte auf die Durchblutung und Oxygenierung

Ähnlich wie die Fragestellung bezüglich der UV-Strahlungsbedingten Einflüsse auf Durchblutung und/oder Oxygenierung, kann auch diese nicht abschließend, aus den bereits erwähnten Gründen, beantwortet werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass während der Untersuchungsreihe mit angefeuchteter Haut auf der Behandlungsstelle und daran anschließender Behandlung durch den PlasmaDerm, über den Beobachtungszeitraum von 40min, bei 90s und 180s Behandlungszeit, kein signifikanter Effekt auf die Durchblutung und/oder Oxygenierung festgestellt werden konnte.

5.2. Sind toxische Effekte durch eine Plasmabehandlung vorhanden

Im Vergleich zur unbehandelten Negativkontrolle gab es weder bei der 90s Behandlungszeit noch bei der 360s Behandlungszeit der Spalthaupräparate, sowohl in 3mm, als auch in 7mm Hautschichten, eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate. Ein toxischer, schädlicher Effekt konnte hier also nicht nachgewiesen werden.
Dies deckt sich mit bereits vorherigen Studien, welche weder eine erhöhte Mutagenität (Boxhammer et al. 2013), noch eine erhöhte Apoptoserate (Arndt et al2013, Heuer at al.) beim Einsatz vom kalten, atmosphärischen Plasma zeigen konnten. Daher komme ich auch hier zu dem Schluss, dass der Einsatz kalten, atmosphärischen Plasmas keine toxische Wirkung entfaltet und nicht schädlich ist.

Literaturverzeichnis

- Andrews, T., and Tait, P.G. (1860). On the volumetric relations of ozone, and the action of the electrical discharge on oxygen and other gases. Philosophical Transactions of the Royal Society of London *150*, 113–131.
- Arndt et al. Cold Atmospheric Plasma (CAP) Changes Gene Expression of Key Molecules of the Wound Healing Machinery and Improves Wound Healing In Vitro and In Vivo. PloS One 8 (2013)
- Augustin, M., et al., Quality of life evaluation in wounds: validation of the Freiburg Life Quality Assessment-wound module, a disease-specific instrument. Int Wound J, 2010. 7(6): p. 493-501.
- Bekeschus, S., Kolata, J., Winterbourn, C., Kramer, A., Turner, R., Weltmann, K.D., Bröker, B., and Masur, K. (2014). Hydrogen peroxide: A central player in physical plasma-induced oxidative stress in human blood cells. Free Radical Research *48*, 542–549.
- Benninghoff, Drenckhahn, Anatomie Band 2, Auflage 16 von 2004, Kapitel 14, Haut und Hautanhangsgebilde, S.776-796
- Bonizzoni, G., and Vassallo, E. (2002). Plasma physics and technology; industrial applications. Vacuum *64*, 327–336.
- Borchardt, Thomas; Ernst, Jennifer; Helmke, Andreas; Tanyeli, Murat; Schilling, Arndt F.; Felmerer, Gunther; Vioel, Wolfgang (2017): Effect of direct cold atmospheric plasma (diCAP) on microcirculation of intact skin in a controlled mechanical environment. In: Microcirculation
- Boxhammer et al., Investigation of the mutagenic potential of cold atmospheric plasma at bactericidal dosages. Mutation Res. 753 (2013) 23-28
- Brehmer, F., Haenssle, H.A., Daeschlein, G., Ahmed, R., Pfeiffer, S., Görlitz, A., Simon, D., Schön, M.P., Wandke, D., and Emmert, S. (2015). Alleviation of chronic venous leg ulcers with a hand-held dielectric barrier discharge plasma generator (PlasmaDerm® VU-2010): results of a monocentric, two-armed, open, prospective, randomized and controlled trial (NCT01415622). Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology *29*, 148-155.
- Broughton, G., Janis, J.E., and Attinger, C.E. (2006). The Basic Science of Wound Healing: Plastic and Reconstructive Surgery *117*, 12S–34S.
- Brun, P., et al., Antibacterial efficacy and mechanisms of action of low power atmospheric pressure cold plasma: membrane permeability, biofilm penetration and antimicrobial sensitization. J Appl Microbiol, 2018. 125(2): p. 398-408
- Cannon, R.O., Schechter, A.N., Panza, J.A., Ognibene, F.P., Pease-Fye, M.E., Waclawiw, M.A., Shelhamer, J.H., and Gladwin, M.T. (2001). Effects of inhaled nitric oxide on regional

blood flow are consistent with intravascular nitric oxidedelivery. The Journal of Clinical Investigation *108*, 279–287.

- Cao, Z., Walsh, J.L., and Kong, M.G. (2009). Atmospheric plasma jet array in parallel electric and gas flow fields for three-dimensional surface treatment. Applied Physics Letters *94*, 21501.
- Chatraie, M., et al., In vivo study of non-invasive effects of non-thermal plasma in pressure ulcer treatment. Sci Rep, 2018. 8(1): p. 5621
- d'Agostino, R., Favia, P., Oehr, C., and Wertheimer, M.R. (2005). Low-Temperature Plasma Processing of Materials: Past, Present, and Future. Plasma Processes and Polymers *2*, 7–15.
- Daeschlein, G., Scholz, S., Ahmed, R., Majumdar, A., von Woedtke, T., Haase, H., Niggemeier, M., Kindel, E., Brandenburg, R., Weltmann, K.D., et al. (2012). Cold plasma is well-tolerated and does not disturb skin barrier or reduce skin moisture. JDDG: Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft *10*, 509–515.
- Daeschlein, Georg; Napp, Matthias; Podewils, Sebastian von; Scholz, Sebastian; Arnold, Andreas; Emmert, Steffen et al. (2015): Antimicrobial Efficacy of a Historical High-Frequency Plasma Apparatus in Comparison With 2 Modern, Cold Atmospheric Pressure Plasma Devices. In: Surgical innovation 22, 394–400
- Delben, J.A., Zago, C.E., Tyhovych, N., Duarte, S., and Vergani, C.E. (2016). Effect of Atmospheric-Pressure Cold Plasma on Pathogenic Oral Biofilms and In Vitro Reconstituted Oral Epithelium. PloS One *11*, e0155427.
- Diener, H., et al., Revaskularisation und Amputation bei kritischer Ischämie. Gefässchirurgie, 2010. 15(1): p. 20-32.
- Ebert, U. (2009). Wenn der Funke überspringt. Physik Journal *8*, 39.
- Elsaie, M.L., and Kammer, J.N. (2008). Evaluation of plasma skin regeneration technology for cutaneous remodeling. Journal of Cosmetic Dermatology *7*, 309–311.
- Emmert, S., Brehmer, F., Hän\s sle, H., Helmke, A., Mertens, N., Ahmed, R., Simon, D., Wandke, D., Maus-Friedrichs, W., Däschlein, G., et al. (2013). Atmospheric pressure plasma in dermatology: Ulcus treatment and much more. Clinical Plasma Medicine *1*, 24–29.
- Foster, M.W., T.J. McMahon, and J.S. Stamler, S-nitrosylation in health and disease. Trends in Molecular Medicine, 2003. 9(4): p. 160-168.
- Frank, S., Kämpfer, H., Wetzler, C., and Pfeilschifter, J. (2002). Nitric oxide drives skin repair: novel functions of an established mediator. Kidney International *61*, 882–888.
- Fridman, A. (2012). Plasma Chemistry (Cambridge: Cambridge University Press).
- Furchgott, R.F., and Vanhoutte, P.M. (1989). Endothelium-derived relaxing and contracting factors. The FASEB Journal *3*, 2007–2018.

- Ginsberg, G.G., Barkun, A.N., Bosco, J.J., Burdick, J.S., Isenberg, G.A., Nakao, N.L., Petersen, B.T., Silverman, W.B., Slivka, A., and Kelsey, P.B. (2002). The argon plasma coagulatorFebruary 2002. Gastrointestinal Endoscopy *55*, 807–810.
- Gosain, A. and L.A. DiPietro, Aging and wound healing. World J Surg, 2004. 28(3): S. 321-6. 19.
- Greenman, R.L., et al., Early changes in the skin microcirculation and muscle metabolism of the diabetic foot. Lancet, 2005. 366(9498): p. 1711-7
- Guo, S. and L.A. Dipietro, Factors affecting wound healing. J Dent Res, 2010.: S. 219-29.
- Guo, S. and L.A. Dipietro, Factors affecting wound healing. J Dent Res, 2010. 89(3): p. 219-29.
- Haertel, B., Wende, K., von Woedtke, T., Weltmann, K.D., and Lindequist, U. (2011). Non-thermal atmospheric-pressure plasma can influence cell adhesion molecules on HaCaT-keratinocytes. Experimental Dermatology *20*, 282–284.
- Haertel, B., Woedtke, T. von, Weltmann, K.-D., and Lindequist, U. (2014). Non-Thermal Atmospheric-Pressure Plasma Possible Application in Wound Healing. Biomolecules & Therapeutics *22*, 477–490.
- Heinlin, J., Isbary, G., Stolz, W., Morfill, G., Landthaler, M., Shimizu, T., Steffes, B., Nosenko, T., Zimmermann, J.L., and Karrer, S. (2011). Plasma applications in medicine with a special focus on dermatology. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology *25*, 1–11.
- Heuer, Kiara; Hoffmanns, Martin A.; Demir, Erhan; Baldus, Sabrina; Volkmar, Christine M.; Röhle, Mirco et al. (2015): The topical use of non-thermal dielectric barrier discharge (DBD): nitric oxide related effects on human skin. In: Nitric oxide : biology and chemistry 44, S. 52–60.
- Hinz, B., et al., Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. Am J Pathol, 2001. 159(3): S. 1009-20
- Isbary, G., Zimmermann, J.L., Shimizu, T., Li, Y.-F., Morfill, G.E., Thomas, H.M., Steffes, B., Heinlin, J., Karrer, S., and Stolz, W. (2013). Non-thermal plasma—more than five years of clinical experience. Clinical Plasma Medicine *1*, 19–23.
- Jablonowski, L., et al. "Removal of naturally grown human biofilm with an atmospheric pressure plasma jet. 2016.
- Janßen H., B.R., Qualität und Kosten in der chronischen Wundversorgung
- Karl, T., A. Gussmann, and M. Storck, Chronic wounds--perspective for integrated care, Zentralbl Chir, 2007. 132(3): p. 232-5.

- Kelm, M., and Schrader, J. (1990). Control of coronary vascular tone by nitric oxide. Circulation Research *66*, 1561–1575.
- Kisch, Tobias; Helmke, Andreas; Schleusser, Sophie; Song, Jungin; Liodaki, Eirini; Stang, Felix Hagen et al. (2016): Improvement of cutaneous microcirculation by cold atmospheric plasma (CAP): Results of a controlled, prospective cohort study. In: Microvascular research 104, 55–62
- Kogelschatz, U. (2003). Dielectric-barrier discharges: their history, discharge physics, and industrial applications. Plasma Chemistry and Plasma Processing *23*, 1–46.
- Köster, I. and D.I. Schubert, Epidemiologie und Versorgung von Patienten mit chronischen Wunden. Eine Analyse auf der Basis der Versichertenstichprobe AOK Hessen:KV Hessen. 2015
- Kuchenbecker, M., Bibinov, N., Kaemlimg, A., Wandke, D., Awakowicz, P., and Viöl, W. (2009). Characterization of DBD plasma source for biomedical applications. Journal of Physics D: Applied Physics *42*, 45212.
- Langmuir, I. (1928). Oscillations in ionized gases. Proceedings of the National Academy of Sciences *14*, 627–637.
- Liao, J.C., Hein, T.W., Vaughn, M.W., Huang, K.-T., and Kuo, L. (1999). Intravascular flow decreases erythrocyte consumption of nitric oxide. Proceedings of the National Academy of Sciences *96*, 8757–8761.
- Liebmann, J., Scherer, J., Bibinov, N., Rajasekaran, P., Kovacs, R., Gesche, R., Awakowicz, P., and Kolb-Bachofen, V. (2011). Biological effects of nitric oxide generated by an atmospheric pressure gas-plasma on human skin cells. Nitric Oxide *24*, 8–16.
- Loots, M.A., et al., Differences in cellular infiltrate and extracellular matrix of chronic diabetic and venous ulcers versus acute wounds. J Invest Dermatol, 1998. 111(5): p. 850-7.
- Luo, J.D., et al., Gene therapy of endothelial nitric oxide synthase and manganese superoxide dismutase restores delayed wound healing in type 1 diabetic mice. Circulation, 2004.
- Michel Moisan, J.B., Marie-Charlotte Crevier, Jacques Pelletier, Nicolas Philip, and Bachir Saoudi, Plasma sterilization. Methods and mechanisms. Pure Appl. Chem, 2002 74(3): p. pp. 349–358.
- Miller, C.C., Miller, M.K., Ghaffari, A., and Kunimoto, B. (2004). Treatment of chronic nonhealing leg ulceration with gaseous nitric oxide: a case study. Journal of Cutaneous Medicine and Surgery *8*, 233–238.
- Morfill, G.E., Shimizu, T., Steffes, B., and Schmidt, H.U. (2009). Nosocomial infections—a new approach towards preventive medicine using plasmas. New Journal of Physics *11*, 115019.
- Opländer, C., Volkmar, C.M., Paunel-Görgülü, A., van Faassen, E.E., Heiss, C., Kelm, M., Halmer, D., Mürtz, M., Pallua, N., and Suschek, C.V. (2009). Whole body UVA irradiation

lowers systemic blood pressure by release of nitric oxide from intracutaneous photolabile nitric oxide derivates. Circulation Research *105*, 1031–1040.

- Paunel, A.N., Dejam, A., Thelen, S., Kirsch, M., Horstjann, M., Gharini, P., Mürtz, M., Kelm, M., de Groot, H., Kolb-Bachofen, V., et al. (2005). Enzyme-independent nitric oxide formation during UVA challenge of human skin: characterization, molecular sources, and mechanisms. Free Radical Biology and Medicine *38*, 606–615.
- Rajasekaran, Priyadarshini; Opländer, Christian; Hoffmeister, Dennis; Bibinov, Nikita; Suschek, Christoph Viktor; Wandke, Dirk; Awakowicz, Peter (2011): Characterization of Dielectric Barrier Discharge (DBD) on Mouse and Histological Evaluation of the Plasma-Treated Tissue. In: Plasma Processes Polym. 8 (3), S. 246–255
- Rassaf, T., Kleinbongard, P., Preik, M., Dejam, A., Gharini, P., Lauer, T., Erckenbrecht, J., Duschin, A., Schulz, R., Heusch, G., et al. (2002a). Plasma Nitrosothiols Contribute to the Systemic Vasodilator Effects of Intravenously Applied NO Experimental and Clinical Study on the Fate of NO in Human Blood. Circulation Research *91*, 470–477.
- Rassaf, T., Preik, M., Kleinbongard, P., Lauer, T., Hei\s s, C., Strauer, B.-E., Feelisch, M., and Kelm, M. (2002b). Evidence for in vivo transport of bioactive nitric oxide in human plasma. The Journal of Clinical Investigation *109*, 1241–1248.
- S3-Leilinienreport, Deutsche Gesellschaft für Wundheilung e.V., 2012, S.78-80
- Sen, C.K., et al., Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. Wound Repair Regen, 2009. 17(6): p. 763-71. 15.
- Siemens, W. (1857). Ueber die elektrostatische Induction und die Verzögerung des Stroms in Flaschendrähten. Annalen Der Physik *178*, 66–122.
- Stamler, J.S., Jaraki, O., Osborne, J., Simon, D.I., Keaney, J., Vita, J., Singel, D., Valeri, C.R., and Loscalzo, J. (1992). Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. Proceedings of the National Academy of Sciences *89*, 7674–7677.
- Suchentrunk, R., Staudigl, G., Jonke, D., and Fuesser, H.J. (1997). Industrial applications for plasma processes—examples and trends. Surface and Coatings Technology *97*, 1–9.
- Trampert, K. (2008). Ladungstransportmodell dielektrisch behinderter Entladungen (Univ.-Verlag Karlsruhe).
- von Woedtke, T., Reuter, S., Masur, K., and Weltmann, K.-D. (2013). Plasmas for medicine. Physics Reports *530*, 291–320.
- Weller, R. (2003). Nitric oxide: a key mediator in cutaneous physiology. Clinical and Experimental Dermatology *28*, 511–514.
- Xu, G.M., et al., Dual effects of atmospheric pressure plasma jet on skin wound healing of mice. Wound Repair Regen, 2015.
- Yamasaki, K., et al., Reversal of impaired wound repair in iNOS-deficient mice by topical adenoviral-mediated iNOS gene transfer. J Clin Invest, 1998.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt all denen, die mich bei der Durchführung der Arbeit unterstützt und über die Zeit ermutigt haben den Weg bis zum Ende zu gehen.

Dies gilt meiner anfänglichen Betreuerin Christine Volkmar, welche mir gerade zu Beginn der Arbeit immer wieder mit Rat, Geduld und Unterstützung bei Seite stand. Auch möchte ich mich ausdrücklich bei Christian Opländer bedanken, der ebenfalls immer ein offenes Ohr hatte und mir mit seiner wissenschaftlichen Erfahrung und großartiger Expertise zur Verfügung stand.

Dem Institut für Unfallchirurgie und im Speziellen Prof. Dr. rer. nat. Suschek bin ich sehr dankbar. Zum einen für die mir eröffnete Möglichkeit dieser Arbeit, zum anderen für den geduldigen und stets freundlichen, wertschätzenden und ermutigenden Umgang in all der Zeit.

Mein Kommilitone und guter Freund Christof Dücker ist hier mit ausdrücklichem Dank zu erwähnen. Dein Wissen, welche ich immer wieder zu Rate ziehen konnte, war für mich eine enorme, nicht zu unterschätzende Hilfe.

Zum Schluss möchte ich meinen Eltern Marianne und Martin Wurth danken. Während der Zeit meines Studiums und den langen Weg der Ausbildung, bis hin zum Abschluss dieser Arbeit, konnte ich immer auf eure Unterstützung vertrauen.