



**Aus dem Fachgebiet für Neuropathologie**

(Leiter: Univ.-Prof. Dr. J. Schlegel)

**des**

**Instituts für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie**

**der Technischen Universität München**

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. Höfler)

**Untersuchung der Wirkung von Plasmabehandlungen auf  
Wundflüssigkeiten und Fibroblasten bezüglich pH-Wert,  
NOx-Konzentration und oxidativem Stress**

Erwin Henemann

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. J. Schlegel
2. Univ.-Prof. Dr. A. F. Schilling

Die Dissertation wurde am 02.05.2014 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 21.01.2015 angenommen.

---

---

## Inhaltsverzeichnis

1.	Abkürzungsverzeichnis .....	6
2.	Einleitung.....	8
2.1.	Problemstellung .....	8
2.2.	Wunden .....	9
2.2.1.	Wundheilung .....	9
2.2.2.	Chronische und akute Wunden .....	10
2.2.3.	Einflussfaktoren der Wundheilung.....	11
2.2.3.1.	pH-Wert .....	11
2.2.3.2.	NO-Konzentration .....	14
2.2.3.3.	Oxidativer Stress.....	16
2.3.	Plasma .....	18
2.3.1.	Grundlagen .....	18
2.3.2.	Plasmaarten.....	19
2.3.3.	Plasmazusammensetzung .....	20
2.3.4.	Plasmawirkung .....	21
2.3.4.1.	Prokaryoten .....	21
2.3.4.2.	Eukaryoten .....	21
3.	Zielsetzung der Arbeit .....	23
4.	Material und Methoden .....	24
4.1.	Material .....	24
4.1.1.	Reagenzien und Apparaturen.....	24
4.1.2.	Laborgeräte .....	25
4.1.3.	Plasmageräte .....	25
4.1.3.1.	MicroPlaSter $\beta$ .....	25
4.1.3.2.	miniFlatPlaSter .....	27
4.1.4.	Zellen .....	29
4.2.	Methoden.....	29

---

4.2.1.	Versuche mit Wundflüssigkeit.....	29
4.2.1.1.	Patienten .....	29
4.2.1.2.	Sammeln der Wundflüssigkeit.....	31
4.2.1.3.	Extraktion und Reinigung der Wundflüssigkeit .....	31
4.2.1.4.	pH-Wert Bestimmung.....	32
4.2.1.5.	NOx-Konzentration.....	32
4.2.1.6.	Messung der Gesamtproteinkonzentration .....	33
4.2.1.7.	Protein-Carboxylierung .....	33
4.2.1.8.	Protein-Nitrierung .....	34
4.2.2.	Versuche mit Zellen.....	35
4.2.2.1	Kultivierung der Zellen .....	35
4.2.2.2.	Plasmabehandlung .....	35
4.2.2.3.	Bestimmung der NOx Konzentration .....	35
4.2.2.4.	pH-Wert Bestimmung.....	36
4.2.2.5.	Messung der Zytotoxizität.....	36
4.2.2.6.	Bestimmung der Zell-Proliferation .....	37
4.2.3.	Statistische Analysen .....	37
5.	Ergebnisse .....	38
5.1.	Patientenproben .....	38
5.1.1.	pH-Wert-Messungen .....	38
5.1.2.	NOx-Bestimmung .....	39
5.1.3.	Gesamtproteinkonzentration.....	40
5.1.4.	Protein-Nitrierung .....	40
5.1.5.	Protein-Carboxylierung .....	41
5.2.	Zellen.....	42
5.2.1.	pH-Wert-Messungen .....	42
5.2.2.	NOx-Bestimmung .....	43
5.2.3.	LDH-Assay.....	45

5.2.4.	MTT-Assay .....	46
6.	Diskussion.....	48
6.1.	Evaluation der angewandten Methoden und Verfahrensweisen .....	49
6.2.	Diskussion der Ergebnisse .....	49
6.2.1.	pH-Wert.....	49
6.2.2.	NOx-Konzentration.....	51
6.2.3.	Oxidativer Stress.....	53
6.2.4.	Zytotoxizität und Zellvitalität.....	54
6.3.	Klinische Relevanz .....	55
6.4.	Fazit .....	58
7.	Zusammenfassung/Abstract.....	60
8.	Literaturverzeichnis.....	61
9.	Danksagung .....	70
10.	Eidesstattliche Erklärung .....	71
11.	Curriculum vitae .....	72

## 1. Abkürzungsverzeichnis

bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
BH4	Tetrahydrobiopterin
BSA	Bovines Serumalbumin
CAP	Cold Atmospheric Plasma
CVI	Chronisch venöse Insuffizienz
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazin
ECM	Extrazellulärmatrix
EGF	Epidermal Growth Factor
EIA	Enzymimmunoassay
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
eNOS	Endotheliales NOS
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCS	Fetales Kälberserum
FMN	Flavin-Mononukleotid
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HRP	Meerrettichperoxidase
IFN-γ	Gamma-Interferon
IGF-I	Insulin-like Growth Factor-I
IL-1/2/12	Interleukin-1/2/12
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
INT	Iodonitrotetrazoliumchlorid
LDH	Lactatdehydrogenase
MMP	Matrixmetalloproteasen
MPE	Max-Planck-Institut für extraterrestrische Physik
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid
NADP/NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NHE1	Natrium-Protonen-Austauscher
nNOS	Neuronale NO-Synthase
NO·	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NOx	Nitrat und Nitrit
O <sub>2</sub>	Sauerstoff

O <sub>2</sub> <sup>·-</sup>	Superoxid-Radikal
O <sub>3</sub>	Ozon
OH <sup>·</sup>	Hydroxid-Radikal
ONOO <sup>·</sup>	Peroxynitrit
P/S	Penicillin/Streptomycin
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphate Buffered Saline
pCO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxidpartialdruck
PDGFs	Platelet-derived Growth Factors
PHD	Pin-to-hole Spark Discharge
PMJ	Cold-atmospheric-pressure Air Plasma Microjet
RS	Reaktive Spezies
RNS	Reaktive Stickstoffspezies
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SMD	Mikro-Entladungs-Elektrode
SOD	Superoxid Dismutase
TGF-α	Transforming Growth Factor-Alpha
TGF-β	Transforming Growth Factor-Beta
TIMP	Tissue Inhibitors Of MMP
TNF-α	Tumor Nekrose Factor-Alpha
UVA, UVB, UVC	Ultraviolette Strahlung
VEGF	Vascular Endothelin-derived Growth Factor

## 2. Einleitung

### 2.1. Problemstellung

Chronische Wunden sind in den letzten Jahren eine immer größere Herausforderung für die moderne medizinische Versorgung geworden. Obwohl keine einheitlichen Zahlen existieren, wird die Prävalenz chronischer Wunden in Industrienationen auf ungefähr 1 % geschätzt (Etufugh and Phillips 2007). Die Ätiologie weist hierbei eine hohe Bandbreite auf. Neben Ulzerationen aufgrund von Gefäßerkrankungen wie der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) oder einer chronisch venösen Insuffizienz (CVI) zählen auch Diabetes Mellitus oder eine pathologische Keimbesiedelung mit multiresistenten Erregern zu den wichtigen Risikofaktoren. Die grundlegende Problematik dabei ist die oftmals schlechte Heilungstendenz verbunden mit einer hohen Komorbidität und Hospitalisierungsrate. Viel zu häufig steht den Patienten ein langwieriger und wenig erfolgversprechender Weg bevor, wenn die herkömmlichen Therapieoptionen und Vorgehensweisen in der Klinik an ihre Grenzen stoßen. Offensichtlich existiert hier also dringend Bedarf an neuen Behandlungsstrategien und -ansätzen, um diesen Problemen entgegenzutreten.

Einen solchen neuen Ansatz kann das weite und innovative Feld der Plasmamedizin bieten. Plasma war zunächst vor allem für die physikalische Forschung als Bestandteil der uns umgebenden Natur in Form von Blitzen oder der Ionosphäre der Erde interessant. Mit der weiteren Erforschung dieses Themenkomplexes wuchs das Anwendungsspektrum des Plasmas beständig. Standardmäßig wird diese Technologie heutzutage schon in Fernsehgeräten, bei Lichtquellen, im Hygienebereich zur Desinfektion von belebten und unbelebten Flächen oder bei der Sterilisation medizinischer Ausrüstung genutzt. Schließlich wurde mit der Entdeckung des sogenannten CAPs (Cold Atmospheric Plasma), welches bei atmosphärischen Druckverhältnissen unter niedriger Temperatur erzeugt werden kann, Plasma auch für viele neue Einsatzgebiete in der Biologie und Medizin reizvoll. Aktuell arbeiten unterschiedlichste interdisziplinäre Forschungsgruppen weltweit an der Untersuchung der Auswirkungen von Plasma auf pro- und eukaryote Zellen sowohl in vitro als auch in vivo. Auch die Wirkung auf chronische Wunden direkt und im Modell, wie sie in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, spielt hierbei eine wichtige Rolle.

Obwohl dieser Teil der Plasmaforschung noch verhältnismäßig jung ist, geben experimentelle Daten und erste Studien Hoffnung, dass hier bald neue Wege in der Behandlung chronischer Wunden beschritten werden können.



## 2.2. Wunden

### 2.2.1. Wundheilung

Als Wunde wird im Allgemeinen eine Unterbrechung der Kontinuität der Gewebe der Körperhülle verstanden. Die Gründe hierfür können zahlreich sein und reichen von exogener Gewalteinwirkung über physikalische Schädigungen bis hin zu endogenen Erkrankungen, wie dem diabetischen Fußsyndrom oder einem chronischen Ulcus cruris.

Die physiologische Wundheilung ist ein äußerst komplexer biologischer Prozess, der nur durch das Zusammenspiel unterschiedlichster Faktoren möglich ist. Das Ziel der Wundheilung ist die vollständige Wiederherstellung der ursprünglichen anatomischen Strukturen und der physiologischen Funktion der Haut. Natürlich verläuft die Wundheilung nicht in allen Fällen gleich. Abhängig von der Ätiologie der Wunde kann es einerseits bei oberflächlichen Verletzungen zur problemlosen primären Wundheilung kommen. Andererseits neigen tiefere Läsionen, bei denen das umgebende Gewebe auch in Mitleidenschaft gezogen wurde, zur länger dauernden und komplikationsreicheren sekundären Wundheilung (Childress and Stechmiller 2002). Ebenso ist natürlich auch die Wundgröße ein Faktor, der die Wundheilung vor allem zeitlich bestimmt (Maklebust and Sieggreen 2001). Nichtsdestotrotz ist es möglich den Wundheilungsprozess in drei sich zum Teil überlappende Phasen einzuteilen, die auf histologischer Ebene gut beschrieben sind (Gurtner, et al. 2008; Martin 1997): Zunächst erfolgt die Entzündungsreaktion, die die Voraussetzung für die Phase der Proliferation ist, welche anschließend durch die Phase des Remodellings des neuen Gewebes abgelöst wird. Jede dieser drei Phasen wird vor allem über die Ausschüttung von Zytokinen, Chemokinen und anderer Botenstoffe gesteuert.

Eingeleitet wird die Wundheilung durch die Freisetzung von verschiedenen Mediatoren aus den beschädigten Zellen. Dies führt zur Bildung eines Fibrinnetzwerks durch Thrombozyten, welches die Wunde zeitweise verschließt (Fritsch 1983; Karukonda, et al. 2000). Über Freisetzung von EGF (Epidermal Growth Factor), IGF-I (Insulin-like Growth Factor-I), PDGF, TGF- $\beta$  und TGF- $\alpha$  aus den aktivierten Thrombozyten kommt es zur Einwanderung verschiedener Immunzellen, die die Entzündungsphase einläuten (Schultz and Mast 1998). Als erstes vor Ort sind hierbei die neutrophilen Granulozyten, gefolgt von Monozyten, die sich zu Gewebsmakrophagen differenzieren und gemeinsam für eine Entfernung der Zellüberreste sorgen. Hierbei spielen vor allem Proteasen aus differenzierten Fibroblasten eine große Rolle (Schultz and Mast 1998). Es etabliert sich ein Gleichgewicht zwischen Proteolyse und Gewebsproliferation, bei dem zunächst die Proteolyse überwiegt. Diese Prozesse werden insbesondere über die Freisetzung unterschiedlicher Mediatoren aus Makrophagen gesteuert (Karukonda, et al. 2000).

Während die Entzündungsprozesse daraufhin allmählich abnehmen, startet die Phase der Proliferation, die hauptsächlich von folgenden zwei ineinander greifenden Vorgängen bestimmt wird: Aufgrund von sezernierten Wachstumsfaktoren (TGF- $\alpha$ , EGF) beginnt einerseits schon nach einigen Stunden die Reepithelialisierung durch Einwanderung von epidermalen Keratinozyten von den Wundrändern aus, welche letztendlich zu einem Verschluss der Wunde mit einer dünnen epidermalen Schicht führt (Fritsch 1983). Andererseits migrieren auch Fibroblasten und Endothelzellen in die Wunde, die an der Bildung des sogenannten Granulationsgewebes beteiligt sind. Die Fibroblasten beginnen mit der Bildung von Kollagen und Extrazellulärmatrix (ECM) und differenzieren sich nach ungefähr einer Woche teilweise zu Myofibroblasten, die für die Wundkontraktion verantwortlich sind (Schafer and Werner 2008). Damit diese Vorgänge in ihrer Gesamtheit ablaufen können, ist eine gute Gefäßversorgung der betroffenen Areale essentiell. Dies wird durch Neoangiogenese (hauptsächlich gesteuert über VEGF aus Makrophagen/Keratinozyten) erreicht. Ebenso findet eine Lymphangiogenese statt (Gurtner, et al. 2008; Martin 1997). Sind diese Prozesse abgeschlossen, wird ein Großteil der Zellen apoptotisch. Die Wiederherstellung der ursprünglichen Funktion der Haut in ihren Grundzügen sollte je nach Ausmaß der Wunde nach einigen Wochen erfolgt sein.

Die letzte Phase der Wundheilung, das Remodelling, beginnt schon nach einigen Tagen und dauert bis zu 2 Jahre. Hierbei wird das für das Granulationsgewebe charakteristische Kollagen Typ III durch Kollagen Typ I ersetzt. Dadurch werden die Verbindungen zwischen den Zellen verstärkt, wobei jedoch die ursprüngliche Festigkeit der Haut nicht mehr vollständig erreicht wird (Schafer and Werner 2008). Eine wichtige Rolle spielen hierbei die MMPs und TIMPs, die von Fibroblasten sezerniert werden, und in einem komplexen Gleichgewicht miteinander stehen (Childress and Stechmiller 2002).

### **2.2.2. Chronische und akute Wunden**

Trotz prinzipiell gleich ablaufender Prozesse bei der Wundheilung unterscheiden sich chronische und akute Wunden stark voneinander. Während akute Wunden je nach Ätiologie und Ausdehnung häufig problemlos ausheilen, sind die Heilungsprozesse bei chronischen Wunden oft gestört. Von einer chronischen Wunde spricht man je nach herangezogener Fachgesellschaft ab einem Zeitraum von 4 – 12 Wochen, in dem unter fachgerechter Therapie keine Heilungstendenzen zu erkennen sind (Deutsches Netzwerk für Qualitätentwicklung in der Pflege DNQP 2008). Die Ursachen für die Chronifizierung von Wunden sind vielfältig. Einer der zahlreichen Gründe kann eine pathologische Besiedelung der Wunde mit Bakterien sein. Vor allem der Methicillin-resistente Staphylococcus aureus (MRSA), dessen Anteil an nosokomialen Infektionen nach der Arbeitsgemeinschaft

„Empfindlichkeitsprüfungen und Resistenz“ der Paul-Ehrlich-Gesellschaft 2007 bei 20,3% lag, stellt aufgrund seiner Resistenzen und der damit verbundenen hohen Hospitalisierungsraten ein erhebliches Problem dar. Inzwischen wurde dies als globale Bedrohung charakterisiert (Klein, et al. 2007). Chronische Ulzerationen aufgrund einer CVI oder einer pAVK zählen ebenso zu den wichtigen Risikofaktoren. Die durchschnittliche Prävalenz des abgeheilten Ulkus beträgt 0,6% und des floriden Ulkus 0,1% und verschlingt in Deutschland mit jährlichen Gesamtkosten von 600-900 Millionen Euro 1-2% des Gesundheitsbudgets (Isbary, et al. 2013). Ein weiterer Faktor, der in den vergangenen Jahren immer mehr Bedeutung erlangt hat, ist die Diabetes-Mellitus-Erkrankung. Seit 1998 stieg die Prävalenz des Diabetes Mellitus kontinuierlich an und hat im Jahr 2007 den Wert von 8,9% erreicht, was einer Zahl von 7 Millionen behandlungspflichtigen Patienten entspricht (Hauner 2011). Die Dunkelziffer wird hierbei jedoch viel höher geschätzt. Eine besonders für die Entstehung von Wunden relevante Komplikation ist das diabetische Fußsyndrom. Laut dem "Deutschen Gesundheitsbericht: Diabetes 2011" leiden etwa 250.000 Diabetes-Patienten an einer Fußläsion. Weiterhin haben circa 1 Million Diabetes-Patienten ein erhöhtes Risiko eine Fußverletzung zu erleiden, die dann unter Umständen zu einer von jährlich 60.000 Amputationen führen kann. Der Kostenfaktor ist mit geschätzten 2,5 Milliarden Euro auch beim diabetischen Fußsyndrom enorm (Deutscher Gesundheitsbericht: Diabetes 2011). Weitere Faktoren, die sich negativ auf die Wundheilung auswirken können, sind eine Immunsuppression, bestehender hydrostatischer Druck, Fehlernährung, kardiovaskuläre Erkrankungen, Medikamente, hypoxische Zustände und Tabakabusus (Childress and Stechmiller 2002).

Allgemein gesehen unterscheiden sich chronische von akuten Wunden neben der Ätiologie vor allem auch hinsichtlich der benötigten Heilungszeit und der Zusammensetzung des Wundmilieus. Diese Unterschiede haben Schultz et al. (Schultz and Mast 1998) zusammengefasst: Normal heilende Wunden zeigen hohe Konzentrationen an mitogener Aktivität, an Wachstumsfaktoren und an funktionell differenzierten Fibroblasten bei gleichzeitig geringen Konzentrationen an Zytokinen und Proteasen. Im Gegensatz dazu weisen chronische Wunden geringe mitogene Aktivität und erniedrigte Wachstumsfaktoren bei erhöhten Konzentrationen von Zytokinen und Proteasen auf.

### **2.2.3. Einflussfaktoren der Wundheilung**

#### **2.2.3.1. pH-Wert**

Der pH-Wert der normalen intakten Haut wird in der Literatur je nach untersuchter Region und Alter des Probanden in einem Bereich von 4,0 bis zu 6,3 angegeben (Lambers, et al.

2006), wobei man von einem durchschnittlichen pH von 5,4 – 5,9 ausgeht (Braun-Falco and Korting 1986). Offensichtlich liegt also auf der Hautoberfläche ein saureres Milieu als im Rest des Körpers vor, was als ein wesentlicher Faktor der Barrierefunktion Haut angesehen wird. Viele bedeutende humanpathogene Keime werden in ihrem Wachstum bei einem pH-Wert unterhalb von 6 gehemmt (Thomas, et al. 1993). Um dieses saure Milieu des Stratum Corneums aufrechtzuerhalten wurden drei verschiedene endogene Prozesse beschrieben (Schreml, et al. 2010): Die Produktion von Urocansäure aus Filaggrin, die Freisetzung von Fettsäuren aus Phospholipiden über die sekretorische Phospholipase A2 und der Natrium-Protonen-Austauscher NHE1. Kommt es nun zu einer Schädigung der obersten Hautschicht, werden die tieferliegenden Schichten exponiert, die einen alkalischeren pH-Wert aufweisen. Zunächst jedoch sinkt der pH-Wert der Wunde weiter ab, da die Produktion von organischen Säuren (z.B. Laktat) durch einen Mangel an  $O_2$  und einem erhöhten  $pCO_2$  angekurbelt wird (Schneider, et al. 2007). Diese beginnende physiologische Azidose kann zunächst vorteilhaft für die Wundheilung sein, da Fibroblasten zur Proliferation angeregt werden (Liu, et al. 2002) und die Sauerstoffversorgung der Wunde aufgrund des Bohr-Effektes steigt (Schneider, et al. 2007). Daraufhin kommt es während der Granulationsphase zu einem allmählichen Anstieg des pH-Wertes bis hin zu einem beinahe alkalischen Bereich, gefolgt von einem Abfall des pHs zu physiologischen Hautoberflächenwerten nach der Reepithelialisierung (Schneider, et al. 2007) (siehe Abb.1). Chronifiziert die Wunde bleibt dieser pH-Abfall aus (Schneider, et al. 2007) (siehe Abb.2).

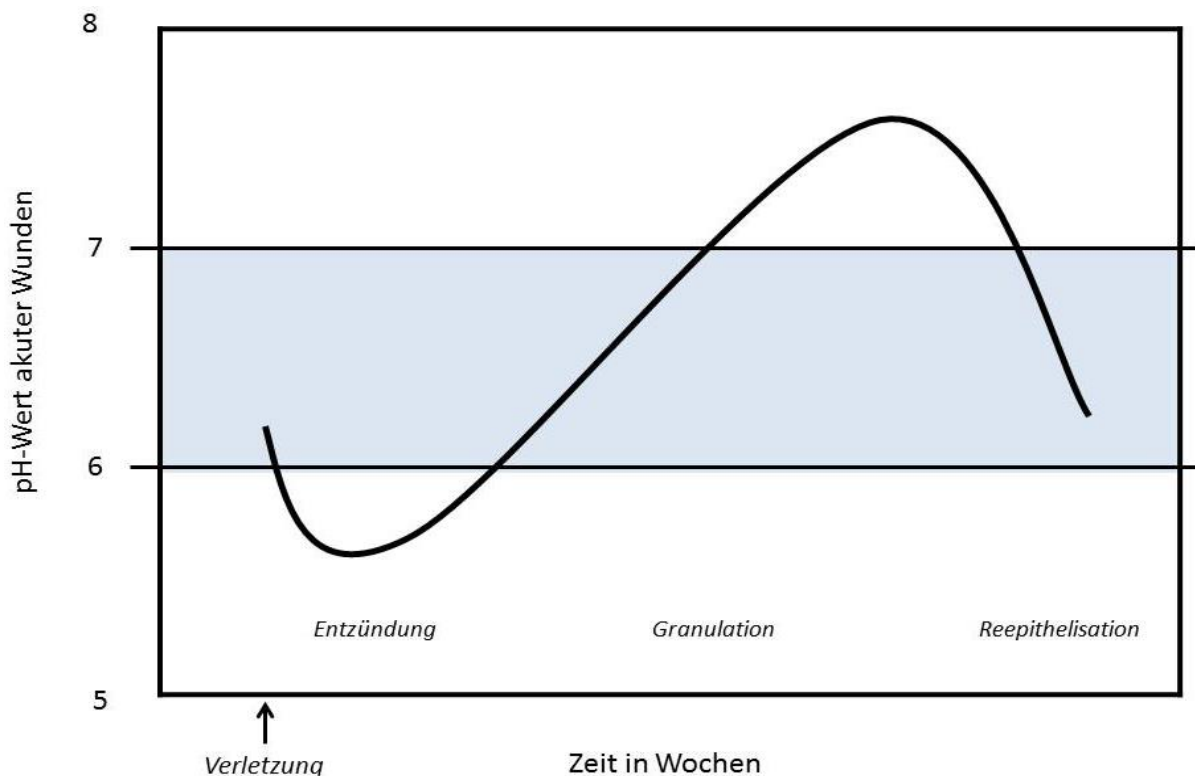


Abb. 1: pH-Wert akuter Wunden im Zeitverlauf; modifiziert nach (Schneider, et al. 2007)

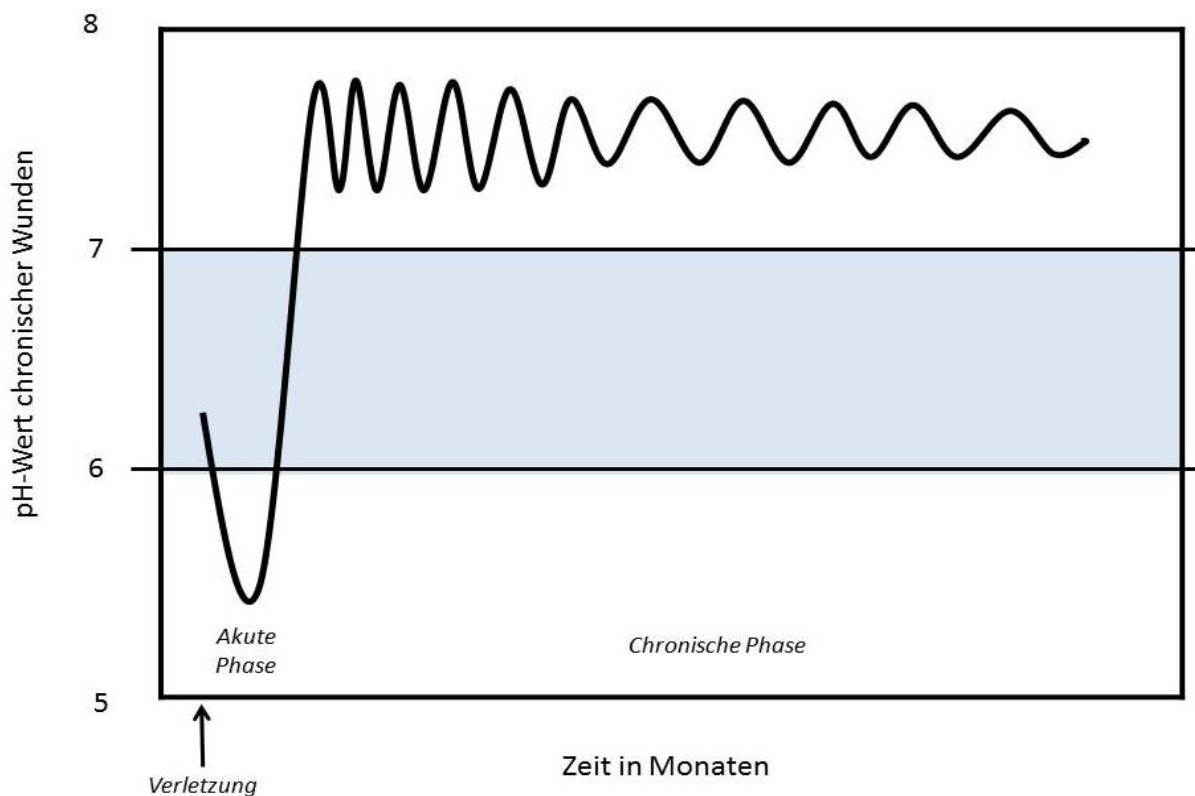


Abb.2: pH-Wert chronischer Wunden im Zeitverlauf; modifiziert nach (Schneider, et al. 2007)

In einer Studie von Dissemond et al. (Dissemond, et al. 2003) konnte in chronischen Wunden ein durchschnittlicher pH-Wert von 7,42 ermittelt werden, wobei die pH-Messungen von 5,45 bis 8,65 reichten (abhängig vom Patienten und der Wundbehandlung). Sogar individuelle Unterschiede von bis zu 1,73 innerhalb einer Wunde wurden während des Untersuchungszeitraums von 12 Monaten entdeckt. Dies bestätigt, dass sich der pH-Wert der Wunde phasenabhängig ändert. Auch akute Wunden wurden untersucht und zeigten einen mittleren pH-Wert von 7,44 bei einem Range von 6,5-8,07. Obwohl diese Werte denen von chronischen Wunden sehr ähnlich sind, muss man beachten, dass beide Gruppen aufgrund der Auswahl der Studien-Patienten nur eingeschränkt vergleichbar waren.

Untersuchungen von Greener et al. (Greener, et al. 2005) zufolge liegt das pH-Optimum von Proteasen, die in der Wunde vorkommen (MMP-2, Elastase, Plasmin), bei ungefähr 8,0. Eine Erniedrigung des pH-Werts kann deren enzymatische Aktivität stark hemmen. Gestützt werden diese Ergebnisse von Studien, die bestätigten, dass die Aktivität von Proteasen in heilenden Wunden konsequent abnimmt (Tregrove, et al. 1999), da hier der pH-Wert wieder physiologischen Werten im sauren Bereich entgegenstrebt. Des Weiteren hat der vorherrschende pH-Wert in der Wunde natürlich auch Auswirkungen auf die im Rahmen einer Wundtherapie exogen zugeführten Enzyme, die ebenso unterschiedlichste pH-Optima aufweisen.

Eine therapeutische Beeinflussung des pH-Wertes im Rahmen einer modernen Wundtherapie erscheint unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse durchaus sinnvoll. Jedoch muss beachtet werden, dass individuell abhängig vom Patienten, seinem Krankheitsbild und der jeweiligen Phase der Wundheilung entschieden werden muss, wie der pH beeinflusst werden soll. Schneider et al. (Schneider, et al. 2007) haben die neuen Erkenntnisse über die Therapien zusammengefasst und sind zu dem Schluss gekommen, dass ein saures pH-Milieu das bakterielle Wachstum und die Protease-Aktivität hemmt, die Fibroblasten-Proliferation (zumindest in vitro) steigern kann und zudem zu einer verbesserten Sauerstoffversorgung des Gewebes führt. Außerdem gilt ein saurer pH als Indikator für eine erfolgreiche Wundheilung chronischer Wunden. Im Kontrast dazu haben Schneider et al. erklärt, dass Biochirurgie, wie Wund-Debridement mittels Proteasen oder Fliegenlarven, und klassisches chirurgisches Wund-Debridement den pH-Wert von Wunden anhebt und ein alkalisches Niveau schafft. Dies trägt zur Bildung von Granulationsgewebe bei und unterstützt ebenso den Heilungsprozess. Zudem wurde festgestellt, dass ein pH-Wert über 7,4 das Anwachsen eines Hauttransplantates wahrscheinlicher macht (Ye 1957).

#### **2.2.3.2.NO-Konzentration**

Ein weiterer interessanter Parameter der Wundheilung ist die Konzentration von Stickstoffmonoxid (NO) in der Wunde. NO wird aus der semiessentiellen Aminosäure L-Arginin mit Hilfe des Enzyms NO-Synthase (NOS) unter der Abspaltung von L-Citrullin gebildet (Griffith and Stuehr 1995). Bei dieser Reaktion sind neben dem L-Arginin auch Sauerstoff und NADP (Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat), sowie die Kofaktoren FAD (Flavin-Adenin-Dinukleotid), FMN (Flavin-Mononukleotid), BH<sub>4</sub> (Tetrahydrobiopterin) und zwei prosthetische Gruppen, die Häm und Calmodulin enthalten, nötig (Kroncke, et al. 1995; Morris and Billiar 1994). NO ist eine relativ flüchtige Verbindung mit einer Halbwertszeit von wenigen Sekunden (Liu, et al. 1998), die schnell bei der Anwesenheit von Wasser und Sauerstoff in ihre stabilen Komponenten Nitrit und Nitrat zerfällt (Childress and Stechmiller 2002). Stickstoffmonoxid wird zu den reaktiven Spezies gezählt, die im nächsten Kapitel ausführlich behandelt werden.

Das Enzym NOS kommt in drei unterschiedlichen Isoformen vor (Childress and Stechmiller 2002):

- Neuronales NOS (nNOS): Konstitutiv exprimiert in Zellen des peripheren und zentralen Nervensystems
- Endotheliales NOS (eNOS): Konstitutiv exprimiert in endothelialen Zellen des vaskulären Systems

- Induzierbares NOS (iNOS): Nur exprimiert in Anwesenheit von Endotoxinen oder proinflammatorischen Zytokinen (Lincoln, et al. 1997)

iNOS wird von einer Reihe von Zellen, die in der Wunde vorhanden sind (Makrophagen/Monozyten, Neutrophile Granulozyten, natürliche Helfer Zellen, T1-Helfer-Zellen, Epithel- und Endothelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten), bei Anwesenheit von bestimmten Mediatoren, einer geringen Sauerstoffversorgung oder einer niedrigen NO-Konzentration exprimiert (Lincoln, et al. 1997).

Ein weiterer wichtiger Aspekt, den es bei der Beschreibung der NO-Synthese zu beachten gilt, ist die Tatsache, dass die NOS um das L-Arginin mit dem Enzym Arginase konkurriert, welches die Reaktion von L-Arginin zu L-Ornithin unter Abspaltung von Harnstoff katalysiert (Childress and Stechmiller 2002). Ornithin wird benötigt um Polyamine zu synthetisieren, die wiederum zelluläre Proliferations- und Reparationsprozesse unterstützen (Lincoln, et al. 1997). Diese Vorgänge sind graphisch im Abb.3 zusammengefasst.

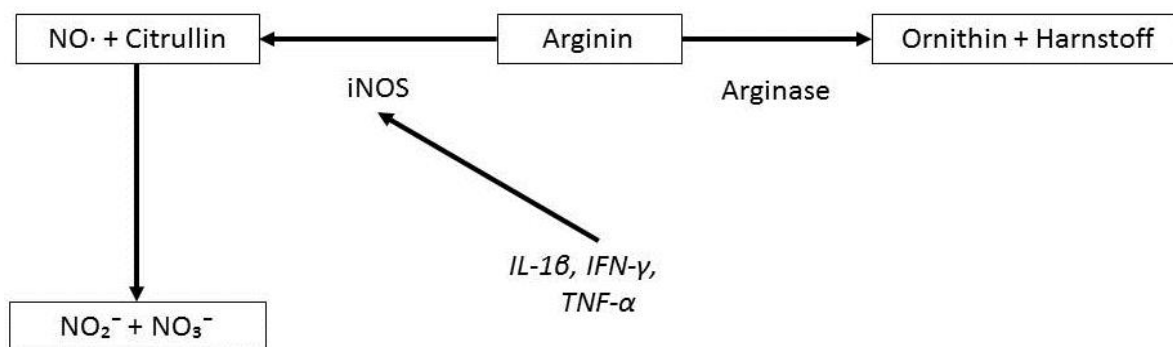


Abb.3: Arginin-Stoffwechsel mit beteiligten Enzymen und beeinflussenden Faktoren (in kursiver Schrift)

Der Effekt von NO· wird grundsätzlich über zwei verschiedene Mechanismen vermittelt. Zum einen ist NO· ein Signalmolekül, das über die Aktivierung der intrazellulären Guanylat-Zyklase und die Bildung des Second Messengers cGMP (Cyclisches Guanosinmonophosphat) eine Signalkaskade in Gang setzt, die für die Vasodilatation, intestinale Peristaltik und Neurotransmission verantwortlich ist (Childress and Stechmiller 2002; Morris and Billiar 1994). Zum anderen fungiert NO· als eine toxische Substanz, die ihren zytostatischen und zytotoxischen Effekt auf Zielzellen (nach der Freisetzung aus Makrophagen) über drei verschiedene Mechanismen entfalten kann (Childress and Stechmiller 2002):

- Änderung des Membranpotentials an der Plasmamembran durch Störung der Membrankanäle
- Inhibition mitochondrialer Prozesse der Atmungskette



- Bindung der Ribonukleotidreduktase (Enzym der DNA-Synthese)

Zur Wirkung von  $\text{NO}\cdot$  in Wunden wurden zwischenzeitlich viele Studien durchgeführt, die es ermöglichen einige Aspekte des Zusammenspiels von  $\text{NO}\cdot$  und der Wundheilung zu erhellen. So wurde festgestellt, dass  $\text{NO}\cdot$  ein bedeutender Faktor bei der Neoangiogenese ist. Einerseits kann es über bestimmte Signalwege direkt die Angiogenese fördern (Donnini and Ziche 2002), andererseits dient es als Mediator bei der Vermittlung des Effekts von VEGF (Morbidegli, et al. 1996). Weiterhin spielt  $\text{NO}\cdot$  eine wichtige Rolle bei der initialen Entzündungsreaktion der Wundheilung. Während der frühen Inflammationsphase konnte im Mausmodell eine hohe Konzentration an  $\text{NO}\cdot$  gemessen werden, die nach ungefähr drei Tagen beim Übergang in die Proliferationsphase allmählich zu Gunsten einer steigenden Konzentration von Ornithin und Harnstoff zu sinken beginnt (Albina, et al. 1990). Dies impliziert eine Verlagerung des Arginin-Stoffwechsels vom initial dominierenden NOS-Pfad zum Arginase-Pfad. Einer Arbeit von Yamasaki et al. (Yamasaki, et al. 1998) zufolge konnte bei iNOS-Knock-Out Mäusen eine Wundheilungsverzögerung von 31% gegenüber Wild-Typ Tieren verzeichnet werden. Außerdem wurde bei dieser Studie beobachtet, dass nach einem adenoviral-vermittelten iNOS Gentransfer die Wunde wieder normal zu heilen begann. Neben diesen Beobachtungen wurde auch festgestellt, dass  $\text{NO}\cdot$  als Mediator proinflammatorischer Enzyme gilt (Luo and Chen 2005). Auch die Proliferationsphase der Wundheilung wird maßgeblich von  $\text{NO}$  mitbestimmt. Inhibitoren der iNOS vermindern die Proliferationsrate von Keratinozyten, während niedrige  $\text{NO}$ -Konzentrationen das Wachstum der Keratinozyten *in vitro* stimulieren können (Stallmeyer, et al. 1999). Ebenso wird die Proliferation und Protektion von Endothelzellen und deren VEGF-Produktion durch  $\text{NO}$  positiv beeinflusst (Frank, et al. 2002). Schließlich wird auch die Bildung von Kollagen und somit die mechanische Belastbarkeit der Wunde zum Teil von  $\text{NO}\cdot$  mitbestimmt (Schaffer, et al. 1996).

### ***2.2.3.3. Oxidativer Stress***

Oxidativer Stress in der Wunde wird hauptsächlich über reaktive Stickstoffspezies (RNS), wie Peroxynitrit ( $\text{ONOO}\cdot$ ) und  $\text{NO}\cdot$ , oder reaktive Sauerstoffspezies (ROS), wie Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), das Superoxid-Radikal ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) oder das Hydroxid-Radikal ( $\text{OH}\cdot$ ), vermittelt (Schafer and Werner 2008). Diese Moleküle entstehen ständig in physiologischen Mengen in allen Zellen und werden unter normalen Bedingungen sofort wieder entgiftet. In entzündeten oder geschädigten Geweben wird durch die Überexpression bestimmter Enzyme, wie der NADPH-Oxidase, große Mengen des reaktiven  $\text{O}_2\cdot^-$  gebildet (Bedard and Krause 2007). Die folgenden Vorgänge wurden von Schafer et al. (Schafer and Werner 2008) zusammengefasst: Das Superoxid-Radikal kann entweder unter Einbezug des schon



erwähnten  $\text{NO}\cdot$  zu dem Metaboliten Peroxynitrit oder über die Superoxid Dismutase (SOD) zu Wasserstoffperoxid reagieren.  $\text{H}_2\text{O}_2$  wird physiologischerweise über Katalase und andere Entgiftungsenzyme zu Wasser und Sauerstoff abgebaut. Sollte dies nicht in ausreichender Menge oder Geschwindigkeit vonstattengehen, kann es bei Anwesenheit von Kupfer- oder Eisenionen zur Fenton-Reaktion kommen, die durch die Bildung eines Hydroxyl-Radikals charakterisiert ist. Dieses Radikal ist sehr reaktiv und kann eine Reihe von nachteiligen Veränderungen einschließlich Lipidoxidation, Protein- und DNA-Modifikation auslösen, die Stress, Apoptose oder Nekrose für die Zelle bedeuten können. Um dies zu verhindern, müssen in der Zelle Antioxidantien (Vitamin E, Glutathion, Curcumin) und Entgiftungsmoleküle (SOD, Katalase, Glutathion-Peroxidase, Peroxiredoxin) aktiv werden. Eine graphische Zusammenfassung dieser Vorgänge findet sich in Abb.4.

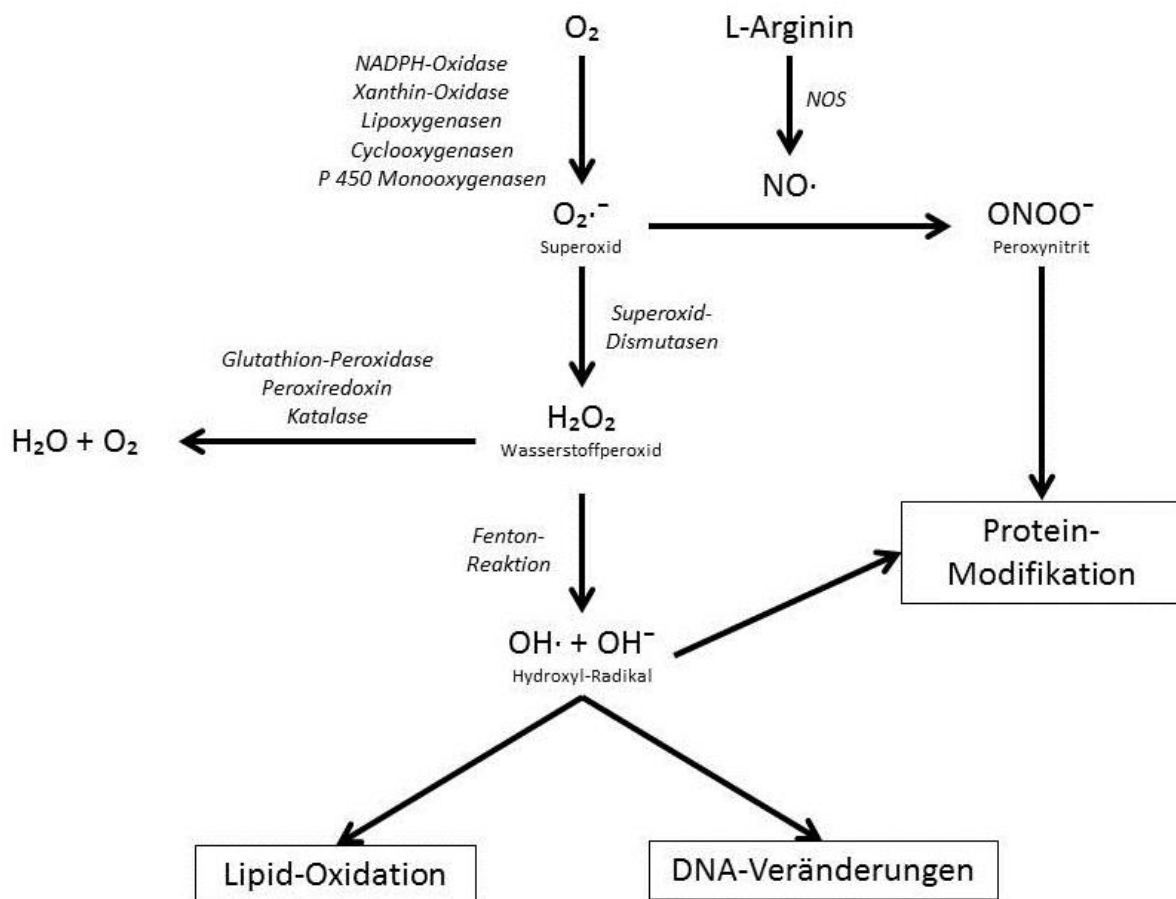


Abb.4: Komponenten des oxidativen Stress; modifiziert nach (Schafer and Werner 2008)

Die Wirkung von reaktiven Spezies (RS) muss differenziert betrachtet werden. In geringen Mengen sind sie zur Abwehr von Pathogenen nötig (Clark 1996) und dienen als Mediatoren intrazellulärer Signalkaskaden (D'Autreaux and Toledano 2007), die wichtig für eine effiziente Angiogenese sind (Roy, et al. 2006). Dahingegen erzeugen große Mengen ROS oxidativen

Stress in der Wunde, was neben Zellschäden und vorzeitiger Zellalterung (Sies 1991) sogar zur Karzinogenese beitragen kann (Cerutti and Trump 1991). Weiterhin implementieren Studien zu Antioxidantien (Musalmah, et al. 2005; Rasik and Shukla 2000) und ROS-Entgiftungsenzymen (Kumin, et al. 2006), dass oxidativer Stress die Wundheilung stören und verzögern kann.

Eine Quantifizierung des oxidativen Stress kann, wie in dieser vorliegenden Arbeit durchgeführt, durch die Untersuchung bestimmter Substanzkonzentrationen erfolgen. ROS können entweder direkt oder über sekundäre Nebenprodukte Proteine oxidieren. Als Produkt dieser Reaktionen entstehen vor allem Protein-Carbonyl-Derivate. RNS verursachen oftmals eine Protein-Nitrierung, die besonders an der Aminosäure Tyrosin stattfindet. Um also Aussagen über den in der Wundflüssigkeit vorherrschenden oxidativen Stress zu treffen, wurden in dieser Arbeit die Protein-Carbonyl- und Nitrotyrosin-Konzentrationen bestimmt.

## 2.3. Plasma

### 2.3.1. Grundlagen

In der Physik werden vier verschiedene Aggregatzustände von Materie beschrieben. Neben dem festen, flüssigen und gasförmigen Zustand gibt es das weniger bekannte Plasma. Als erstes beschrieben wurde dies schon 1879 von Sir William Crookes (Crookes 1879). Dieser Zustand kann in der Natur als Blitz oder als Nordlicht beobachtet werden. Weiterhin wird angenommen, dass ein Großteil der kosmischen Phänomene - wie stellare Winde oder der Sonnenkranz - auf diesem Zustand basiert.

Plasma entsteht vereinfacht gesprochen, wenn Materie im gasförmigen Zustand weiter Energie zugeführt wird und sie den nächsten Aggregatzustand erreicht. Dies äußert sich in einer Ionisierung des Gases durch Dissoziation von Elektronen, die sich frei bewegen können und weitere Moleküle anregen.

Die Plasmatechnologie wird schon seit einigen Jahren in vielen verschiedenen Bereichen genutzt. Während zu Anfangszeiten zunächst vor allem heißes Plasma mit Temperaturen von über 80° Celsius in Bereichen wie der Sterilisation von medizinischem Equipment, zum Entfernen von Gewebe oder zur Kauterisation genutzt wurde, hat sich mit der Entdeckung des kalten Plasmas das Spektrum der Anwendungen um ein vielfaches erweitert. So findet man heutzutage kaltes Plasma in Fernsehern, Lichtquellen, im Hygienebereich zur Desinfektion (Moisan, et al. 2001), in der Zahnmedizin zur Behandlung chronischer Erkrankungen oder zum Bleichen von Zähnen (Lee, et al. 2009), bei der Verjüngungsbehandlung von Haut in der Dermatologie (Potter, et al. 2007) und in vielen

anderen Bereichen. Zudem finden klinische Untersuchungen zum Effekt von Plasma auf chronische Wunden statt (Isbary, et al. 2010).

### 2.3.2. Plasmaarten

Plasma kann anhand verschiedener Kriterien differenziert werden (Heinlin, et al. 2011): Zum einen wird mittels des Umgebungsdrucks unterschieden, der bei der Erzeugung vorherrschen muss. Hierbei spricht man von Niederdruck-, Hochdruck-Plasmen oder Plasmen, die bei atmosphärischem Druck erzeugt werden. Weiterhin wird mithilfe von der Konfiguration und der Temperatur des Plasmas zwischen heißem und kaltem Plasma differenziert. „Kalt“ bedeutet in diesem Fall, dass in dem erzeugten Plasma schwere Teilchen (Ionen, Neutronen) annähernd Raumtemperatur besitzen, während Elektronen hohe Energien aufweisen und dementsprechend heiß sind, ohne jedoch die Gesamttemperatur des Plasmas auf thermisch schädigende Werte anzuheben (Moisan, et al. 2001). Neben diesen Kriterien muss auch noch die Erzeugungsart, die spezifische Zusammensetzung und das verwendete Trägergas des Plasmas berücksichtigt werden.

Für diese Arbeit ist besonders das sogenannte kalte atmosphärische Plasma (CAP) interessant. Kong et al. (Kong, et al. 2009) beschreiben drei verschiedene Arten der CAP-Erzeugung:

- **Direktes Plasma:** Das Plasma wird mittels elektrischer Entladungen zwischen zwei Elektroden - separiert durch eine isolierende Schicht - erzeugt. Diese Plasmaquellen nutzen zur Plasmaerzeugung direkt die zu behandelnde Haut oder das Zielgewebe als zweite Elektrode. Dabei kommt es zu Ladungsströmen durch den Körper oder das Gewebe.
- **Indirektes Plasma:** Das Plasma wird zwischen zwei Elektroden erzeugt und dann mittels eines Gasflusses zum Zielgebiet transportiert. Hierbei unterscheiden sich die existierenden Geräte sowohl hinsichtlich der Trägergase als auch in ihrer Fähigkeit große Zielgebiete zu behandeln. Die Palette verwendeter Quellen reicht von der Plasma-Nadel (Sladek and Stoffels 2005) bis hin zur Argon-Plasma-Fackel (Shimizu, et al. 2008). Der in dieser Arbeit zum Einsatz gekommene MicroPlaSter β bedient sich ebenso dieser Technologie.
- **Hybrid-Plasma:** Hybridplasmen werden mittels Oberflächen Mikroentladungselektroden (Surface Micro Discharge (SMD) Electrodes), die aus einer Metallelektrode, einer isolierenden Schicht und einer Gitterelektrode bestehen, erzeugt (Li, et al. 2012). Diese SMD Elektroden erzeugen Mikroentladungen auf einer geerdeten Gitterelektrode. Der reaktive Plasma Cocktail - bestehend aus Elektronen, Ionen, angeregten Atomen und Molekülen sowie reaktiven Spezies – erreicht mittels

Diffusion das Zielgewebe. Der Vorteil von SMD Elektroden ist, dass - im Gegensatz zu direkten Plasmen - die Haut oder das Zielgewebe nicht als zweite Elektrode fungiert und der Fluss von Ladungsströmen durch das Gewebe verhindert wird. Die bei den Zellversuchen genutzte Plasmaquelle miniFlatPlaSter nutzt diese Art der Plasmaerzeugung.

### 2.3.3. Plasmazusammensetzung

Die exakte Zusammensetzung von Plasmen variiert je nach Erzeugungsart, verwendeter Quelle, genutztem Trägergas sowie der eingebrachten Energie. Nichtsdestotrotz fassten Heinlin et al. (Heinlin, et al. 2011) zusammen, dass grundsätzlich folgende Bestandteile unterschieden werden können:

- UV-Strahlung (UVA, UVB, UVC)
- Elektronen und Ionen
- Angeregte Atome und Moleküle
- Hitze
- Elektrische Felder
- ROS (O, OH $\cdot$ , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>)
- RNS (NO $\cdot$ , NO<sub>2</sub>)

CAPs sind in der Lage ungefähr 10<sup>9</sup> bis zu 10<sup>10</sup> aktive Metaboliten pro cm<sup>2</sup> und Sekunde zu übertragen (Heinlin, et al. 2011). Die Applikation von Plasma auf den menschlichen Körper sollte natürlich kontrolliert und in einer nicht schädlichen Dosis erfolgen. Zur Orientierung dienen hierbei die vorgegebenen Richtwerte der einzelnen Komponenten, die beachtet werden müssen. So darf nach WHO Richtlinie (ICNIRP) die UV-Strahlung nicht den Wert von 30 J/m<sup>2</sup> überschreiten. Laut CPSC (Consumer Products Safety Commission Report 2006) liegt das Limit der Ozon-Konzentration bei 50 ppm. Die Obergrenze für die Exposition gegenüber NO<sub>2</sub> beträgt 5 ppm und für NO $\cdot$  25 ppm über einen 8-stündigen Zeitraum (US National Institute for Occupational Safety and Health). Erste Untersuchungen zur Sicherheit des miniFlatPlaSters (der auch in dieser Arbeit verwendet wurde) von Isbary et al. (Isbary, et al. 2013) zeigen, dass sich dieses Plasmagerät innerhalb der vorgegebenen Richtwerte bewegt. Jedoch gibt es natürlich nicht für alle Plasmabestandteile solche genauen Grenzwerte. Weiterhin muss bedacht werden, dass bisher noch keine speziell für CAP-Anwendungen angepassten Empfehlungen entwickelt wurden.

## 2.3.4. Plasmawirkung

### 2.3.4.1. Prokaryoten

Die bisherigen Untersuchungen und Studien zur Wirkung von Plasma auf Prokaryoten hatten vor allem zwei Themenkomplexe zum Gegenstand: Die Dekontamination von einerseits unbelebten und andererseits biologischen Oberflächen. Plasma bot sich hierfür besonders aufgrund seiner Fähigkeit auch in kleinsten Spalten vorzudringen, seiner Unabhängigkeit von den Oberflächengegebenheiten und seiner schnellen und qualitativ hochwertigen Desinfektion an (Heinlin, et al. 2011). Die Ergebnisse bestätigten einen starken bakteriziden Effekt gegen grampositive und gramnegative Bakterien (Sladek and Stoffels 2005; Venezia, et al. 2008), Biofilm-produzierende Bakterien (Joaquin, et al. 2009), Viren (Zimmermann, et al. 2011), Pilze (Maisch, et al. 2012) und Sporen (Hong, et al. 2009). Diese Ergebnisse gewinnen besonders bei der Betrachtung der Probleme mit multiresistenten Keimen an klinischer Relevanz, da bis jetzt weder primäre noch sekundäre Resistenzen von Bakterien gegenüber Plasma entdeckt wurden (Heinlin, et al. 2011).

Die Mechanismen, mit deren Hilfe diese Effekte erreicht werden, sind noch nicht in vollem Umfang geklärt. Sie umfassen jedoch wahrscheinlich zum einen physikalische Effekte vermittelt durch ROS, RNS, UV-Strahlung und geladene Partikel. Zum anderen sollen biologische Reaktionen durch plasmainduzierte zelluläre Prozesse, die Zellmembran- und DNA-Schäden zur Folge haben, eine Rolle spielen (Joaquin, et al. 2009; Lerouge, et al. 2001; Moisan, et al. 2001; Sladek and Stoffels 2005).

### 2.3.4.2. Eukaryoten

Vor allem im Bereich der Plasmamedizin wurden viele Untersuchungen zu den Wirkungen von Plasmen auf eukaryote Zellen und Gewebe sowohl in vivo als auch in vitro durchgeführt. Hierbei ist es wichtig zu bedenken, dass bei den einzelnen Arbeiten oftmals unterschiedliche Plasmaquellen und -dosen verwendet wurden. Somit ist eine direkte Übertragung der Ergebnisse zwischen den einzelnen Geräten nicht möglich. Nichtsdestotrotz kann man anhand dieser Untersuchungen diverse prinzipielle Effekte des Plasmas identifizieren.

So wurde festgestellt, dass Plasma hitzeunabhängig natürliche Koagulationsprozesse im Blut induzieren kann (Fridman, et al. 2006), was bei der Wundbehandlung und in der Chirurgie genutzt werden kann. Bei Endothelzellen konnte eine Steigerung der Proliferation unter Behandlung mit niedrig dosiertem Plasma beobachtet werden, was einer erhöhten Produktion von Wachstumsfaktoren (FGF 2) zugeschrieben wird (Kalghatgi, et al. 2010).

Generell war ersichtlich, dass die Effekte von Plasma auf Fibroblasten, Endothelzellen und andere Zellarten stark abhängig von der Dosis und der Zeit der Plasmaeinwirkung sind (Kong, et al. 2009). Neben proliferationsfördernden Wirkungen konnte dosisabhängig auch eine Störung der Zell-Adhäsion, eine Induktion von Apoptose oder Nekrose der Zellen beobachtet werden (Stoffels, et al. 2008). Ein weiterer interessanter Aspekt, der die Anwendungsbereiche von Plasmen wiederum erweitern kann, ist die dosisabhängige Induktion der Apoptose in Melanom-Zellen unter Plasmabehandlung (Fridman, et al. 2007). Weiterhin kann angenommen werden, dass lebende Zellen bei Dosen, die für die bakterielle Dekontamination benötigt werden, nicht geschädigt werden (Shashurin, et al. 2008). Dies wird auf drei verschiedene Mechanismen zurückgeführt (Dobrynin, et al. 2009): Aufgrund ihres Metabolismus, der sich von den Prokaryoten unterscheidet, sind Eukaryoten besser vor ROS geschützt. So verfügen viele eukaryote Zellen über Enzyme und Schutzfunktionen gegenüber Stressoren wie  $O_2^-$ , die bei prokaryoten Organismen entweder nur in äußerst geringer Konzentration oder überhaupt nicht vorhanden sind. Weiterhin erscheinen Organismen höherer Ordnung resistenter gegenüber externem Stress, da sie im Gegenteil zu Prokaryoten, die meist als einzelne Zelle agieren, die Fähigkeit besitzen, innerhalb von organisierten Zell-Verbunden untereinander zu kommunizieren. Schädliche Einflüsse können somit auf mehrere Zellen verteilt werden. Zuletzt ist das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen bei Prokaryoten viel höher, so dass geringere Plasmadosen zur Schädigung nötig sind.

### 3. Zielsetzung der Arbeit

Wie einleitend gezeigt wurde stellen chronische Wunden in den heutigen Industrienationen ein relevantes Problem dar, für das dringend neue Therapieoptionen gesucht werden. Die Plasmamedizin kann mit einem innovativen Lösungsansatz dienen. Um den Plasmaeinfluss auf die Wundheilung besser beschreiben und quantifizieren zu können, soll in der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen von Plasmabehandlungen auf das Wundmilieu chronischer Wunden untersucht werden. Hierbei liegt der Fokus vor allem darauf in einer Art Pilotstudie Methoden und Parameter zu identifizieren, die sich eignen die zu Grunde liegenden Prozesse der Plasmawirkung des Plasmageräts MicroPlaSter  $\beta$  zu charakterisieren. Weiterhin beschäftigt sich diese Dissertation mit Plasmaeffekten der Plasmaquelle miniFlatPlaSter auf Bindegewebszellen in vitro, um Feststellungen bezüglich der grundlegenden Mechanismen des Wechselspiels zwischen Plasma und Wundheilung im Modell zu treffen. Dafür gliedert sich die Arbeit in zwei unterschiedliche Abschnitte.

Im ersten Teil wurden Wundflüssigkeiten, die von Patienten mit chronischen Wunden gewonnen wurden, vor und nach Behandlung mit der indirekten Plasma-Quelle MicroPlaSter  $\beta$  analysiert. Die Parameter, die dabei untersucht wurden, waren:

- der pH-Wert
- die NOx-Konzentration, um Rückschlüsse auf die ursprüngliche NO-Konzentration ziehen zu können
- die Protein-Carbonyl- und Nitrotyrosin-Konzentration, um Aussagen über den oxidativen Stress, der in der Wunde vorherrschte, treffen zu können.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit Bindegewebszellen (NIH 3T3 Fibroblasten), die mit der Hybrid-Plasma-Quelle miniFlatPlaSter behandelt wurden. Wiederum wurden die Parameter pH-Wert und NOx-Konzentration sowohl vor als auch nach Plasmabehandlung bestimmt. Um Aussagen zum oxidativen Stress und dessen Einfluss auf die Zellaktivität und Zellvitalität zu treffen, wurden ein MTT- und ein LDH-Assay angewandt.

Die experimentellen Ansätze dienten einerseits der Identifikation geeigneter Methoden zur Bestimmung der Parameter, die während der Plasmabehandlung variierten. Andererseits sollten diese Veränderungen des Wundmilieus charakterisiert und quantifiziert werden. Dies geschah vor allem unter dem Gesichtspunkt der Entwicklung individueller Plasmen zur Unterstützung der Wundheilung und -regeneration.

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Material

#### 4.1.1. Reagenzien und Apparaturen

Die benutzten Pipetten, Multipipetten und dazugehörigen Combitips® stammen vom Eppendorf Vertrieb, Wesseling-Berzdorf, Deutschland. Die verwendeten Pipettenspitzen, Proben- und Reaktionsröhrchen und Küvetten wurden, soweit nicht anders erwähnt, von Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland bezogen. Die Petrischalen, 6-Well und 96-Well Platten waren, wenn nicht anders gekennzeichnet, von der Firma TPP®, Schweiz. Die Glaspipetten waren von Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland. Die bei der Extraktion der Wundflüssigkeit genutzten Spritzen (Typ Luer Lock 5 ml) waren aus dem Hause Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland. Die ebenso bei der Extraktion angewendeten 10 kDa Filter (Ultracell®) stammen von Millipore, Cork, Irland. Die Zählungen der Zellen wurden mit einer Neubauer improved Zählkammer von Superior Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland durchgeführt.

Zudem kamen bei der Arbeit folgende Lösungen, Reagenzien und Assays zum Einsatz (Tab.1):

<b>Lösung/Assay</b>	<b>Firma</b>
Triton X-100	Biomedicals Inc., Aurora, Ohio, USA
Dulbeccos PBS (1X)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Accutase	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Fetal Bovine Serum (FCS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
DMEM	Gibco®, Auckland, Neuseeland
MTT-Assay	Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland
LDH-Assay	Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland
Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit	Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA
Bradford Proteinassay	BioRad, München, Deutschland
OxiSelect™ Protein Carbonyl ELISA Kit	Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA, USA
OxiSelect™ Nitrotyrosine ELISA Kit	Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA, USA

Tab. 1: Übersicht über verwendete Reagenzien, Lösungen und Assays



### 4.1.2. Laborgeräte

Im Folgenden sind die bei dieser Arbeit eingesetzten Geräte gelistet (Tab.2):

Gerät	Firma
Inkubator: Heraeus Instruments Cytoperm 2	Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte, Deutschland
Sicherheitswerkbank (Klasse 2 Typ H): Heraeus Instruments Hera safe	Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte, Deutschland
Zentrifuge klein: Eppendorf Centrifuge 5417R	Eppendorf Vertrieb, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Zentrifuge groß: Sigma Laborzentrifuge Typ 4K15	SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland
Spektralphotometer: DU@530 Life Science UV/Vis Spectrophotometer	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
ELISA-Reader: Expert Plus Typ G020150	ASYS Hitech GmbH, Salzburg, Österreich
pH-Meter: Orion 2 Star pH-Bench Top Meter	Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte, Deutschland
Mikroskop: Nikon Eclipse TS 100	Mikrovid GmbH, Ense-Niederense, Deutschland

Tab.2: Übersicht über genutzte Laborgeräte

### 4.1.3. Plasmageräte

#### 4.1.3.1. MicroPlaSter $\beta$

Der MicroPlaSter  $\beta$  (Abb. 5) - entwickelt vom Max-Planck-Institut für extraterrestrische Physik in Kooperation mit der Firma ADTEC Plasma Technology Co. Ltd. (Hiroshima/London) - , der bei den Plasmabehandlungen der Patienten am Klinikum Schwabing (München) in der Abteilung für Dermatologie, Allergologie und Umweltmedizin zum Einsatz kam, nutzt eine Plasmatechnologie, die auf der Erzeugung eines CAP mit Hilfe der Mikrowellentechnologie beruht. Es handelt sich hierbei um eine indirekte Plasmaquelle. Die Gerätedetails wurden von Nosenko et al. beschrieben (Nosenko, et al. 2009).



Abb.5: MicroPlasTer  $\beta$  (mit freundlicher Genehmigung von G. Isbary)

Das Plasma entsteht in der sogenannten Plasma Torch (Abb. 6), die aus einem Aluminiumzylinder mit sechs konzentrisch angebrachten Edelstahlelektroden besteht und die durch eine installierte Luftpumpe gekühlt wird (Shimizu, et al. 2008).

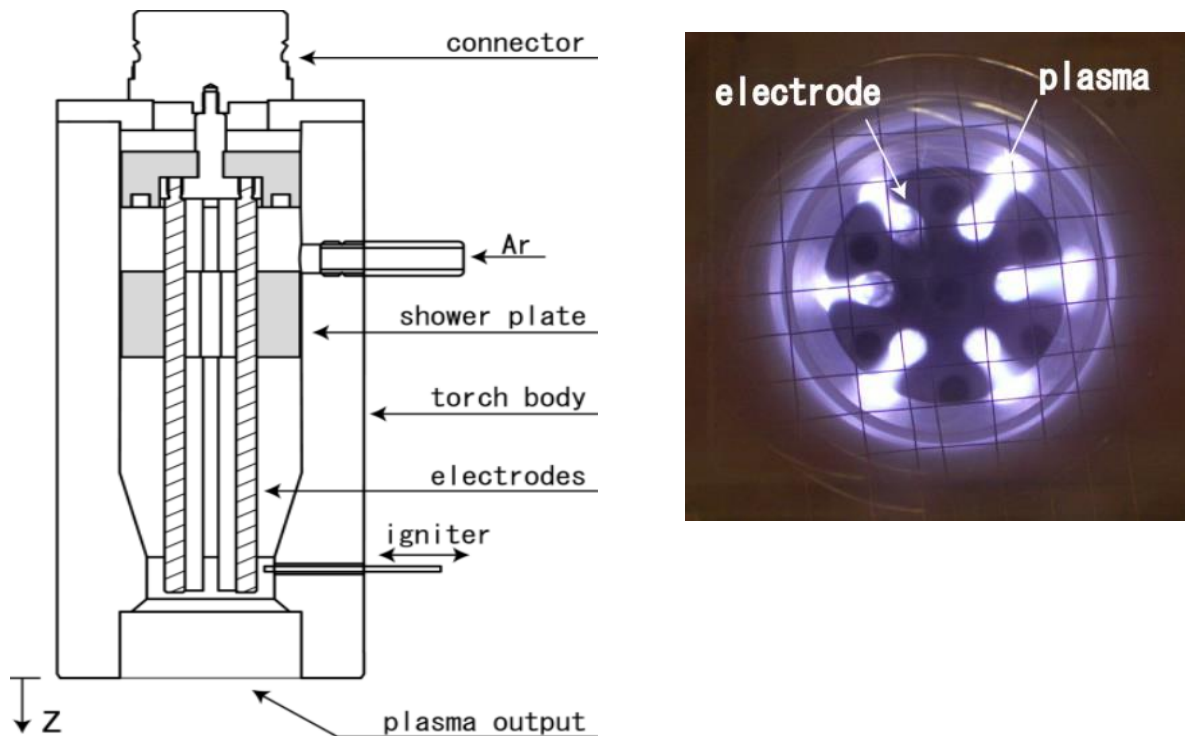


Abb.6: Links: Schematischer Aufbau der Plasma Torch ; Rechts: Bild der arbeitenden Plasma Torch (Shimizu, et al. 2008)

Als Trägergas für das Plasma wird Argon genutzt. Wie bereits erläutert erzeugt auch der MicroPlaSter  $\beta$  einen reaktiven Plasmacocktail bestehend aus Elektronen, Ionen, angeregten Atomen und Molekülen, reaktiven Spezies und UV-Strahlung. Dabei liegt die erzeugte UV-Strahlung innerhalb der vorgegebenen ICNIRP-Richtwerte (Abb. 7).

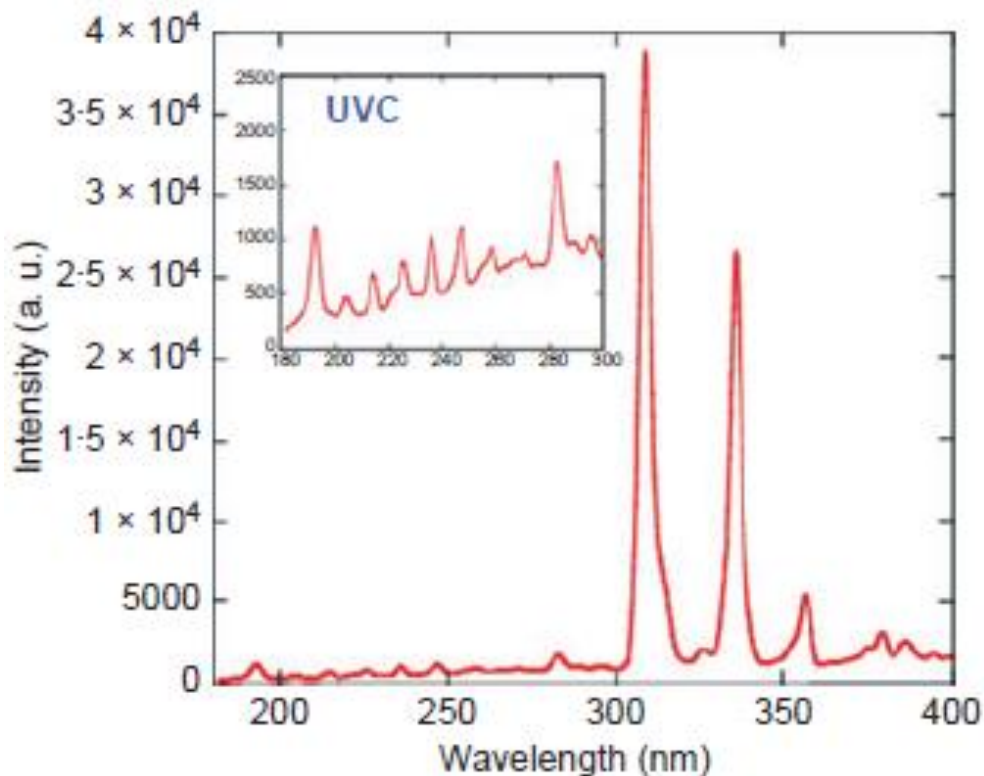


Abb.7: Argon-Plasma erzeugt polychromatisches UV-Licht mit 2 Haupt-Peaks im UVA- (336 nm) und UVB-Bereich (309 nm) (Isbary, et al. 2012)

#### 4.1.3.2. miniFlatPlaSter

Das Plasmagerät miniFlatPlaster (entwickelt am Max-Planck-Institut für extraterrestrische Physik) basiert auf der in Kapitel 2.3.2 beschriebenen SMD-Technologie und wurde für die Versuche mit den NIH 3T3 Zellen verwendet. Der miniFlatPlaSter wurde in einer Publikation von Li et al. (Li, et al. 2012) charakterisiert. Bei diesem Plasmagerät handelt es sich um eine sogenannte Hybrid-Plasma-Quelle. Die SMD-Technologie, die hier genutzt wird, erzeugt mittels Mikro-Entladungen CAP in der umgebenden Raumluft. Die Elektrode des miniFlatPlaSters besteht aus einem Geflecht aus Edelstahl (circa 30 Maschen pro Inch bei einer Drahtdicke von 0,2 mm), das zum Ableiten der Ladungen dient, einer Epoxidglasfaserplatte (Dicke 1 mm), die als dielektrische Barriere dient, und einer anliegenden Kupferfolie (Dicke circa 0,2 mm) umhüllt mit Kaptonklebeband, um ungewollte

elektrische Entladungen zu vermeiden. Das zur Plasmaerzeugung notwendige Hochspannungssignal wird von einer von den Mitarbeitern des MPE entworfenen Stromquelle erzeugt, die sich aus Batterien, einem Zeitschalter, einem Metall-Oxid-Halbleiter-Feldeffekttransistor und einem Transformator zusammensetzt. Die dabei erzeugten Spannungsspitzen liegen bei ungefähr 7 kV bei einer Frequenz von 6,75 kHz. Die gesamten Bestandteile des miniFlatPlaSters wurden in einen handlichen Kunststoffzylinder verbaut, so dass das Gerät portabel ist. Abbildung 8 zeigt den schematischen Aufbau dieser Plasmaquelle.

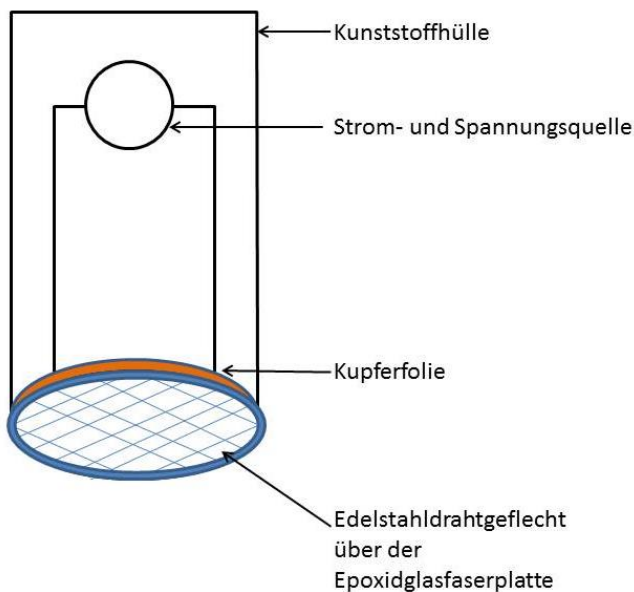


Abb.8: Schematischer Aufbau des miniFlatPlaSters

Wird nun ein Hochspannungssignal zwischen dem Edelstahlgeflecht und der Kupferfolie angelegt, werden benachbarte Elektronen energetisch stark angeregt. Dadurch werden wiederum Sauerstoffmoleküle angeregt und eine Kettenreaktion in Gang setzt, die letztendlich ein komplexes Plasma auf Seiten des Drahtgeflechts erzeugt. Da bei dem miniFlatPlaSter kein zusätzliches Gas verwendet wird, muss das gebildete Plasma zum Ziel- und Wirkort (in diesem Fall: die Zellen im Medium und das Medium an sich) durch Diffusion gelangen. Diverse Vorgänge, die hierbei eine Rolle spielen, wurden schon eingehend untersucht (Amiranashvili and Yu 2002; Losseva, et al. 2007; Ma, et al. 2002).

Die Energiedichte, die bei der Plasmaerzeugung entsteht, liegt nach Berechnungen der Mitarbeiter des MPE bei ungefähr  $0,5 \text{ W/cm}^2$  bei einem Durchmesser der SMD-Elektrode von 28 mm.

#### **4.1.4. Zellen**

Die in den Experimenten verwendete Zelllinie NIH 3T3 war eine freundliche Gabe der AG Bassermann unter der Leitung von PD Dr. Florian Bassermann (III. Medizinische Klinik und Poliklinik, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München). Hierbei handelt es sich um embryonale Zellen der Maus (*Mus Musculus*). Morphologisch sind es Fibroblasten, die in einem adhärenthem Monolayer wachsen (DSMZ No.: ACC 59).

### **4.2. Methoden**

#### **4.2.1. Versuche mit Wundflüssigkeit**

##### **4.2.1.1. Patienten**

Die Patienten, die für die Untersuchung der Wundflüssigkeiten herangezogen wurden, wurden über das Projekt mündlich und schriftlich informiert und unterschrieben eine Einverständniserklärung. Die Teilnahme erfolgte freiwillig und ist im Einklang mit der Deklaration von Helsinki. Alle Patienten litten unter chronischen Wunden der unteren Extremität unterschiedlicher Ätiologie. Sie sind nachfolgend in Tabelle 3 erfasst.



#### *4.2.1.2.Sammeln der Wundflüssigkeit*

Die im Folgenden erwähnten Arbeitsschritte wurden freundlicherweise von Frau Julia Schäfer und Herrn Dr. med. Georg Isbary am Klinikum Schwabing (München) in der Abteilung für Dermatologie, Allergologie und Umweltmedizin unter der Leitung von Chefarzt Prof. Dr. med. Wilhelm Stolz übernommen.

Den Patienten wurde auf die zunächst unbehandelte Wunde (weder desinfiziert, noch unter Antibiose) ein PermaFoam Cavity Schaumverband (Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland) aufgelegt, der dort 24 Stunden verblieb. Nach Entfernung des Schaumverbandes und Säuberung der Wunde mit isotoner Kochsalzlösung 0,9% (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) wurden die Patienten mit dem MicroPlaSter  $\beta$  nach einem individuell festgelegten Schema behandelt. Im Anschluss wurden erneut auf die Wunden PermaFoam Cavity Schaumverbandstücke für ein Intervall von 24 Stunden aufgebracht.

Die PermaFoam-Stücke wurden sofort in 14 ml Probenröhrchen bei  $-71^{\circ}$  Celsius schockgefroren und anschließend in der mikrobiologischen Abteilung des Klinikums Schwabing (München) gelagert.

#### *4.2.1.3.Extraktion und Reinigung der Wundflüssigkeit*

Zunächst wurden die eingefrorenen Schaumverbandstücke in 5 ml Spritzen (Omnifix Luer Lock von B. Braun Melsungen AG) umgelagert, nachdem die Stempel der Spritzen entfernt wurden. Die befüllten Spritzen wurden nun wiederum in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen eingeführt und bei  $4^{\circ}$  Celsius mit einer Kraft von 2000 g 10 Minuten lang zentrifugiert, so dass die Wundflüssigkeit aus dem PermaFoam Cavity Schaum gepresst wurde und sich am Boden des Zentrifugenröhrchens sammelte. Am Ende dieses als Zentrifugation 1 bezeichneten Arbeitsschrittes erhielt man die ungereinigte Wundflüssigkeit. Schematisch ist dies in Abbildung 9 dargestellt.

Nach Extraktion der Proben folgte nun die Reinigung. Im nächsten Schritt wurde hierfür die extrahierte Wundflüssigkeit in 1,5 ml Röhrchen übertragen. Das Extrakt wurde daraufhin bei  $4^{\circ}$ Celsius bei 10000 g für 15 Minuten zentrifugiert, um mögliche Zellüberreste zu trennen. Dieser Arbeitsschritt wird Zentrifugation 2 genannt. Der hierbei entstandene Überstand wurde erneut in saubere 1,5 ml Röhrchen transferiert, während das Sediment verworfen wurde.

In der nächsten Stufe des Reinigungsprozesses wurden 400  $\mu$ l des abzentrifugierten Überstandes in einen 10kDa Exclusion Filter (Millipore, Bedford, MA) pipettiert und bei  $4^{\circ}$  Celsius und 14000 g für 55 Minuten zentrifugiert. Diese letzte Zentrifugation wird als

Zentrifugation 3 bezeichnet. Als Endprodukt erhält man einerseits ein Filtrat, welches für den NO<sub>x</sub>-Assay und die pH-Messung verwendet wurde, und andererseits eine feste Fraktion, die für die Ermittlung des Gesamtproteingehaltes, den Protein-Cabonyl-Assay und den Protein-Nitrotyrosin-Assay genutzt wurde.

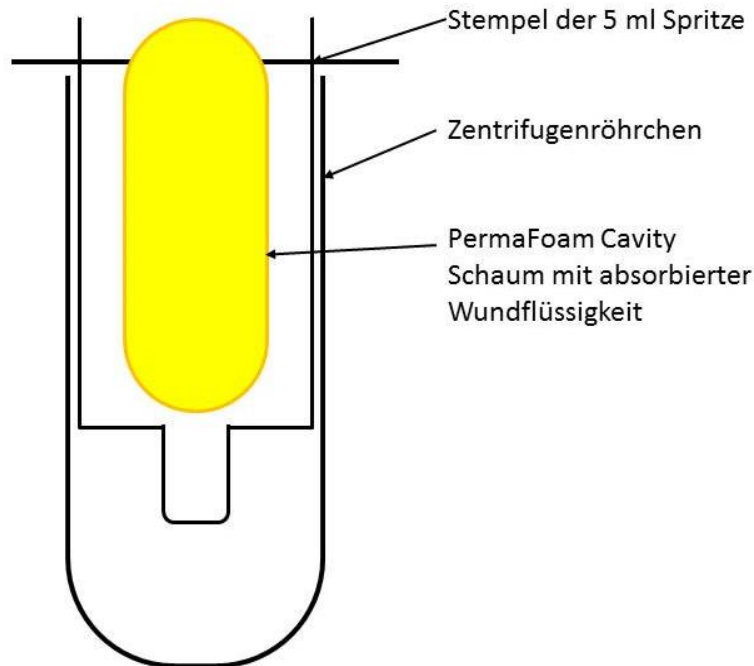


Abb.9: Schematische Darstellung der bei Zentrifugation 1 verwendeten Proben

#### 4.2.1.4. pH-Wert Bestimmung

Die pH-Wert-Bestimmungen fanden jeweils im flüssigen Filtrat der nach Zentrifugation 3 extrahierten Wundflüssigkeit mittels des Orion 2 Star pH-Meters statt.

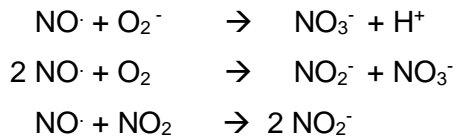
#### 4.2.1.5. NO<sub>x</sub>-Konzentration

Zur Bestimmung der NO<sub>x</sub>-Konzentrationen wurde der Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit aus dem Hause Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, Item No. 780001) verwendet. Die nachfolgend erwähnten Reagenzien und Materialien waren, soweit nicht anders angegeben, Bestandteil des Kits. Ebenso stützen sich die in diesem Abschnitt erwähnten Überlegungen und Vorgehensweisen auf die beigelegte Arbeitsanweisung dieses Kits.

Um Rückschlüsse auf die NO-Konzentration in den Patientenproben ziehen zu können, wurde die Gesamtkonzentration von NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (Nitrit) und NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Nitrat) bestimmt. Dies sind



stabile Endprodukte von natürlichen Reaktionen, die das flüchtige NO $\cdot$  in biologischen Flüssigkeiten durchläuft:



Das Nachweisverfahren beruht im Prinzip auf zwei Schritten. Zunächst wird das in der Probe enthaltene Nitrat mit Hilfe von einer Nitrat-Reduktase und den dafür erforderlichen Koenzymen zu Nitrit reduziert. Nun enthält die Probe nur noch Nitrit, welches über eine erste Reaktion mit Sulfanilamid (Griess Reagent 1) und eine zweite Reaktion mit N-(1-Naphtyl)ethylendiamin (Griess Reagent 2) zu einer dunkelvioletten Azo-Verbindung umgewandelt wird. Durch eine photometrische Bestimmung des Absorptionsgrad bei 540 nm lassen sich nun in Verbindung mit einer Nitrit-Standardkurve Aussagen über die Nitrit-Konzentration in der Probe treffen, was wiederum Rückschlüsse auf die NO-Konzentration in der anfänglichen Wundflüssigkeit des Patienten erlaubt. Die Messungen wurden jeweils in Duplikaten angefertigt.

#### *4.2.1.6. Messung der Gesamtproteinkonzentration*

Die Messung der Gesamtproteinkonzentration ist als Grundlage für die Bestimmung der Protein-Carbonylierung und -Nitrierung notwendig. Hierfür wurde die Methode nach Bradford (Bradford 1976) genutzt.

Das Prinzip des Bradford Assays beruht auf einer Änderung des Absorptionsmaximums des Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 von 470 nm im nativen Zustand zu 595 nm nach Komplexbildung mit Proteinseitenketten im sauren Milieu. Hierbei wird der Farbstoff in seine anionische Sulfonatform überführt, so dass ein Farbumschlag der Lösung von Rot nach Blau erkennbar wird. Die Extinktion wird dann bei 595 nm abgelesen. Die für die Reaktion nötigen Reagenzien waren Bestandteil des Bradford Reagenz (Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250, Ethanol, Phosphorsäure).

#### *4.2.1.7. Protein-Carbonylierung*

Die Bestimmung der Protein-Carbonylierung erfolgte, um Aussagen über den vorherrschenden oxidativen Stress zu treffen. Die reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in einem chronischen Wundmilieu können zum einen direkt Proteine oxidieren, zum anderen über sekundäre Nebenprodukte oxidativen Stress ausüben. Als ein Produkt bei diesen oxidativen Stressreaktionen fallen vor allem Protein-Carbonyl-Derivate an, die in diesem Fall

mit dem OxiSelect™ Protein Carbonyl ELISA Kit von Cell Biolabs, Inc. (Katalognummer STA-310) quantifiziert werden. Die Ausführungen und Vorgehensweisen in diesem Abschnitt stützen sich auf das Product Manual für das verwendete Kit. Soweit nicht anders erwähnt waren die benutzten Reagenzien und Materialien Bestandteil des Kits.

Im Prinzip besteht das Assay aus zwei grundlegenden Schritten. In einem ersten Schritt reagieren, nachdem die Proteinproben auf einer 96-Well Platte adsorbiert wurden, die Carbonylgruppen der an der Platte haftenden Proteine mit DNPH (Dinitrophenylhydrazin) und bilden ein Derivat namens Dinitrophenylhydrazon. In dem darauffolgenden Arbeitsschritt werden die Proben zunächst mit einem primären Anti-DNP-Antikörper versetzt und daraufhin mit einem sekundären Antikörper, der mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert ist. Dieses Enzym kann nun ein Substrat, welches zugegeben wird, umsetzen und eine Farbreaktion auslösen. Die Änderung der Absorption kann dann bei 450 nm abgelesen werden. Als Ausgangspunkt für die Anfertigung der Patientenproben diente die feste Fraktion aus Zentrifugation 3. Mit Hilfe der Berechnungen aus der Bestimmung des Gesamtproteins nach Bradford wurde für jede Probe eine Lösung hergestellt, die 10µg Protein pro ml enthielt. Die Messungen erfolgten in Duplikaten.

#### *4.2.1.8. Protein-Nitrierung*

Auch die Protein-Nitrierung wurde als Marker für oxidativen Stress genutzt. Dieser Stress wird vor allem über reaktive Stickstoffspezies vermittelt, wobei besonders Tyrosin als Angriffspunkt für die Nitrierung gilt. Um die Protein-Nitrierung zu ermitteln, wurde das OxiSelect™ Nitrotyrosine ELISA Kit von Cell Biolabs, Inc. (Katalognummer STA 305) verwendet. Die nachfolgend erwähnten Materialien und Reagenzien waren, soweit nicht anders erwähnt, Bestandteil des Kits. Die Überlegungen und Ausführungen in diesem Abschnitt basieren auf dem Product Manual des Kits. Das Prinzip des Nachweisverfahrens ist ein kompetitiver ELISA. Die Proben und Standards werden an einer EIA-Platte adsorbiert und zunächst mit einem Anti-Nitrotyrosin Antikörper und daraufhin mit einem sekundären HRP-konjugierten Antikörper versetzt. Daraufhin wird eine Substratlösung zugesetzt, die vom HRP umgesetzt wird. Dies kann durch eine Absorptionsänderung im Bereich von 450 nm beobachtet werden. Alle Messungen wurden als Duplikate angelegt.

## 4.2.2. Versuche mit Zellen

### 4.2.2.1 Kultivierung der Zellen

Die NIH 3T3 Fibroblasten wurden in DMEM (+4,5 g/l Glucose, + L-Glutamin, - Pyruvat), welches mit 10% FCS und 1% P/S (jeweils 10000 U/ml) versetzt wurde, als Monolayer-Kulturen kultiviert. Die Inkubation erfolgte im Cytoperm 2 Inkubator bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub>. Ein Splitten der Zellen erfolgte alle 48 – 72 Stunden.

### 4.2.2.2. Plasmabehandlung

Zur Behandlung der NIH 3T3 Mausfibroblasten wurde der miniFlatPlaSter verwendet. Die in ihrem jeweiligen Medium (abhängig vom Versuch) kultivierten Zellen wurden, nachdem unmittelbar vor der Behandlung das alte Medium gegen frisches gewechselt wurde (um mögliche Effekte durch verbrauchtes Medium auszuschließen), für definierte Zeiträume (zwischen 30 und 300 Sekunden) dem Plasma ausgesetzt. Je nach Versuchsaufbau wurde daraufhin das Medium erneut gewechselt, um eine Unterscheidung zwischen Medium-vermittelten Effekten und direkten Effekten des Plasmas auf die Zellen zu ermöglichen. Genauere Angaben zu den jeweiligen Versuchen finden sich in den nachfolgenden Abschnitten.

### 4.2.2.3. Bestimmung der NO<sub>x</sub> Konzentration

Die im DMEM (10% FCS, 1% P/S) kultivierten NIH 3T3 Fibroblasten wurden 24 Stunden vor der Behandlung auf einer 6-Well Platte ausgesät, wobei pro Well  $2 \times 10^5$  Zellen in 1,5 ml des Mediums pipettiert wurden. Nach 24-stündiger Inkubationszeit wurde das alte Medium abgesaugt und sofort 2,668 ml frisches Medium zugegeben, um möglichst nur Effekte durch die Plasmabehandlung darzustellen. Das Volumen von 2,668 ml war essentiell, um die gleiche Höhe des Mediums einer 96-Well Platte, die mit 100 µl pro Well befüllt ist, zu gewährleisten. Somit waren die Bedingungen der Plasmabehandlung innerhalb der 6-Well Platte und der 96-Well Platte bezüglich der Strecke, die das Plasma durch das Medium bis zu den Zellen dringen muss, gleich. Im Anschluss an den Mediumwechsel wurde sofort mit der Plasmabehandlung begonnen. Hierfür wurde der miniFlatPlaSter über dem jeweiligen Well der Platte platziert. Die Zellen wurden dann jeweils für 30, 60, 120 und 300 Sekunden behandelt. Bei der 300 Sekunden Behandlung wurde nach je 120 Sekunden für 30 Sekunden pausiert, um den miniFlatPlaSter nicht zu überlasten. Als Kontrolle diente zum einen ein Well, in dem unter gleichen Bedingungen unbehandelte Zellen kultiviert wurden,

zum anderen eine 6-Well Platte ohne Zellen mit jeweils 2,668 ml Medium pro Well, welche ebenso der Plasmabehandlung nach dem gleichen Schema ausgesetzt wurde.

Nach 24-stündiger Inkubation beider Platten wurden jedem Well 10 µl Medium entnommen und mit 70 µl Assay-Puffer des Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit aus dem Hause Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, Item No. 780001) verdünnt. Diese Proben wurden daraufhin nach dem schon bei Punkt 4.2.1.5. ausführlich erläuterten Verfahren hinsichtlich ihres NO<sub>x</sub>-Gehaltes untersucht, wobei die Proben als Triplets angelegt wurden. Jede Messung wurde unabhängig drei Mal wiederholt.

#### ***4.2.2.4. pH-Wert Bestimmung***

Die pH-Wert Bestimmung erfolgte zum einen unmittelbar vor der Behandlung der Zellen und zum anderen 24 Stunden nach der Behandlung der Zellen. Hierfür wurde die gleiche Belegung der 6-Well Platten gewählt, die schon bei der NO<sub>x</sub>-Konzentrations-Bestimmung zum Einsatz kam. Der pH-Wert wurde mit Hilfe des Orion 2 Star pH-Meters im jeweiligen Medium der Zellen bestimmt.

#### ***4.2.2.5. Messung der Zytotoxizität***

Um Erkenntnisse über die potentielle zytotoxische Wirkung des CAPs und die Entstehung von oxidativem Stress abhängig von bestimmten Behandlungszeiten zu gewinnen, wurde das Cytotoxicity Detection Kit (LDH) von Roche Applied Science (Mannheim, Deutschland, Cat. No. 11 644 793 001) genutzt. Diese Methode basiert auf der Erkenntnis, dass Zellen, deren Zellmembranen geschädigt sind, zytoplasmatische Enzyme freisetzen und die Menge an freigesetzten zytoplasmatischen Enzymen direkt mit der Zellyse korreliert (Liu, et al. 2010; Tang, et al. 2008). Als ubiquitär intrazellulär vorkommendes und stabiles Enzym eignet sich hierfür besonders das LDH. Die nachfolgend beschriebenen Ausführungen orientieren sich an den zum Kit gehörigen Arbeitsanleitungen. Die hierfür verwendeten Reagenzien und Lösungen waren, soweit nicht anders erläutert, Bestandteile des Kits. Das Prinzip des Assays beruht auf einer enzymatischen Reaktion. In einem ersten Schritt wandelt dabei das vorhandene LDH Laktat zu Pyruvat um, wobei gleichzeitig NAD<sup>+</sup> zu NADH/H<sup>+</sup> in äquimolaren Mengen reduziert wird. In einem zweiten Schritt wird mit Hilfe der Oxidation des NADH/H<sup>+</sup> zu NAD<sup>+</sup> über einen Katalysator gelbliches Tetrazolium-Salz (INT) zu rötlichem Formazan-Salz reduziert. Mit dieser Reduktion geht eine Änderung der Absorption bei 492 nm einher, die photometrisch bestimmt werden kann.

Alle Messungen wurden als Triplikate angelegt. Jede Messung wurde jeweils drei Mal unabhängig voneinander durchgeführt. Als Low Control (0% Zytotoxizität) dienten unbehandelte Zellen und als High Control (100% Zytotoxizität) mit Triton X-100 vollständig lysierte Zellen. Die Plasmabehandlungszeiten waren 30, 60, 120 und 300 Sekunden. Die Zytotoxizität wurde jeweils nach 1, 12, 24 und 48 Stunden bestimmt.

#### **4.2.2.6. Bestimmung der Zell-Proliferation**

Die Zellproliferation ist ein zusätzlicher Parameter, mit dessen Hilfe eine potentielle Schädigung von Fibroblasten und entstandener oxidativer Stress durch CAP charakterisiert werden kann. Um diese quantitativ darzustellen, kam der Cell Proliferation Kit I (MTT) aus dem Hause Roche Applied Science (Mannheim, Deutschland) zum Einsatz. Die nachfolgenden Beschreibungen basieren auf den zum Kit gehörigen Arbeitsanweisungen. Soweit nicht anders erwähnt, waren die verwendeten Reagenzien und Materialien Bestandteil des Kits.

Grundlage des Assays ist ein Redoxsystem mit dem oxidierten gelblichen Tetrazolium-Salz MTT und der dazugehörigen reduzierten Form (violett-rötliches Formazan-Salz). Das MTT kann mit Hilfe von Enzymen der Atmungskette in Mitochondrien intakter Zellen unter der Anwesenheit der Kofaktoren NADH und NADPH zur Formazan-Form reduziert werden (Altman 1976; Ogur, et al. 1957; Rich, et al. 2001). Der dabei entstehende Farbumschlag von gelb zu rötlich-violett kann photometrisch bestimmt und zur Quantifizierung der Zellvitalität herangezogen werden.

Alle Messungen wurden als Triplikate angelegt. Jede Messung wurde jeweils drei Mal unabhängig voneinander durchgeführt. Als Kontrolle dienten bei diesem Versuch unbehandelte Zellen. Die Plasmabehandlungszeiten waren 30, 60, 120 und 300 Sekunden. Bei einem Teil der behandelten Zellen wurde das Medium direkt nach Plasmabehandlung gewechselt, bei dem anderen Teil der Zellen belassen.

#### **4.2.3. Statistische Analysen**

Die Berechnungen und statistischen Auswertungen wurden mit Hilfe von Microsoft® Excel 2010 und GraphPad Prism® V. 5.01 angefertigt.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Patientenproben

#### 5.1.1. pH-Wert-Messungen

Die Patientenproben sind mit ihren jeweiligen Nummern aus Tabelle 3 (4.2.1.1.) gekennzeichnet. Da bei Patient 2 aus zwei verschiedenen Wunden Proben genommen wurden, existieren 2.1 und 2.2. Ansonsten wurden bei den Patienten aus den gleichen Wunden mehrere Proben genommen. Bei Patient 2 (sowohl Wunde 1 als auch 2) waren nur so geringe Mengen an Wundflüssigkeit vorhanden, dass die Messungen nur einmal erfolgen konnten.

Der durchschnittliche pH-Wert aller Proben lag bei 8,4 bei einem niedrigsten Wert von 7,9 und einem Höchstwert von 8,9. Der durchschnittliche pH der Wundflüssigkeiten vor der Behandlung lag bei 8,4 (Bereich von 8,1 bis 8,7). Der durchschnittliche pH der Wundflüssigkeiten nach der Behandlung lag bei 8,5 (Bereich von 7,9 bis 8,9). Eine graphische Darstellung der Werte findet sich in Abbildung 10.

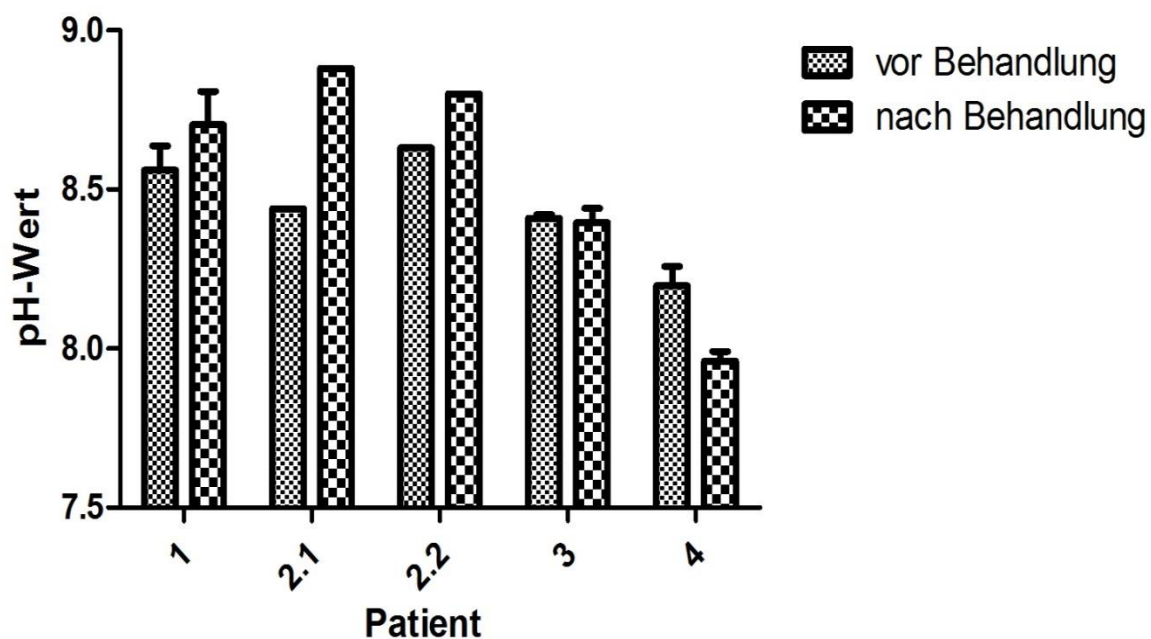


Abb.10: Durchschnittliche pH-Werte der untersuchten Wundflüssigkeiten mit jeweiligem Standardfehler vor und nach Plasmabehandlung

Bei Patient 1 stieg der pH-Wert von 8,6 auf 8,7 nach Plasmabehandlung. Bei Patient 2.1 gab es einen Anstieg von 8,4 auf 8,9. Die Messungen bei Patient 2.2 ergaben einen Anstieg von

8,6 auf 8,8. Patient 3 wies sowohl vor als auch nach Behandlung einen pH-Wert von 8,4 auf. Bei Patient 4 konnte ein Abfall des pH-Werts von 8,2 auf 8,0 beobachtet werden.

### 5.1.2. NO<sub>x</sub>-Bestimmung

Die Nomenklatur der Patientenproben entspricht dem System aus dem Punkt 5.1.1. Wiederum war es bei Probe 2.1 und 2.2 nicht möglich mehrere Messungen durchzuführen, da zu wenig Wundsekret gewonnen wurde.

Die durchschnittliche NO<sub>x</sub>-Konzentration aller Proben betrug 9,67 µM bei einem gemessenen Höchstwert von 19,20 µM und einem niedrigsten Wert von 1,08 µM. Der durchschnittliche Wert vor der Behandlung betrug 9,86 µM (Bereich von 1,60 µM bis 18,37 µM) und nach der Behandlung 9,48 µM (Bereich von 1,08 µM bis 19,20 µM). Eine graphische Darstellung der ermittelten Werte findet sich in Abbildung 11.

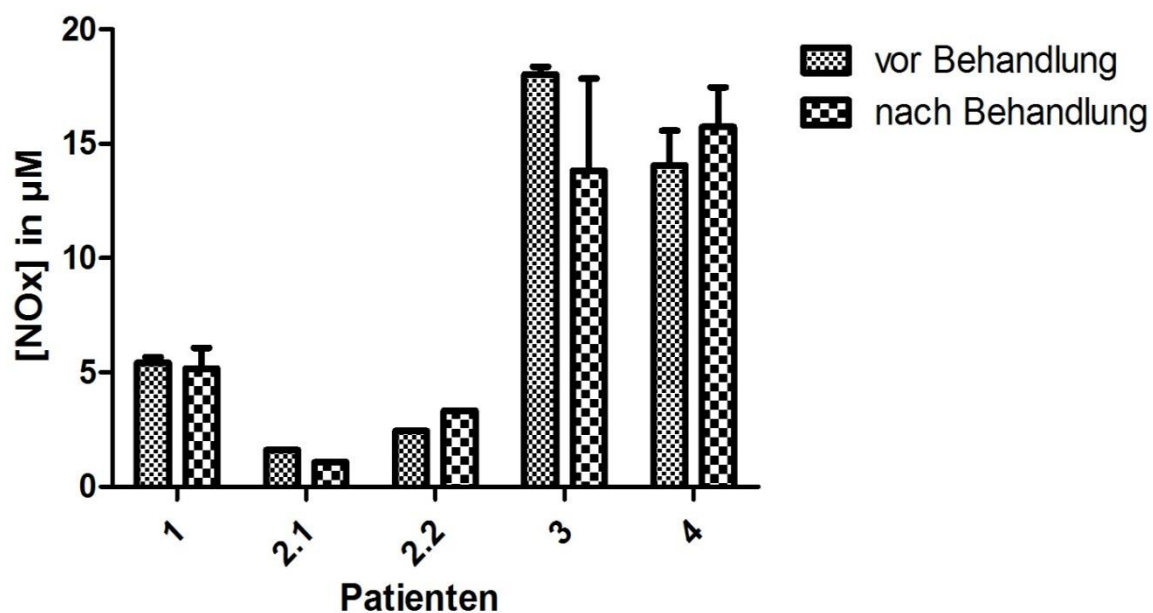


Abb.11: Durchschnittliche NO<sub>x</sub>-Konzentrationen [µM] der Patientenproben mit Standardfehler vor und nach Plasmabehandlung

Bei Patient 1 konnte ein leichter Abfall der NO<sub>x</sub>-Konzentration von 5,42 µM auf 5,18 µM beobachtet werden. Bei Patient 2.1 sank der NO<sub>x</sub>-Spiegel von anfänglich 1,60 µM auf 1,08 µM. Bei Patient 2.2 war ein Anstieg der Konzentration von 2,43 µM auf 3,33 µM ersichtlich. Patient 3 wiederum zeigte einen Abfall von 18,04 µM auf 13,82 µM. Die Messungen ergaben bei Patient 4 einen Anstieg der NO<sub>x</sub>-Konzentration von 14,07 µM auf 15,74 µM.

Somit war bei Patient 1, 2.1 und 3 eine Senkung der NO<sub>x</sub>-Konzentration zu beobachten, während bei den Patienten 2.2 und 4 eine Erhöhung der NO<sub>x</sub>-Konzentration festgestellt werden konnte.

### 5.1.3. Gesamtproteinkonzentration

Die Nomenklatur der Patientenproben folgt dem System aus 5.1.1. Da die gemessenen und berechneten Werte nur für die Korrelation der Protein-Carbonylierung und -Nitrierung relevant sind, wurde darauf verzichtet Mittelwerte und Standardfehler zu berechnen und eine graphische Auswertung anzufertigen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Patient	Probe	[Protein] vor Behandlung [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]	[Protein] nach Behandlung [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]
1	1	8,23	7,06
1	2	5,31	9,22
1	3	7,73	5,26
2.1	1	4,59	7,51
2.2	1	7,46	2,79
3	1	3,55	3,37
3	2	6,21	7,10
4	1	5,35	6,30
4	2	3,64	1,89
4	3	6,43	1,57

Tab.4: Proteinkonzentrationen der einzelnen Wundflüssigkeitsproben vor und nach Plasmabehandlung

### 5.1.4. Protein-Nitrierung

Die Nomenklatur der Proben folgt wiederum dem System aus Punkt 5.1.1. Bei den Patientenproben 2.1 und 2.2 konnten aufgrund der geringen Wundflüssigkeitsausbeute die Messungen nur einmal durchgeführt werden.

Die gemessenen Werte wurden allesamt mit der Proteinkonzentration der einzelnen Proben, die mittels Bradford-Assay ermittelt wurde, korreliert und tragen somit die Einheit  $\mu\text{g}/\mu\text{g}$  (Nitrotyrosin/Protein). Der durchschnittliche Wert aller Proben lag bei  $0,062 \mu\text{g}/\mu\text{g}$  (Bereich von  $0,030 \mu\text{g}/\mu\text{g}$  bis  $0,170 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ ), während der Durchschnittswert vor der Behandlung  $0,052 \mu\text{g}/\mu\text{g}$  (Bereich von  $0,033 \mu\text{g}/\mu\text{g}$  bis  $0,081 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ ) und nach der Behandlung  $0,072 \mu\text{g}/\mu\text{g}$  (Bereich von  $0,030 \mu\text{g}/\mu\text{g}$  bis  $0,170 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ ) betrug. Eine graphische Auswertung der Ergebnisse findet sich in Abbildung 12.



Bei Patient 1 ändert sich die Nitrotyrosin-Konzentration nicht und bleibt bei einem Wert von  $0,039 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ . Bei Patient 2.1 ist ein geringer Abfall der Konzentration von  $0,067 \mu\text{g}/\mu\text{g}$  auf  $0,040 \mu\text{g}/\mu\text{g}$  zu beobachten. Patient 2.2 weist einen Anstieg von  $0,041 \mu\text{g}/\mu\text{g}$  auf  $0,106 \mu\text{g}/\mu\text{g}$  auf. Bei Patient 3 ist mit einem Absinken der Nitrotyrosin-Konzentration von  $0,063 \mu\text{g}/\mu\text{g}$  auf  $0,062 \mu\text{g}/\mu\text{g}$  keine wesentliche Änderung ersichtlich. Patient 4 verzeichnet einen Anstieg von  $0,055 \mu\text{g}/\mu\text{g}$  auf  $0,113 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ .

Während bei Patient 1 und 3 somit vor und nach Behandlung kaum ein Unterschied zu erkennen ist, sinkt bei Patient 2.1 die Nitrotyrosin-Konzentration und steigt bei 2.2 und 4 nach Behandlung an.

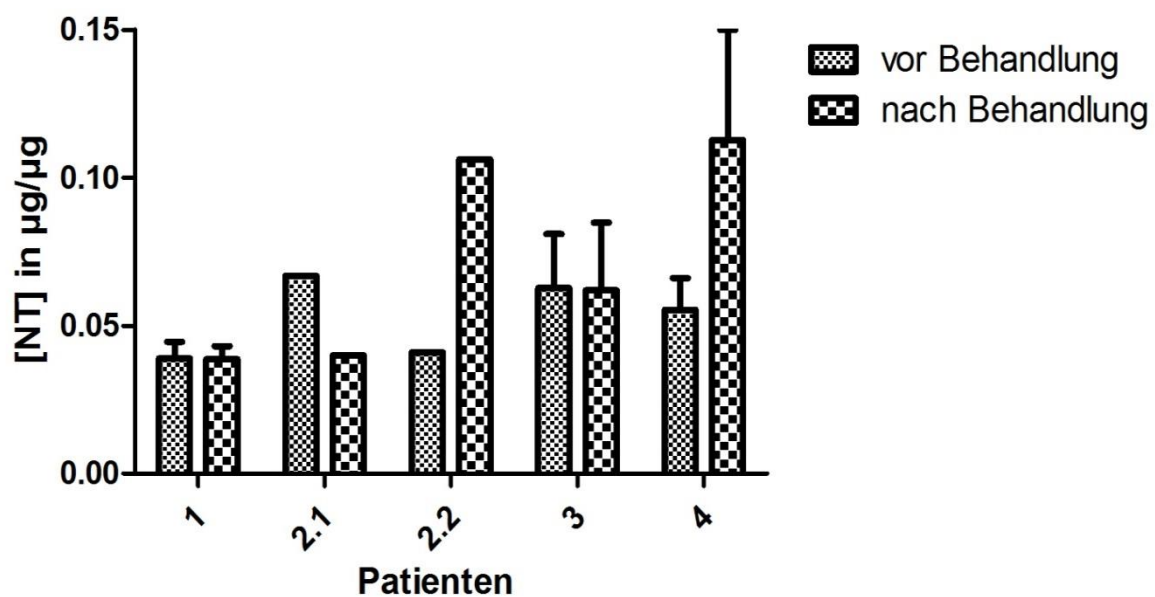


Abb.12: Nitrotyrosin-Konzentration der Patientenproben vor und nach Plasmabehandlung mit Angabe des Standardfehlers

### 5.1.5. Protein-Carboxylierung

Die Nomenklatur der Patientenproben folgt dem System aus Punkt 5.1.1. Die Werte der Proben wurden wiederum mit den gemessenen Proteinkonzentrationen aus dem Bradford-Assay korreliert. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse findet sich in Tabelle 5.

Eine Berechnung der Mittelwerte oder graphische Darstellung dieser Werte erschien aufgrund starker individueller Schwankungen nicht weiter sinnvoll.

Patient	Probe	[PC] vor Behandlung [nmol/ $\mu$ l] $\times 10^{-5}$	[PC] nach Behandlung [nmol/ $\mu$ l] $\times 10^{-5}$
1	1.1.	25,00	11,37
1	1.2.	11,16	17,52
1	1.3.	4,21	-2,04
2.1	2.1.	7,87	40,16
2.2	3.1.	15,33	-1,69
3	4.1.	3,96	-4,46
3	4.2.	4,16	10,75
4	5.1.	10,21	36,65
4	5.2.	4,25	-1,36
4	5.3.	-4,11	9,72

Tab.5: Proteincarbonyl-Konzentrationen der einzelnen Patientenproben vor und nach Plasmabehandlung

## 5.2. Zellen

### 5.2.1. pH-Wert-Messungen

Die pH-Wert-Messungen wurden je drei Mal durchgeführt. Da anfänglich immer das gleiche Medium verwendet wurde, hatten alle Wells vor der Behandlung denselben mittleren pH-Wert von 8,3, wobei der niedrigste gemessene Wert bei 8,2 und der höchste gemessene Wert bei 8,4 lag. Eine graphische Auswertung der Ergebnisse findet sich in Abbildung 13.

24 Stunden nach den Plasmabehandlungen lag der durchschnittliche pH-Wert des Mediums und der Fibroblasten bei 7,9. Weder bei den unbehandelten noch bei den unterschiedlich lange behandelten Proben war eine Änderung des pH-Wertes durch die Plasmabehandlung ersichtlich.

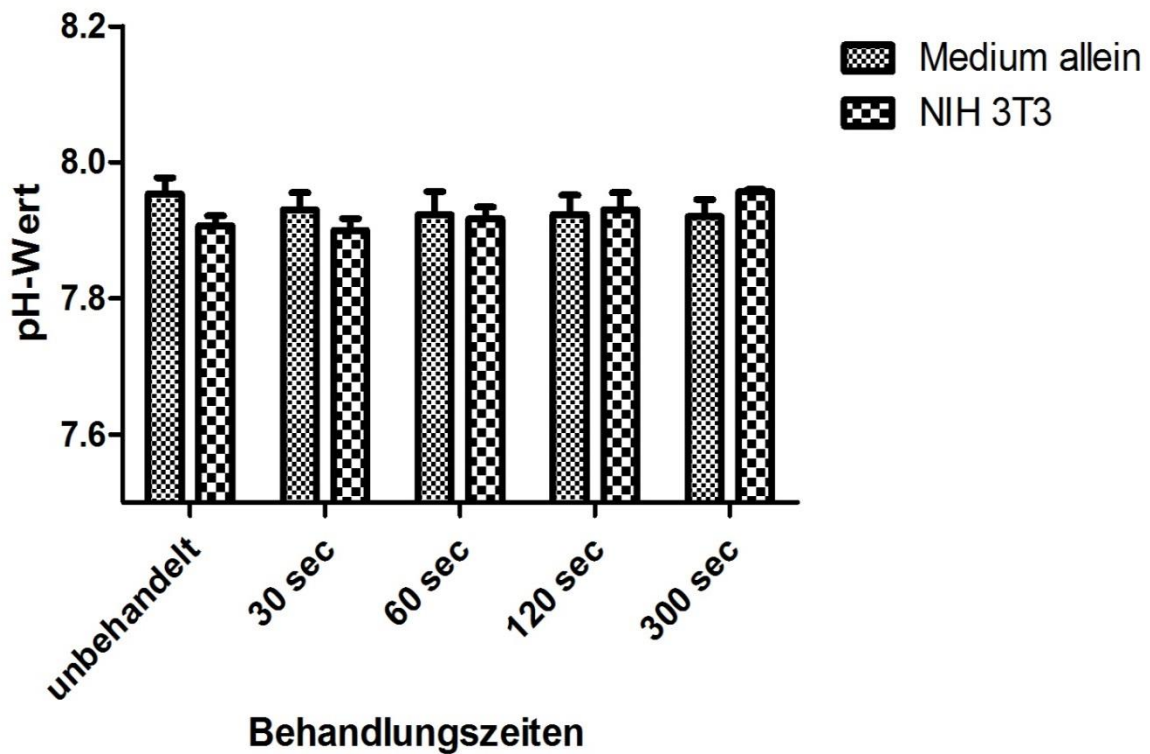


Abb.13: Durchschnittlich gemessene pH-Werte in Abhängigkeit von der Plasmabehandlungszeit des Mediums allein und der NIH 3T3 Fibroblasten mit Angabe des Standardfehlers

### 5.2.2. NO<sub>x</sub>-Bestimmung

Die NO<sub>x</sub>-Messungen wurden drei Mal unabhängig voneinander wiederholt und jeweils in Triplikaten angefertigt, um die Aussagekraft der Ergebnisse zu erhöhen. Eine graphische Zusammenfassung der Ergebnisse findet sich in Abbildung 14.

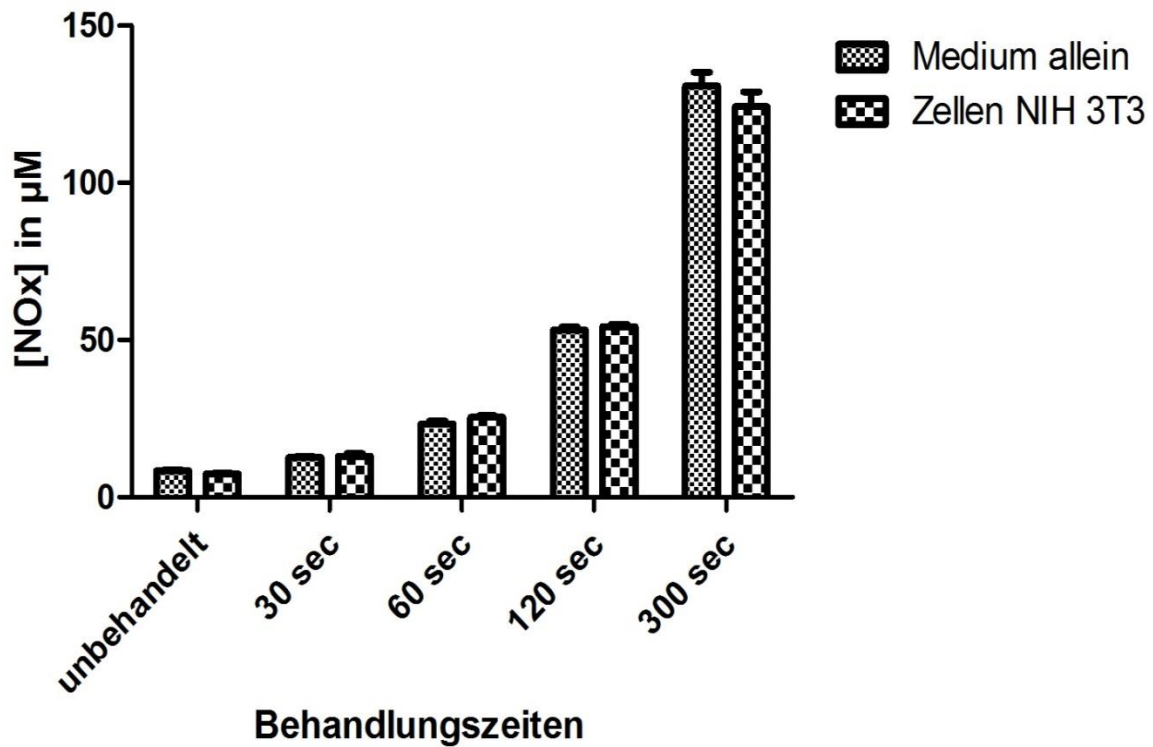


Abb.14: Durchschnittliche NOx-Konzentrationen des Mediums allein und der NIH 3T3 Fibroblasten in Abhängigkeit von der Plasmabehandlungszeit mit Angabe des Standardfehlers

Die durchschnittliche NOx-Konzentration des unbehandelten Mediums betrug 8,40 µM und der unbehandelten Zellen 7,44 µM. Nach 30 Sekunden Behandlungszeit stieg die NOx-Konzentration im Medium allein auf 12,66 µM und bei den Fibroblasten auf 13,02 µM. Nach 60 Sekunden Plasmabehandlung wurden Konzentrationen von 23,30 µM im Medium allein und 25,41 µM bei den behandelten Zellen gemessen. Bei einer Behandlungszeit von 120 Sekunden ergaben sich NOx-Konzentrationen von 53,19 µM im Medium allein und 54,27 µM bei den Fibroblasten. Nach 300 Sekunden unter Plasmabehandlung stieg die NOx-Konzentration auf den Höchstwert von 130,76 µM im Medium allein und 124,19 µM bei den Zellen.

Es ist deutlich erkennbar, dass die NOx-Konzentration mit steigender Behandlungsdauer linear ansteigt. Hierbei ist es unerheblich, ob das Medium allein oder die Zellen und das Medium behandelt wurden. Dieser Sachverhalt ist graphisch in Abbildung 15 aufgearbeitet.

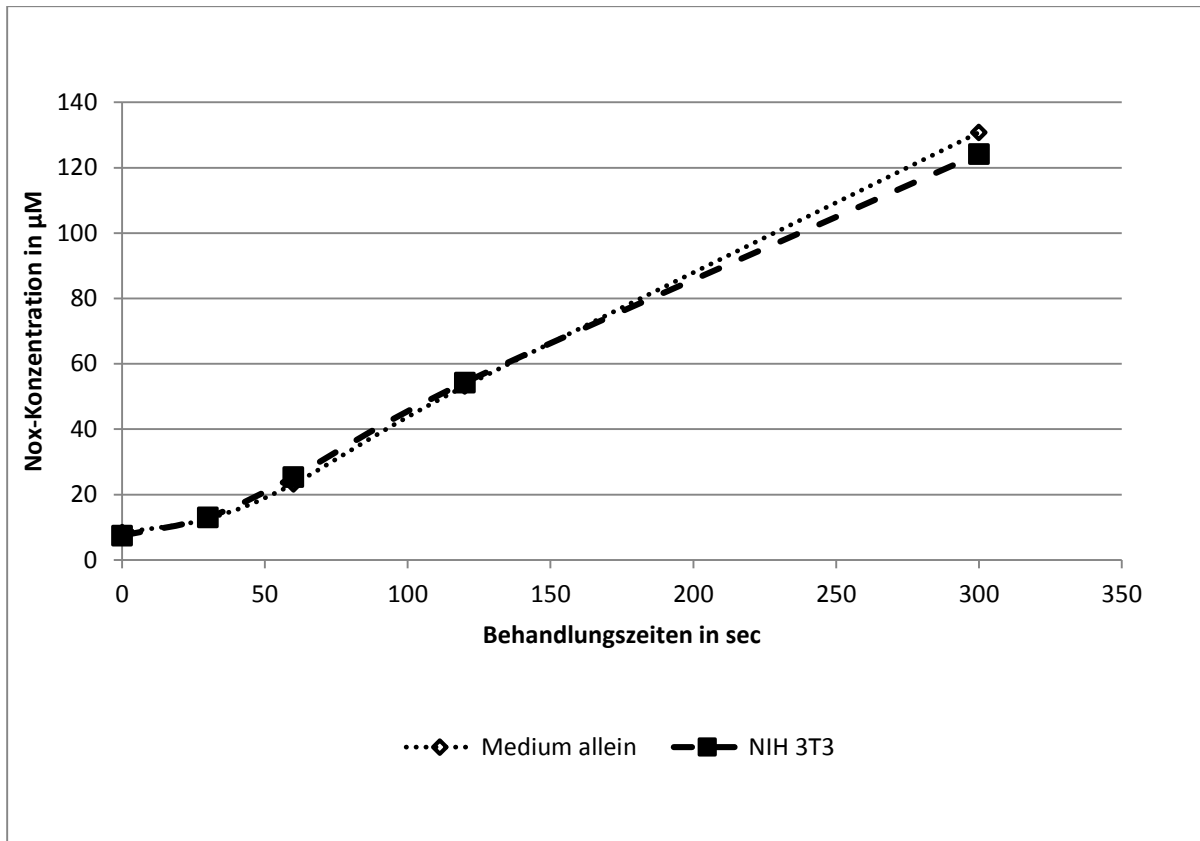


Abb. 15: Durchschnittliche NOx-Konzentrationen des Mediums allein und der NIH 3T3 Fibroblasten in Abhängigkeit von der Plasmabehandlungszeit

### 5.2.3. LDH-Assay

Die Zytotoxizitäts-Bestimmung mittels LDH-Methode wurde drei Mal unabhängig voneinander wiederholt und jeweils in Triplikaten angefertigt, um die Aussagekraft der Ergebnisse zu erhöhen. Die Angaben zur Zytotoxizität tragen keine Einheit, da sie relative Maßzahlen sind. 0 bedeutet also keine Zytotoxizität, während 1 für 100% Zytotoxizität steht. Als Low Control dienten unbehandelte vitale Zellen. Als High Control wurden mit Triton X-100 vollständig lysierte Zellen genutzt. Die Werte sind in Abbildung 16 zusammengefasst.

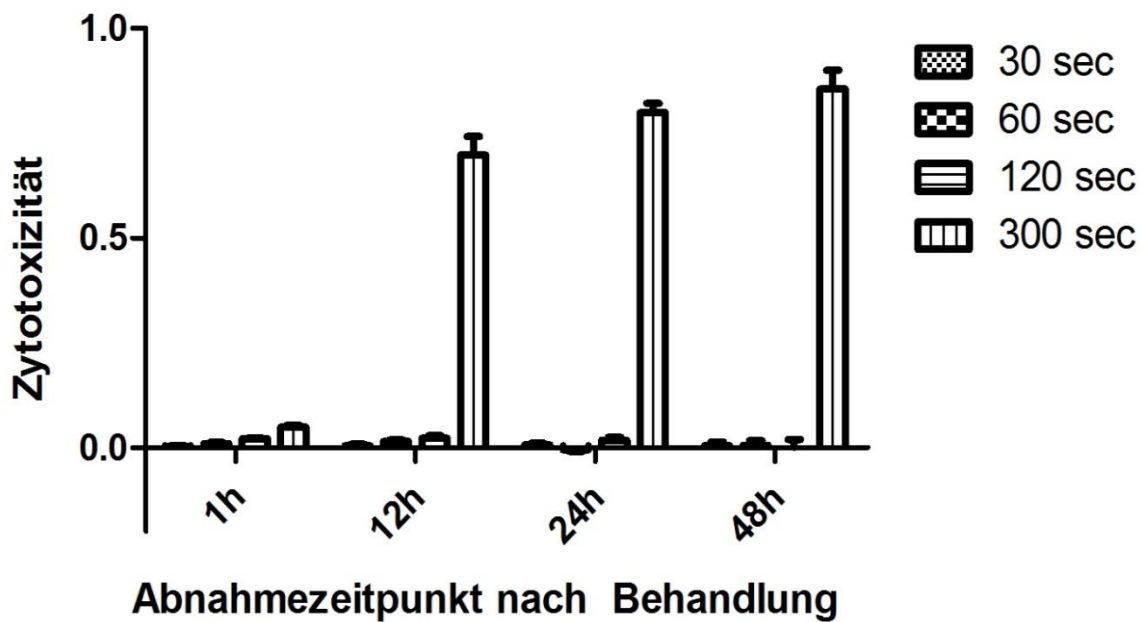


Abb.16: Graphische Darstellung der durchschnittlich gemessenen Zytotoxizität der Proben in Abhängigkeit von der Plasmabehandlungszeit und der verstrichenen Zeit nach Plasmabehandlung mit Angabe des Standardfehlers; 1 = 100% Zytotoxizität, keine vitalen Zellen mehr; 0 = 0% Zytotoxizität, Zellen weisen gleiche Vitalität wie unbehandelte Kontrollen auf

Die Zytotoxizitätswerte für die Zellen, die zwischen 30 und 120 Sekunden der Plasmabehandlung ausgesetzt waren, lagen zu allen Abnahmezeitpunkten unter 3%. Die Zytotoxizität der Zellen, die 300 Sekunden behandelt wurden, lag anfänglich nach einer Stunde bei 5%. Nach 12 Stunden stieg sie auf 70%. Nach 24 Stunden betrug die Zytotoxizität der maximal behandelten Zellen 80% und stieg nach 48 Stunden noch weiter auf 85%.

#### 5.2.4. MTT-Assay

Es wurden wiederum drei unabhängige einzelne Assays angefertigt, die zusammengefasst wurden. Die Einzelmessungen erfolgten erneut in Triplikaten. Hierbei wird immer das Überleben der Zellen in Abhängigkeit von der Behandlungszeit dargestellt. Nach Behandlung erfolgte eine Inkubation der Zellen für 48 Stunden. Die Ergebnisse sind relative Maßzahlen, die keine Einheit tragen. 1 bedeutet in diesem Fall, dass alle Zellen überlebt haben (100% Überleben), während 0 für kein Überleben steht (0% Überleben). Als Kontrolle dienten hierbei unbehandelte Zellen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt.

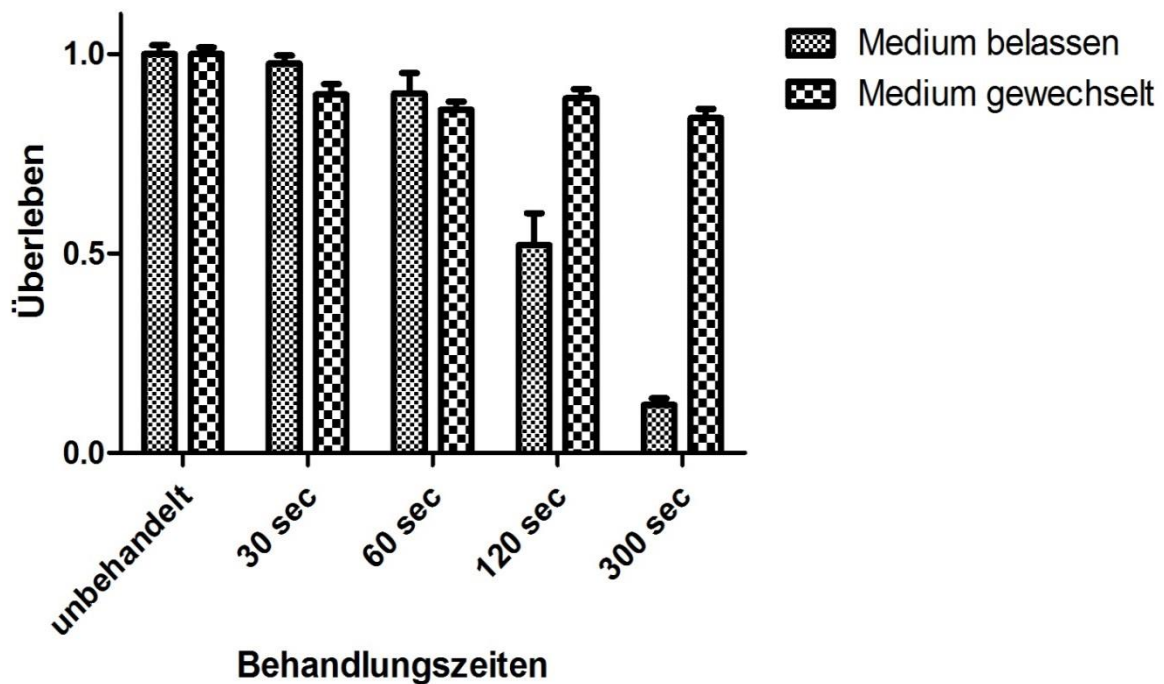


Abb.17: Graphische Darstellung der durchschnittlichen Ergebnisse der MTT-Assays mit Angabe des Standardfehlers in Abhängigkeit von der Plasmabehandlungszeit und durchgeführtem oder unterlassenen Mediumwechsel; 1 = 100% der Zellen haben überlebt; 0 = 0% der Zellen haben überlebt; jeweils bezogen auf die unbehandelten Kontrollen

Die unbehandelten Kontrollen wiesen ein Überleben von 100% auf. Bei den Fibroblasten, deren Medium direkt nach der Behandlung gewechselt wurde, betrug die Überlebensrate unabhängig von der Behandlungszeit immer mehr als 80%. Nach 30 Sekunden Behandlungszeit lag das Überleben bei 90%, nach 60 Sekunden bei 86%, nach 120 Sekunden bei 89% und nach 300 Sekunden bei 84%.

Bei den Zellen, deren Medium nach der Plasmabehandlung belassen wurde, sank die Überlebensrate mit steigender Behandlungsdauer. Nach 30 Sekunden Behandlung lag das Überleben noch bei 98%. Nach 60 Sekunden sank die Rate auf 90%. Nach 120 Sekunden wurden nur noch 52% lebende Zellen gemessen. Nach 300 Sekunden Behandlungsdauer lebten nur noch rund 12% der Fibroblasten.

## 6. Diskussion

Chronische Wunden stellen heutzutage eine große Herausforderung für die moderne Medizin dar. Vor allem Härtefälle, bei denen mehrere Risikofaktoren wie eine pathologische Keimbesiedelung der Wunde oder eine zugrunde liegende Diabetes-Mellitus-Erkrankung zusammentreffen, haben geringe Aussichten auf einen schnellen und zufriedenstellenden Therapieerfolg. Häufig müssen Patienten mit chronischen Wunden eine Odyssee an Behandlungen über sich ergehen lassen, die am Ende nicht immer von Erfolg gekrönt ist.

Das neue Feld der Plasmamedizin scheint hierbei einen vielversprechenden Lösungsansatz zu bieten, um diesen Problemen Herr zu werden. Erste Studien belegen positive Effekte der Plasmabehandlung auf die Keimbelastung in chronischen Wunden (Isbary, et al. 2010), sowie auf spezielle dermatologische Krankheitsbilder wie den Morbus Hailey-Hailey (Isbary, et al. 2011). Das Ziel dieser Arbeit war es, die hierbei zugrunde liegenden Prozesse und Veränderungen einerseits mittels Analyse von Wundflüssigkeiten vor und nach Behandlung, andererseits durch die Untersuchung von plasmabehandelten Bindegewebszellen zu identifizieren und zu charakterisieren. Dies geschah vor dem Hintergrund der Entwicklung individueller Plasmen zur Unterstützung der Wundheilung und -Regeneration.

Bei den Untersuchungen der Wundflüssigkeiten erwiesen sich die Methoden, die zur pH-Wert-Analyse, der NO<sub>x</sub>-Konzentrationsbestimmung und der Quantifizierung des oxidativen Stresses mittels Protein-Nitrierung zum Einsatz kamen, als geeignet und praktikabel, um sie bei den Untersuchungen der Wundflüssigkeiten anzuwenden. Die Bestimmung des oxidativen Stresses mittels Protein-Carbonylierung lieferte Ergebnisse, die sich in einem nicht sinnvoll auswertbaren Wertebereich bewegen. Diese Methode wird als nicht geeignetes Verfahren zur Untersuchung von Wundflüssigkeiten, wie sie im Rahmen dieser Arbeit stattfanden, eingestuft. Die Analyse der pH-Werte vor und nach Plasmabehandlung legt nahe, dass der MicroPlaSter  $\beta$  keine direkten Auswirkungen auf das pH-Milieu der Wundflüssigkeiten hat. Bei der Bestimmung der NO<sub>x</sub>-Konzentrationen und der Quantifizierung des oxidativen Stresses mittels Protein-Nitrierung konnten keine Trends durch die Plasmabehandlung beobachtet werden.

Bei den Analysen der in vitro Versuche mit NIH 3T3 Fibroblasten konnten eindeutige Tendenzen festgestellt werden. Eine Plasmabehandlung mittels miniFlatPlaSter kann den pH-Wert des hier verwendeten Mediums nicht verändern. Weiterhin war ersichtlich, dass die NO<sub>x</sub>-Konzentration in vitro mit länger werdenden Behandlungszeiten ansteigt. Dabei war es unerheblich, ob das Medium mit Zellen kultiviert war oder nicht. Die Messung der Zytotoxizität ergab eine für die Zellen schädliche Plasmadosis bei einer Behandlungszeit von 300 Sekunden. Bei kürzeren Behandlungszeiten war keine wesentliche LDH-Freisetzung und somit Zellwandschädigung nachweisbar. Zudem konnte bei der Bestimmung der



Zellaktivität und -proliferation festgestellt werden, dass die Vitalität der Zellen mit steigenden Behandlungszeiten bei Belassen des behandelten Mediums deutlich abnimmt. Dahingegen kommt es bei einem Wechsel des Mediums nach der Behandlung zu keinem wesentlichen Abfall der Zellaktivität.

## 6.1. Evaluation der angewandten Methoden und Verfahrensweisen

Die bei der Arbeit zur Analyse der Wundflüssigkeiten angewandten Methoden und Gerätschaften waren allesamt etabliert und kamen schon im Vorfeld bei einer Reihe anderer Untersuchungen zum Einsatz. Anhand der gemessenen Ergebnisse und errechneten Werte wurden die Methoden, die zur Bestimmung des pH-Wertes, der NO<sub>x</sub>-Konzentrationen und der Protein-Nitrierung zum Einsatz kamen, als praktikable Verfahren zur Charakterisierung der Wundflüssigkeiten eingestuft. Die Betrachtungen zum oxidativen Stress mittels der Protein-Carboxylierung ergaben keine sinnvoll auswertbaren Ergebnisse. Diese Methode wurde als ungeeignet klassifiziert und wird in weiteren Untersuchungen von Wundflüssigkeiten dieser Art nicht empfohlen.

Die Methoden und Geräte, die bei den Versuchen mit den Fibroblasten genutzt wurden, sind ebenfalls gänzlich etabliert und werden auch in vielen anderen Arbeiten genutzt. Die durchgeführten Untersuchungen gewähren einen Einblick in die Mechanismen der Interaktionen zwischen Plasma und Fibroblasten, die maßgeblich an der Wundheilung beteiligt sind. Somit war es möglich Aussagen über die Trends der Wundheilung unter Plasmabehandlung mittels miniFlatPlaSter im Modellversuch zu treffen ohne den finanziellen und zeitlichen Rahmen dieser Arbeit zu sprengen. Um hier mögliche Fehler auszuschließen, wurden sämtliche Versuche und Messungen mindestens dreimal jeweils in Triplikaten wiederholt.

## 6.2. Diskussion der Ergebnisse

### 6.2.1. pH-Wert

Bei der Untersuchung der Wundflüssigkeiten ergab sich bei allen untersuchten Proben ein ähnlicher Wertebereich mit einem durchschnittlich gemessenen pH-Wert von 8,4 (Bereich von 7,9 bis 8,9). Die Messung mittels Orion 2 Star pH-Meter erwies sich in der Praxis als zuverlässige und gut umsetzbare Methode. Der durchschnittliche pH der Wundflüssigkeiten vor der Behandlung lag bei 8,4 (Bereich von 8,1 bis 8,7). Folglich lagen die pH-Werte schon vor der Plasmabehandlung deutlich über dem als normal angegebenen Bereich von 5,4 – 5,9

(Braun-Falco and Korting 1986). Offensichtlich kann man hier von einer gestörten pH-Regulation in den vorliegenden chronischen Wunde ausgehen, wie sie auch schon von Dissemond et al. (Dissemond, et al. 2003) beschrieben wurden. Nach der Wundbehandlung änderten sich die pH-Werte der Wundflüssigkeiten nicht wesentlich und lagen bei einem mittleren Wert von 8,5 bei einer Bereichsbreite von 7,9 bis 8,9. Man geht nach heutigen Erkenntnissen davon aus, dass ein saurer pH als Indikator für eine Heilung chronischer Wunden gilt und sowohl das bakterielle Wachstum als auch die Protease-Aktivität im Wundbereich hemmen kann. Weiterhin steigert ein saures Milieu die Fibroblasten-Proliferation (zumindest in vitro) und steigert die Sauerstoffversorgung des Gewebes (Schneider, et al. 2007). Das vorherrschende alkalische Milieu in den untersuchten Wunden kann also als Parameter für eine ungenügende Wiederherstellung der geschädigten Haut gedeutet werden. Diese Überlegungen deckten sich auch mit dem klinischen Bild der untersuchten Wunden, die allesamt eine schlechte Heilungstendenz aufwiesen. Aus den Analysen der Wundflüssigkeiten war zusammenfassend kein direkter Einfluss der Plasmabehandlung mittels MicroPlaSter  $\beta$  auf den pH-Wert der Wunden ersichtlich. Diese Beobachtung kongruiert ebenso mit den Untersuchungen, die an den mit dem miniFlatPlaSter behandelten Fibroblasten durchgeführt wurden.

Bei den pH-Wert-Messungen der Fibroblasten ergab sich für den durchschnittlichen pH vor der Behandlung ein Wert von 8,3, wobei der niedrigste gemessene Wert bei 8,2 und der höchste gemessene Wert bei 8,4 lag. 24 Stunden nach der Plasmabehandlung konnte ein durchschnittlicher pH-Wert sowohl des Mediums allein als auch der Fibroblasten von 7,9 bestimmt werden. Hierbei unterschieden sich die einzelnen ermittelten Werte weder zwischen den unterschiedlichen Behandlungszeiten, noch zwischen dem Medium allein oder den Fibroblasten. Obwohl also mittels Plasma zum einen reaktive Sauerstoffspezies wie  $O$ ,  $OH\cdot$ ,  $H_2O_2$  oder  $O_3$ , zum anderen reaktive Stickstoffspezies wie  $NO\cdot$  oder  $NO_2$  produziert werden (Heinlin, et al. 2011), konnte kein direkter Effekt der eingesetzten Plasmageräte auf den pH-Wert beobachtet werden. Unabhängig von der applizierten Plasmabehandlungsdauer lagen alle gemessenen pH-Werte in demselben Bereich. Offensichtlich ist durch Plasmabehandlung mittels miniFlatPlaSter also ebenso wie mit der Behandlung durch den MicroPlaSter  $\beta$  keine Veränderung des pH-Wertes zu erreichen.

Dahingegen konnten bei anderen Arbeiten direkte Auswirkungen von Plasmabehandlungen mittels anderer Plasmaquellen auf den pH-Wert bestimmter Medien beobachtet werden. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um eine Erniedrigung des pH durch die Anwendung von Plasma. So konnten Liu et al. (Liu, et al. 2010) bei ihren Untersuchungen zur Reduktion von Bakterien (*Staphylokokkus aureus*) in wässriger Lösung mittels indirekter Plasmaquelle Cold-atmospheric-pressure Air Plasma Microjet (PMJ) eine erhebliche Erniedrigung des pH-Wertes in saure Bereiche um 4,5 feststellen. Ebenso stießen Tang et al. (Tang, et al. 2008)

bei ihren Betrachtungen zu den Auswirkungen von Plasmabehandlungen bei Mikroalgen mittels einer direkten DBD-Plasmaquelle auf ein ähnliches Ergebnis. Bei Behandlungszeiten von über 320 Sekunden kam es zu einem Absinken des pH-Wertes unter 3 in allen Proben. Eine weitere Veröffentlichung, die zu demselben Schluss kommt, stammt von Helmke et al. (Helmke, et al. 2009). Dabei wurde die Ansäuerung des pH-Wertes von Wasser auf plasmabehandelten Lipidoberflächen (DBD Plasmaquelle) festgestellt. Bei allen drei genannten Arbeiten wurden die pH-Veränderungen vor allem auf die Entstehung von ROS (v.a. Ozon) und RNS (v.a. NO) durch die Plasmabehandlung zurückgeführt. Diese reaktiven Spezies entstehen auch bei den in dieser Arbeit eingesetzten Plasmaquellen. Die ausbleibende Änderung des pH-Wertes hierbei kann unterschiedliche Ursachen haben. So wurden natürlich andere Plasmaquellen verwendet, der experimentelle Aufbau war gänzlich unterschiedlich, die Behandlungszeiten wurden anders gewählt und die genutzten Medien und damit verbundenen Diffusionszeiten der entstandenen reaktiven Partikel waren nicht identisch. Prinzipiell sollte aber festgehalten werden, dass mittels Plasmabehandlung unter bestimmten Umständen bei der Wahl der richtigen Plasmaquelle und der entsprechenden Kontextfaktoren (Behandlungszeit, Medium) eine Änderung des pH-Wertes möglich ist.

### 6.2.2. NO<sub>x</sub>-Konzentration

Die durchschnittliche NO<sub>x</sub>-Konzentration der Wundflüssigkeiten betrug 9,67 µM, wobei die Ergebnisse zwischen einem gemessenen Höchstwert von 19,20 µM und einem niedrigsten Wert von 1,08 µM weit gestreut waren. Die Messung der NO<sub>x</sub>-Konzentration mittels Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit aus dem Hause Cayman Chemical Company erwies sich in der Praxis als gut umsetzbare Nachweismethode. Vor der Behandlung betrug der durchschnittliche Wert 9,86 µM (Bereich von 1,60 µM bis 18,37 µM). Hierbei lagen die gemessenen Werte der Proben 1, 2.1 und 2.2 in einem relativ niedrigen Bereich unter 6 µM. Dahingegen bewegten sich bei Patient 3 und 4 die erfassten Konzentrationen in einem relativ hohen Bereich von über 14 µM. Ein klinisches Korrelat in Form einer besseren Wundheilung bei erhöhten NO<sub>x</sub>-Werten konnte in dem zugrunde liegenden Beobachtungszeitraum nicht festgestellt werden. Nach der Plasmabehandlung lagen die durchschnittlichen NO<sub>x</sub>-Konzentrationen bei 9,48 µM (Bereich von 1,08 µM bis 19,20 µM). Bei Patient 1, 2.1 und 3 war eine geringe Senkung der NO<sub>x</sub>-Konzentration zu beobachten, während bei den Patienten 2.2 und 4 eine Erhöhung der NO<sub>x</sub>-Konzentration festgestellt wurde. Auffällig war, dass bei den Proben, die vor der Plasmabehandlung hohe Konzentrationen an NO<sub>x</sub> aufwiesen, auch nach der Behandlung erneut hohe NO<sub>x</sub>-Konzentrationen messbar waren. Die Messungen bei den Patientenproben, die vor der Plasmabehandlung in niedrigeren Bereichen lagen, lieferten nach Plasmabehandlung erneut

niedrige Werte. Dies legt nahe, dass die NO<sub>x</sub>-Konzentration sich innerhalb eines Individuums in einem bestimmten Wertebereich bewegt. Das wird auch vor allem bei der Betrachtung der ähnlichen NO<sub>x</sub>-Konzentrationsbereiche der beiden unterschiedlichen Wunden von Patient 2 deutlich. Interessant ist hierbei, dass sich bei diesem Patienten 2 in beiden untersuchten Wunden nicht der gleiche Trend nach der Plasmabehandlung abzeichnet. Die NO<sub>x</sub>-Konzentrationen bei Patienten, die unter einer chronisch venösen Insuffizienz leiden (Patienten 1, 2.1, 2.2), lagen im Durchschnitt betrachtet niedriger als bei den anderen beiden Patienten. Dies kann als ein Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen Grundkonzentration an NO<sub>x</sub> in einer Wunde und der zugrunde liegenden Erkrankung gedeutet werden. Nähere Untersuchungen hierzu hätten jedoch ein weitaus größeres Patientenkollektiv erfordert und damit den finanziellen und zeitlichen Rahmen dieser Arbeit gesprengt. Zusammenfassend konnte also anhand der vorliegenden Daten und Analysen kein eindeutiger Trend hinsichtlich der Wirkung der Plasmabehandlung mittels MicroPlaSter β auf die NO<sub>x</sub>-Konzentration in den Wundflüssigkeiten eruiert werden.

Dahingegen ergaben sich bezüglich der NO<sub>x</sub>-Konzentrationen, die im Rahmen der Untersuchungen der plasmabehandelten Fibroblasten gemessen wurden, eindeutige Trends. Deutlich erkennbar stiegen die gemessenen NO<sub>x</sub>-Konzentrationen von anfänglich etwa 8 µM in direkter Abhängigkeit von der Behandlungsdauer auf über 120 µM an. Je länger die Plasmabehandlung andauerte, desto höher waren die ermittelten NO<sub>x</sub>-Konzentrationen. Hierbei war es unerheblich, ob nur Medium allein behandelt wurde oder in Medium kultivierte Zellen. Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass die Plasmabehandlung die Fibroblasten nicht zur Synthese von NO<sup>•</sup> anregt, sondern der Anstieg der NO<sub>x</sub>-Konzentrationen am ehesten auf die Bildung von reaktiven Stickstoffspezies im entstehenden Plasma zurückzuführen ist. Passend zu diesen Überlegungen konnte ein linearer Anstieg der NO<sub>x</sub>-Konzentration abhängig von der Behandlungsdauer extrapoliert werden. Eine mögliche Anwendung dieser Beobachtung könnte die gezielte Applikation von NO<sup>•</sup> auf eine definierte Fläche mittels Plasmabehandlung sein. Es wäre sogar denkbar durch Variation der Behandlungszeit definierte Mengen an NO<sup>•</sup> auf die zu behandelnden Areale zu applizieren. Insbesondere aufgrund des räumlich begrenzten Wirkungsbereiches und des linearen Zusammenhangs zwischen NO<sup>•</sup>-Konzentration und Plasma-Behandlungsdauer kann die Nutzung von CAPs zukünftig eine neue vielversprechende Therapieoption bei der Behandlung von therapierefraktären chronischen Wunden werden.

Dobrynin et al. (Dobrynin, et al. 2011) haben eben diesen Ansatz der gezielten NO<sup>•</sup>-Applikation mittels einer sogenannten „pin-to-hole spark discharge (PHD)“ Plasmaquelle verfolgt und damit behandelte Flüssigkeiten und Endothelzellen untersucht. Sie konnten mit ihrem PHD Plasmagerät NO<sup>•</sup>-Konzentrationen von bis zu 2000 ppm erreichen und beobachteten eine schnelle Diffusion des NO<sup>•</sup> in die verwendeten Flüssigkeiten und Zellen.

Ihre Ergebnisse legen ebenso nahe, dass eine direkte und lokale Verabreichung von NO<sub>2</sub> um die Wundheilung zu verbessern, durch Plasmabehandlungen möglich ist. Arjunan et al. (Arjunan and Clyne 2011) nutzten ebenfalls eine PHD Plasmaquelle zur Erzeugung von NO<sub>2</sub> und konnten, wie auch in dieser vorliegenden Arbeit, einen dosisabhängigen linearen Anstieg der NO<sub>2</sub>-Konzentration in der behandelten PBS und in Endothelzellen feststellen. Weiterhin konnten sie nachweisen, dass sich durch diese Behandlung das Proliferations- und Migrationsverhalten von Endothelzellen deutlich verbesserte. Sie schlossen aus diesen Erkenntnissen auf einen möglichen Einsatz von Plasmen zur Beschleunigung der Angiogenese und einer damit verbundenen verbesserten Wundheilung.

### 6.2.3. Oxidativer Stress

Der oxidative Stress, der in den Wundflüssigkeiten vorherrschte, wurde in dieser Arbeit sowohl mittels Protein-Nitrierung als auch mittels Protein-Carboxylierung bestimmt. Die bei der Protein-Carboxylierung ermittelten Werte lagen in einem Bereich, der eine sinnvolle Auswertung nicht ermöglichte. Diese Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit als nicht geeignet und praktikabel für die Bestimmung des oxidativen Stresses in Wundflüssigkeiten erachtet.

Bei den Untersuchungen bezüglich der Protein-Nitrierung wurden Konzentrationen gemessen, die in ähnlichen Wertebereichen lagen. Die hier angewandten Methoden erwiesen sich als praktikabel und umsetzbar. Während bei Patient 1 und 3 vor und nach Plasmabehandlung bei der Protein-Nitrierung kaum ein Unterschied zu erkennen ist, sinkt bei Patient 2.1 die Nitrotyrosin-Konzentration und steigt bei 2.2 und 4 nach Behandlung an. Obwohl also bei der Plasmabehandlung sowohl ROS als auch RNS entstehen, erweist sich der Nachweis dieser reaktiven Spezies in vivo als schwierig. Shimizu et al. (Shimizu, et al. 2012) konnten bei ihren Untersuchungen zu Plasmabehandlungen mittels einer SMD Plasmaquelle in vitro einen Anstieg von Ozon beobachten. Weiterhin legten sie nahe, dass schwingungsabhängig aktivierte Stickstoffmoleküle in Kombination mit Sauerstoff zu RNS wie NO<sub>2</sub> reagieren. Die individuell gemessenen Konzentrationen der Metaboliten dieser reaktiven Spezies wiesen auf keine eindeutigen Tendenzen zur Wirkung der Plasmabehandlung auf den oxidativen Stress in chronischen Wunden hin. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass die einzelnen reaktiven Spezies sehr flüchtige Verbindungen sind. Durch den Vorgang der Probengewinnung, des Schockgefrierens und Wiederauftauens kann es hierbei natürlich zu Verfälschungen des Ergebnisses kommen.

#### 6.2.4. Zytotoxizität und Zellvitalität

Zur Bestimmung möglicher schädigender Effekte der Plasmabehandlung auf die NIH 3T3 Fibroblasten wurden die Zellen mittels zweier unterschiedlicher Assays hinsichtlich der Zytotoxizität einerseits und der Zellproliferation andererseits untersucht.

Hierbei ergab sich bezüglich der Zytotoxizitäts-Messung mithilfe der LDH-Methode folgendes Bild: Eine Stunde nach Behandlung egal welcher Dauer konnten zunächst noch keine wesentlich erhöhten Konzentrationen von LDH gemessen werden, weshalb man davon ausgeht, dass hier auch noch keine Zellmembranschädigung vorlag. 12, 24 und 48 Stunden nach Plasmaexposition jedoch war bei der Gruppe, die 300 Sekunden lang behandelt wurde, im Gegensatz zu den unbehandelten Kontrollen und kürzer behandelten Zellen ein deutlicher Anstieg der LDH-Konzentrationen zu sehen. Mittels Berechnungen konnten hierbei durchschnittliche Zytotoxizitätswerte zwischen 70 und 85% ermittelt werden.

Anhand dieser Ergebnisse können die folgenden Aussagen getroffen werden: Offensichtlich ist es möglich mittels Plasmabehandlung Membranschäden an Fibroblasten herbeizuführen, die eine Freisetzung von zytoplasmatischem LDH in die Umgebung zur Folge haben. Dieser Zellschaden tritt nicht unmittelbar sofort nach Behandlung der Zellen auf, sondern benötigt erst ein gewisses Zeitfenster. Der zellschädigende Effekt ist weiterhin dosisabhängig und kann erst bei langen Behandlungszeiten von 300 Sekunden beobachtet werden. Bei kürzeren Behandlungszeiten scheint es zu keiner Schädigung der Zellmembran zu kommen.

Um diese Aussagen zu ergänzen und zu vertiefen wurden weitere Assays zur Bestimmung der Zellproliferation durchgeführt. Diese beruhen auf der MTT-Methode und ermöglichen Angaben bezüglich der Stoffwechselaktivität von vitalen Zellen. Dabei konnten folgende Ergebnisse festgehalten werden: Bindegewebszellen, deren Medium unmittelbar nach der Behandlung gewechselt wurde, wiesen unabhängig von der Behandlungsdauer keine wesentlichen Einschränkungen der Stoffwechselaktivität im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen auf. Bei Fibroblasten, die weiterhin in dem plasmaexponierten Medium kultiviert wurden, zeigte sich dahingegen eine Reduktion der Stoffwechselaktivität. Am deutlichsten war dies bei der Gruppe, die 300 Sekunden behandelt wurde. Hier sank die Zellvitalität auf knappe 12%. Auch die Gruppe, die 120 Sekunden behandelt wurde, musste Vitalitätseinschränkungen von etwa 50% erleiden. Dahingegen erschien die Stoffwechselaktivität der Zellen, die nur 30 bzw. 60 Sekunden plasmaexponiert waren, mit Vitalitätsraten von durchschnittlich 98 bzw. 90% nicht wesentlich beeinträchtigt.

Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse können folgende Aussagen getroffen werden: Die Plasmabehandlung kann die Stoffwechselaktivität der Fibroblasten einschränken und somit die Zellvitalität negativ beeinflussen. Dieser schädigende Effekt wird offensichtlich vor allem über das Medium vermittelt und beruht somit am ehesten auf gebildeten ROS und RNS und

weniger auf der applizierten UV-Strahlung. Wiederum ist der Effekt stark dosisabhängig. Hierbei zeigen sich jedoch im Gegensatz zu den Ergebnissen der Untersuchungen mittels der LDH-Methode schon gravierende Einschränkungen der Stoffwechselaktivität bei Behandlungszeiten ab 120 Sekunden.

Ähnliche Effekte konnten schon in Untersuchungen mit anderen Zelllinien beobachtet werden. So haben Hoentsch et al. (Hoentsch, et al. 2012) festgestellt, dass Epithelzellen der Maus (mHepR1) sowohl bei direkter Argonplasmaexposition als auch bei alleiniger Exposition gegenüber behandeltem Medium an Vitalität und der Fähigkeit zur Adhäsion einbüßen können. Die Autoren gehen hierbei ebenfalls davon aus, dass das Plasma seine Effekte vor allem über die Diffusion reaktiver Teilchen (allen voran RNS und ROS) in das Medium entfaltet.

Zusammengefasst bedeutet dies, dass mittels Plasmabehandlung die Schädigung gesunder Zellen möglich ist. Dieser Schaden ist stark dosisabhängig und wird erst ab langen Behandlungszeiten relevant. Hierbei ist in der vorliegenden Arbeit eine Einschränkung der Stoffwechsellistung vor der Schädigung der Zellmembran ersichtlich. Bei den Mechanismen, die ursächlich für die Vermittlung dieser Effekte sind, spielen vor allem RS, wie RNS und ROS, die mittels Plasma erzeugt werden und durch Diffusion in das Medium gelangen, eine tragende Rolle.

### 6.3. Klinische Relevanz

Da mittels der Untersuchungen der Wundflüssigkeiten vor allem hinsichtlich der NOx-Konzentration und des oxidativen Stress leider keine eindeutigen Trends ermittelt werden konnten, stützt sich diese Arbeit vor allem auf die Erkenntnisse aus den in vitro Versuchen. Diese können natürlich nicht vorbehaltlos für die klinische Praxis übernommen werden. Sie können jedoch als gute Anhaltspunkte für weitere Untersuchungen und Überlegungen herangezogen werden.

Eine Manipulation des pH-Wertes abhängig von der jeweiligen Phase der Wundheilung scheint vor allem vor dem Hintergrund der Erkenntnisse von Schneider et al. (Schneider, et al. 2007) sinnvoll zu sein: In den frühen Phasen der Wundheilung ist am ehesten ein eher alkalisches Milieu vorteilhaft, welches die Bildung von Granulationsgewebe und damit auch den Heilungsprozess begünstigt. Ein saures pH-Milieu, das auch als Indikator für ein erfolgreiche Behandlung chronischer Wunden gilt, hemmt das bakterielle Wachstum und die Protease-Aktivitäten. Weiterhin fördert ein niedriger pH-Wert in vitro die Fibroblasten-Proliferation und die Sauerstoffversorgung des Gewebes, um so zur Wundheilung beizutragen. Eine direkte Beeinflussung des pH-Wertes mittels Plasmabehandlung zur

Unterstützung der Wundheilung ist nach den Erkenntnissen dieser Arbeit mit den hier eingesetzten Plasmageräten jedoch nicht möglich. In anderen Arbeiten, die sich mit unterschiedlichen Plasmaquellen und anderen experimentellen Aufbauten beschäftigt haben, war jedoch oftmals eine Erniedrigung des pH-Wertes konsekutiv nach einer Plasmabehandlung in saure Bereiche ersichtlich (Liu, et al. 2010; Tang, et al. 2008). Trotz des ausbleibenden Effekts der Plasmabehandlung mittels MicroPlaSter  $\beta$  und miniFlatPlaSter auf den pH-Wert, könnte dieser Wert in zukünftigen in vivo Plasmastudien mit diesen Geräten genutzt werden, um als indirekter Parameter für die Quantifizierung einer erfolgreichen oder ausbleibenden Wundheilung zu fungieren.

Eine Möglichkeit zur therapeutischen Beeinflussung der Wundheilung bietet die Erhöhung der NO-Konzentration mittels Plasmabehandlung. Einer Studie an Ratten von Lee et al. (Lee, et al. 2001) zufolge ist in einer Wunde die höchste Aktivität von NOS (insbesondere iNOS) während der ersten 24 Stunden nach Entstehung der Verletzung zu messen. Die Aktivität der iNOS nimmt dann während der nächsten 5-7 Tage stetig ab, wobei die Produktion an NO $\cdot$  noch für bis zu 10 Tage aufrechterhalten wird. Dieses Maximum an Synthase-Aktivität während der initialen Entzündungsphase der Wundheilung wird vor allem auf die antimikrobielle Wirkung von NO $\cdot$  und dessen Funktion bei der unspezifischen Immunantwort zurückgeführt. Die konstante Produktion von NO $\cdot$  nach dem anfänglichen Peak hängt wohl am ehesten mit den zahlreichen weiteren Funktionen dieses Moleküls zusammen. So ist in zahlreichen Studien ein positiver Effekt auf die Neoangiogenese beschrieben (Donnini and Ziche 2002; Murohara, et al. 1998). Weiterhin entfaltet NO $\cdot$  komplexe Wirkungen auf die Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Zellen, die an der Wundheilung beteiligt sind: Sowohl Keratinozyten (Stallmeyer, et al. 1999), als auch Endothelzellen (Frank, et al. 2002) werden zum Wachstum angeregt, was die Wundheilung maßgeblich beeinflussen kann. Zudem kann, wie in zahlreichen Arbeiten nachgewiesen wurde, NO $\cdot$  die Kollagendichte in Wunden erhöhen (Schaffer, Efron, et al. 1997; Schaffer, et al. 1996; Thornton, et al. 1998), was wiederum in der letzten Phase der Wundheilung eine besondere Rolle spielt. Einer Studie von Shi et al. (Shi, et al. 2000) nach kann die zusätzliche Versorgung von Mäusen mit L-Arginin, welches das Substrat der NOS zur Synthese von NO $\cdot$  ist, die Wundheilung bei Mäusen verbessern. Selbiges gilt jedoch nicht für Knock-out-Mäuse, die über kein iNOS-Gen verfügen. Dies legt nahe, dass vor allem die Bildung von NO $\cdot$  die Wundheilung positiv beeinflussen kann. Ähnliche Beobachtungen wurden auch in anderen Arbeiten beim Menschen getroffen (Barbul, et al. 1990; Kirk, et al. 1993). Weiterhin konnte bei iNOS-defizienten Mäusen eine Wundheilungsverzögerung von bis zu 31% gegenüber Wildtyp-Tieren beobachtet werden, die durch einen adenoviral-vermittelten iNOS Gentransfer jedoch wieder vollständig reversibel war (Yamasaki, et al. 1998). Auch erscheint die topische Applikation von NO-Donatoren die Wundregeneration



deutlich zu verbessern (Shabani, et al. 1996). Untersuchungen von Shekhter et al. (Shekhter, et al. 2005), bei denen die Luft-Plasmaquelle „Plason“ zur Erzeugung von NO<sub>2</sub> zum Einsatz kam, belegen eine bis zu einem Drittel verkürzte Regenerationszeit von sowohl infektiösen als auch nicht-septischen Wunden an Mäusen. Neben diesen Beobachtungen zu den positiven Effekten von NO<sub>2</sub> auf die Wundheilung, konnte auch ein Zusammenhang von niedrigen NO<sub>2</sub>-Konzentrationen und gestörter Wundheilung hergestellt werden: So sind nachweislich bei Faktoren wie Diabetes (Schaffer, Tantry, Efron, et al. 1997), einer chronischen Steroid-Einnahme (Bulgrin, et al. 1995) oder bei Mangelernährung (Schaffer, Tantry, Ahrendt, et al. 1997), die sich allesamt negativ auf die Regeneration einer Wunde auswirken, die gemessenen NO<sub>2</sub>-Konzentrationen erniedrigt und die NO<sub>2</sub>-Produktion vermindert. Zusammengenommen implizieren all diese Feststellungen und Überlegungen, dass NO<sub>2</sub> eine tragende Rolle bei der physiologischen Wundheilung spielt. Eine topische Applikation von NO<sub>2</sub> auf Wunden, um die Wundheilung zu beschleunigen, erscheint somit sinnvoll. Die Plasmabehandlung kann nach den Ergebnissen dieser Arbeit ein geeignetes Mittel sein, um NO<sub>2</sub> lokal auf einen zirkumskripten Bereich zu applizieren. Eine Wunschvorstellung wäre hierbei, die Verabreichung von ganz definierten Dosen an NO<sub>2</sub>. Um dies jedoch zu ermöglichen, müssen noch viele Untersuchungen und Studien durchgeführt werden.

Weiterhin konnte auch demonstriert werden, dass zu hohe Behandlungszeiten und damit verbundene erhöhte Plasmadosen einen schädigenden Effekt auf die Zellmembran und die Stoffwechselaktivität intakter Fibroblasten haben können. Unterschiedliche Studien konnten aufzeigen, dass mittels Plasmabehandlung auch die Zellzahl von menschlichen hepatozellulären Karzinomzellen deutlich reduziert werden (Zhang, et al. 2008) und bei Melanomzellen die Apoptose induziert werden kann (Sensenig, et al. 2011). Dies sollte einem vor allem bei dem klinischen Einsatz von Plasmaapplikationen am Menschen bewusst sein. Jedoch haben auch andere Arbeiten wie die von Nosenko et al. (Nosenko, et al. 2009) eindeutig bestätigt, dass man bereits mit niedrigen Konzentrationen an plasmagenerierten RNS und ROS einen toxischen Effekt auf Bakterien ausüben kann, ohne dabei menschliche Hautzellen zu beschädigen. Dies ist einer der größten Vorteile des Einsatzes von Plasma, der es ermöglicht, die Besiedelung von Wunden mittels pathogener Keime zu verringern ohne intakte Zellen zu schädigen (Isbary, et al. 2010).

Zusammenfassend gibt es also starke Hinweise darauf, dass mittels Plasmabehandlung die Wundheilung positiv beeinflusst werden kann. So ist es möglich durch die gasförmige Applikation des Plasmas selbst schwer zugängliche Stellen zu erreichen. Auch ist die gezielte Behandlung einzelner Loci ohne systemische Anwendung und damit verbundene unerwünschte Wirkungen praktikabel. Weiterhin kann die Wundheilung mittels Erhöhung der NO<sub>2</sub>-Konzentration verbessert werden. Ein anderer Aspekt ist die toxische Wirkung auf

Bakterien ohne jedoch menschliche Hautzellen zu schädigen. Somit wird deutlich, dass das junge interdisziplinäre Fach der Plasmamedizin vielversprechende Ansätze zur Lösung bestehender medizinischer Probleme liefern kann.

## 6.4. Fazit

Die Fragestellung dieser Arbeit war zum einen die Identifizierung geeigneter Methoden zur Bestimmung der Parameter, die sich für Untersuchungen von Wundflüssigkeiten eignen, zum anderen die Charakterisierung der Veränderungen des Wundmilieus chronischer Wunden unter Plasmabehandlung unter dem Gesichtspunkt der Entwicklung individueller Plasmen zur Unterstützung der Wundheilung und -regeneration. Diese Problematik wurde mittels zweier experimenteller Ansätze versucht zu beantworten.

Zusammengefasst betrachtet, muss man festhalten, dass die Untersuchungen der Patientenwundflüssigkeiten zeigten, dass sowohl die pH-Wert-Bestimmung, die NOx-Konzentrationsmessung und die Analyse der Protein-Nitrierung sich als praktikable Methoden zur Charakterisierung der Wundflüssigkeiten darstellten. Leider konnten diese Verfahren aufgrund großer individueller Unterschiede keine eindeutigen Tendenzen, wie sich das Milieu chronischer Wunden unter Plasmabehandlung ändert, liefern. Die Beschreibung des oxidativen Stresses mittels Protein-Carbonylierung lieferte keine sinnvoll auswertbaren Ergebnisse und erschien somit als Untersuchungsmethode in diesem experimentellen Aufbau als nicht brauchbar.

Weiterhin konnten anhand der Versuche an den NIH 3T3 Fibroblasten einige interessante Aussagen getroffen werden:

1. Der pH-Wert des Mediums änderte sich unter Plasmabehandlung mit den angegebenen Geräten nicht.
2. Die NO-Konzentration konnte mittels Plasmabehandlung erheblich erhöht werden. Dabei stand die Steigerung der NO-Konzentration in einem linearen Zusammenhang mit der Plasmabehandlungszeit.
3. Bei einer hohen Plasmadosis konnten Schäden an der Zellmembran und Einschränkungen der Stoffwechsellistung intakter Fibroblasten beobachtet werden.
4. Diese Schäden werden am ehesten Medium-vermittelt über RS, wie RNS und ROS, ausgelöst.

Versucht man diese Erkenntnisse in den klinischen Alltag zu übertragen, muss man sich bewusst sein, dass es sich hierbei um in vitro Untersuchungen handelt, die nur als Modell für die echten Gegebenheiten dienen. Nichtsdestotrotz kann man anhand dieser Ergebnisse davon ausgehen, dass man mittels Plasmabehandlung die NO-Konzentration in Wundflüssigkeiten zu Gunsten der Wundheilung steigern kann. Eine Limitation hierbei stellt die applizierte Plasmadosis dar, da zu hohe Dosen sich durchaus negativ auf intakte Hautzellen auswirken können. Jedoch kann man nach Nosenko et al. (Nosenko, et al. 2009) davon ausgehen, dass man schon mit Plasmadosen, die keinen Schaden an menschlichen Hautzellen auslösen, toxische Effekte auf Bakterien erzielen und somit die Wundheilung verbessern kann.

Alles in allem scheint also die Plasmamedizin bei der Behandlung chronischer Wunden neue vielversprechende Ansätze zu liefern. Die großen Vorteile der Plasmabehandlung sind neben der lokal begrenzten Anwendung auch die Erreichbarkeit selbst schwer zugänglicher Loci durch die gasförmige Beschaffenheit des Plasmas. Weiterhin ermöglicht die Plasmabehandlung die Applikation von NO<sup>•</sup> in die Wundflüssigkeit. Ein zusätzlicher wichtiger Effekt ist auch die sterilisierende Wirkung des Plasmas, ohne die Wunde direkt mittels Kompression oder Hitze zu irritieren.

Natürlich müssen, um das Verständnis der Wirkungsmechanismen des Plasmas weiter zu vertiefen und somit möglicherweise noch weitere Anwendungsbereiche der Plasmamedizin zu entdecken, noch eine Vielzahl von sowohl in vivo als auch in vitro Studien durchgeführt werden.

## 7. Zusammenfassung/Abstract

Von je her ist die Versorgung und Behandlung von Wunden in der Medizin ein zentrales Thema. Während es im Laufe der Medizingeschichte gelungen ist ausreichende Versorgungsleitlinien für die meisten Arten von Wunden zu entwickeln, existieren einige Bereiche in der Wundbehandlung, in denen händeringend nach neuen wegweisenden Therapieoptionen gesucht wird. Einen solchen Bereich stellen chronische Wunden dar. Mit der Entwicklung von sogenannten CAPs (Cold Atmospheric Plasma), die es ermöglichen Plasmen unter atmosphärischen Druckverhältnissen und bei Raumtemperatur zu erzeugen, hat sich der Medizin ein gänzlich neues Feld mit einer Vielzahl von Möglichkeiten eröffnet, das auch bei der Problemstellung chronischer Wunden einen vielversprechenden Ansatz zu bieten scheint.

Das Ziel dieser Arbeit war es einerseits in einer Pilotstudie anhand von Untersuchungen von Patientenwundflüssigkeiten, die vor und nach Plasmabehandlung mittels MicroFlatPlaSter  $\beta$  gewonnen wurden, geeignete Methoden für die Charakterisierung der Veränderungen unter Plasmatherapie zu identifizieren und diese Veränderungen zu beschreiben. Dabei wurden speziell der pH-Wert, die NO<sub>x</sub>-Konzentration und der vorherrschende oxidative Stress mittels Protein-Carbonylierung und Protein-Nitrierung betrachtet. Andererseits galt es bei in vitro Experimenten mit Fibroblasten (NIH 3T3), die mittels miniFlatPlaSter behandelt wurden, Mechanismen der Plasmawirkung näher zu verstehen und zu analysieren. Hierbei wurde ebenfalls der pH-Wert, die NO<sub>x</sub>-Konzentration und die Zellvitalität und -aktivität anhand von MTT- und LDH-Bestimmungen quantifiziert. Die eingesetzten Methoden bei den in vivo Experimente bezüglich der pH-Wert-Untersuchungen, der NO<sub>x</sub>-Bestimmung und der Protein-Nitrierung erwiesen sich als geeignet und praktikabel zur Charakterisierung der Veränderungen unter Plasmatherapie. Eindeutige Trends waren jedoch anhand der untersuchten Proben, die recht große individuelle Unterschiede aufwiesen, nicht zu eruieren. Bei den in vitro Untersuchungen zeigte sich, dass der pH-Wert nicht direkt durch die Plasmabehandlung mit den hier eingesetzten Plasmaquellen beeinflusst werden kann. Weiterhin kann die NO-Konzentration mittels Plasmatherapie linear zur Behandlungszeit gesteigert werden. Werden die Plasmabehandlungszeiten jedoch zu lang, sind Schäden an der Zellmembran und Einschränkungen der Stoffwechsellistung intakter Fibroblasten zu beobachten, die am ehesten über reaktive Stickstoff- und Sauerstoff-Spezies im Medium vermittelt werden.

Überträgt man die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse in den klinischen Alltag, kann man davon ausgehen, dass die Plasmamedizin bei der Behandlung chronischer Wunden wertvolle Beiträge leisten kann.

## 8. Literaturverzeichnis

- Albina J. E., Mills C. D., Henry W. L., Jr. and Caldwell M. D.  
Temporal expression of different pathways of 1-arginine metabolism in healing wounds.  
*Journal of immunology* 144 (1990) 3877-3880
- Altman F.  
Tetrazolium salts and formazans.  
*Progress in histochemistry and cytochemistry.* 9(3) (1976) 1-56
- Amiranashvili S. and Yu M. Y.  
Ambipolar diffusion in a dusty plasma.  
*Physics of Plasmas* 9 (2002) 4825-4828
- Arjunan K. P. and Clyne A. M.  
A Nitric Oxide Producing Pin-to-Hole Spark Discharge Plasma Enhances Endothelial Cell Proliferation and Migration.  
*Plasma Medicine* 1 (2011) 279-293
- Barbul A., Lazarou S. A., Efron D. T., Wasserkrug H. L. and Efron G.  
Arginine enhances wound healing and lymphocyte immune responses in humans.  
*Surgery* 108 (1990) 331-336
- Bedard K. and Krause K. H.  
The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology.  
*Physiological reviews* 87 (2007) 245-313
- Bradford M. M.  
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.  
*Analytical Biochemistry* 72 (1976) 248-254
- Braun-Falco O. and Korting H. C.  
Normal pH value of human skin.  
*Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete* 37 (1986) 126-129
- Bulgrin J. P., Shabani M., Chakravarthy D. and Smith D. J.  
Nitric oxide synthesis is suppressed in steroid-impaired and diabetic wounds.  
*Wounds* 7 (1995) 48-57
- Cerutti P. A. and Trump B. F.  
Inflammation and oxidative stress in carcinogenesis.  
*Cancer cells* 3 (1991) 1-7
- Childress B. B. and Stechmiller J. K.  
Role of nitric oxide in wound healing.  
*Biological research for nursing* 4 (2002) 5-15

Clark R. A. F.

"The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair" (second edition)  
Plenum Press, New York, 1995

Crookes W., Sir,

"On radiant matter a lecture delivered to the British Association for the Advancement of Science, at Sheffield, Friday, August 22, 1879 / by William Crookes"  
[s.n.], London, 1879

D'Autreaux B. and Toledano M. B.

ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis.  
Nature reviews. Molecular cell biology 8 (2007) 813-824

Deutsches Netzwerk für Qualitätentwicklung in der Pflege DNQP H.

"Expertenstandard Pflege von Menschen mit chronischen Wunden"  
Selbstverlag, Fachhochschule Osnabrück, 2008

Dissemond J., Witthoff M., Brauns T. C., Haberer D. and Goos M.

pH-Wert des Milieus chronischer Wunden.  
Der Hautarzt 54 (2003) 959-965

Dobrynin D., Arjunan K., Fridman A., Friedman G. and Clyne A. M.

Direct and controllable nitric oxide delivery into biological media and living cells by a pin-to-hole spark discharge (PHD) plasma.  
Journal of Physics D: Applied Physics 44 (2011) 075201

Dobrynin D., Fridman G., Friedman G. and Fridman A.

Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue.  
New Journal of Physics 11 (2009) 115020

Donnini S. and Ziche M.

Constitutive and inducible nitric oxide synthase: role in angiogenesis.  
Antioxidants & redox signaling 4 (2002) 817-823

Etufugh C. N. and Phillips T. J.

Venous ulcers.  
Clinics in dermatology 25 (2007) 121-130

Frank S., Kampfer H., Wetzler C. and Pfeilschifter J.

Nitric oxide drives skin repair: novel functions of an established mediator.  
Kidney international 61 (2002) 882-888

Fridman G., Peddinghaus M., Balasubramanian M., Ayan H., Fridman A., Gutsol A. and Brooks A.

Blood Coagulation and Living Tissue Sterilization by Floating-Electrode Dielectric Barrier Discharge in Air.  
Plasma Chemistry and Plasma Processing 26 (2006) 425-442

Fridman G., Shereshevsky A., Jost M., Brooks A., Fridman A., Gutsol A., Vasilets V. and Friedman G.

Floating Electrode Dielectric Barrier Discharge Plasma in Air Promoting Apoptotic Behavior in Melanoma Skin Cancer Cell Lines.

Plasma Chemistry and Plasma Processing 27 (2007) 163-176

Fritsch P.

"Dermatologie, Venerologie: Grundlagen, Klinik, Atlas"

Springer Verlag, Heidelberg, 1983

Greener B., Hughes A. A., Bannister N. P. and Douglass J.

Proteases and pH in chronic wounds.

Journal of wound care 14 (2005) 59-61

Griffith O. W. and Stuehr D. J.

Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism.

Annual review of physiology 57 (1995) 707-736

Gurtner G. C., Werner S., Barrandon Y. and Longaker M. T.

Wound repair and regeneration.

Nature 453 (2008) 314-321

Hauner H.

Diabetesepidemie und Dunkelziffer.

In: "Deutscher Gesundheitsbericht: Diabetes 2011", T. Danne, diabetesDE, Berlin, 2011, 8-13

Heinlin J., Isbary G., Stolz W., Morfill G., Landthaler M., Shimizu T., Steffes B., Nosenko T., Zimmermann J. and Karrer S.

Plasma applications in medicine with a special focus on dermatology.

Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology 25 (2011) 1-11

Helmke A., Hoffmeister D., Mertens N., Emmert S., Schuette J. and Vioel W.

The acidification of lipid film surfaces by non-thermal DBD at atmospheric pressure in air.

New Journal of Physics 11 (2009) 115025

Hoentsch M., von Woedtke T., Weltmann K.-D. and Nebe J. B.

Time-dependent effects of low-temperature atmospheric-pressure argon plasma on epithelial cell attachment, viability and tight junction formation in vitro.

Journal of Physics D: Applied Physics 45 (2012) 025206

Hong Y. F., Kang J. G., Lee H. Y., Uhm H. S., Moon E. and Park Y. H.

Sterilization effect of atmospheric plasma on Escherichia coli and Bacillus subtilis endospores.

Letters in applied microbiology 48 (2009) 33-37

Isbary G., Heinlin J., Shimizu T., Zimmermann J. L., Morfill G., Schmidt H. U., Monetti R., Steffes B., Bunk W., Li Y., Klaempfl T., Karrer S., Landthaler M. and Stolz W.

Successful and safe use of 2 min cold atmospheric argon plasma in chronic wounds: results of a randomized controlled trial.

British Journal of Dermatology 167 (2012) 404-410

Isbary G., Köritzer J., Mitra A., Li Y. F., Shimizu T., Schroeder J., Schlegel J., Morfill G. E., Stolz W. and Zimmermann J. L.

Ex vivo human skin experiments for the evaluation of safety of new cold atmospheric plasma devices.

Clinical Plasma Medicine 1 (2013) 36-44

Isbary G., Morfill G., Schmidt H. U., Georgi M., Ramrath K., Heinlin J., Karrer S., Landthaler M., Shimizu T., Steffes B., Bunk W., Monetti R., Zimmermann J. L., Pompl R. and Stolz W.

A first prospective randomized controlled trial to decrease bacterial load using cold atmospheric argon plasma on chronic wounds in patients.

The British journal of dermatology 163 (2010) 78-82

Isbary G., Morfill G., Zimmermann J., Shimizu T. and Stolz W.

Cold atmospheric plasma: a successful treatment of lesions in Hailey-Hailey disease.

Archives of dermatology 147 (2011) 388-390

Joaquin J. C., Kwan C., Abramzon N., Vandervoort K. and Brelles-Marino G.

Is gas-discharge plasma a new solution to the old problem of biofilm inactivation?

Microbiology 155 (2009) 724-732

Kalghatgi S., Friedman G., Fridman A. and Clyne A.

Endothelial Cell Proliferation is Enhanced by Low Dose Non-Thermal Plasma Through Fibroblast Growth Factor-2 Release.

Annals of Biomedical Engineering 38 (2010) 748-757

Karukonda S. R. K., Flynn T. C., Boh E. E., McBurney E. I., Russo G. G. and Millikan L. E.

The effects of drugs on wound healing: part 1.

International Journal of Dermatology 39 (2000) 250-257

Kirk S. J., Hurson M., Regan M. C., Holt D. R., Wasserkrug H. L. and Barbul A.

Arginine stimulates wound healing and immune function in elderly human beings.

Surgery 114 (1993) 155-160

Klein E., Smith D. and Laxminarayan R.

Hospitalizations and deaths caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

Emerging Infectious Diseases 13 (2007) 1840-1846

Kong M. G., Kroesen G., Morfill G., Nosenko T., Shimizu T., Dijk J. v. and Zimmermann J. L.

Plasma medicine: an introductory review.

New Journal of Physics 11 (2009) 115012

Kroncke K. D., Fehsel K. and Kolb-Bachofen V.

Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities.

Biological chemistry Hoppe-Seyler 376 (1995) 327-343

Kumin A., Huber C., Rulicke T., Wolf E. and Werner S.

Peroxiredoxin 6 is a potent cytoprotective enzyme in the epidermis.

The American journal of pathology 169 (2006) 1194-1205



- Lambers H., Piessens S., Bloem A., Pronk H. and Finkel P.  
Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora.  
International journal of cosmetic science 28 (2006) 359-370
- Lee H. W., Kim G. J., Kim J. M., Park J. K., Lee J. K. and Kim G. C.  
Tooth bleaching with nonthermal atmospheric pressure plasma.  
Journal of endodontics 35 (2009) 587-591
- Lee R. H., Efron D., Tantry U. and Barbul A.  
Nitric Oxide in the Healing Wound: A Time-Course Study.  
Journal of Surgical Research 101 (2001) 104-108
- Lerouge S., Wertheimer M. R. and Yahia L. H.  
Plasma Sterilization: A Review of Parameters, Mechanisms, and Limitations.  
Plasmas and Polymers 6 (2001) 175-188
- Li Y.-F., Zimmermann J. L. and Morfill G. E.  
Optimizing the distance for bacterial treatment using surface micro-discharge plasma.  
New Journal of Physics 14 (2012) 023058
- Lincoln J., Hoyle C. H. V. and Burnstock G.  
"Nitric Oxide in Health and Disease"  
Cambridge University Press, Cambridge, 1997
- Liu F., Sun P., Bai N., Tian Y., Zhou H., Wei S., Zhou Y., Zhang J., Zhu W., Becker K. and Fang J.  
Inactivation of Bacteria in an Aqueous Environment by a Direct-Current, Cold-Atmospheric-Pressure Air Plasma Microjet.  
Plasma Processes and Polymers 7 (2010) 231-236
- Liu X., Miller M. J., Joshi M. S., Sadowska-Krowicka H., Clark D. A. and Lancaster J. R., Jr.  
Diffusion-limited reaction of free nitric oxide with erythrocytes.  
The Journal of biological chemistry 273 (1998) 18709-18713
- Liu Y., Kalen A., Risto O. and Wahlstrom O.  
Fibroblast proliferation due to exposure to a platelet concentrate in vitro is pH dependent.  
Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society 10 (2002) 336-340
- Losseva T. V., Popel S. I., Yu M. Y. and Ma J. X.  
Ambipolar diffusion in complex plasma.  
Physical Review E 75 (2007) 046403
- Luo J. D. and Chen A. F.  
Nitric oxide: a newly discovered function on wound healing.  
Acta pharmacologica Sinica 26 (2005) 259-264
- Ma J. X., Yu M. Y., Liang X. P., Zheng J., Liu W. D. and Yu C. X.  
Ambipolar diffusion in an inhomogeneous dusty plasma.  
Physics of Plasmas 9 (2002) 1584-1588

Maisch T., Shimizu T., Isbary G., Heinlin J., Karrer S., Klampfl T. G., Li Y. F., Morfill G. and Zimmermann J. L.  
Contact-free inactivation of *Candida albicans* biofilms by cold atmospheric air plasma.  
*Applied and environmental microbiology* 78 (2012) 4242-4247

Maklebust J. A. and Sieggreen M.  
"Pressure Ulcers: Guidelines for Prevention and Management" (3<sup>rd</sup> edition)  
Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001

Martin P.  
Wound Healing - Aiming for Perfect Skin Regeneration.  
*Science* 276 (1997) 75-81

Moisan M., Barbeau J., Moreau S., Pelletier J., Tabrizian M. and Yahia L. H.  
Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms.  
*International journal of pharmaceutics* 226 (2001) 1-21

Morbidelli L., Chang C. H., Douglas J. G., Granger H. J., Ledda F. and Ziche M.  
Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium.  
*The American journal of physiology* 270 (1996) H411-415

Morris S. M., Jr. and Billiar T. R.  
New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis.  
*The American journal of physiology* 266 (1994) E829-839

Murohara T., Asahara T., Silver M., Bauters C., Masuda H., Kalka C., Kearney M., Chen D., Symes J. F., Fishman M. C., Huang P. L. and Isner J. M.  
Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia.  
*The Journal of clinical investigation* 101 (1998) 2567-2578

Musalmah M., Nizrana M. Y., Fairuz A. H., NoorAini A. H., Azian A. L., Gapor M. T. and Wan Ngah W. Z.  
Comparative effects of palm vitamin E and alpha-tocopherol on healing and wound tissue antioxidant enzyme levels in diabetic rats.  
*Lipids* 40 (2005) 575-580

Nosenko T., Shimizu T. and Morfill G. E.  
Designing plasmas for chronic wound disinfection.  
*New Journal of Physics* 11 (2009) 115013

Ogur M., St. John R. and Nagai S.  
Tetrazolium overlay technique for population studies of respiration deficiency in yeast.  
*Science* 125(3254) (1957) 928-929

Potter M. J., Harrison R., Ramsden A., Bryan B., Andrews P. and Gault D.  
Facial acne and fine lines: transforming patient outcomes with plasma skin regeneration.  
*Annals of plastic surgery* 58 (2007) 608-613

- Rasik A. M. and Shukla A.  
Antioxidant status in delayed healing type of wounds.  
International journal of experimental pathology 81 (2000) 257-263
- Rich P. R., Mischis L. A., Purton S. and Wiskich J. T.  
The sites of interaction of triphenyltetrazolium chloride with mitochondrial respiratory chains.  
FEMS Microbiology Letters 202(2) (2001) 181-187
- Roy S., Khanna S., Nallu K., Hunt T. K. and Sen C. K.  
Dermal Wound Healing Is Subject to Redox Control.  
Molecular Therapy 13 (2006) 211-220
- Schafer M. and Werner S.  
Oxidative stress in normal and impaired wound repair.  
Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society 58 (2008) 165-171
- Schaffer M. R., Efron P. A., Thornton F. J., Klingel K., Gross S. S. and Barbul A.  
Nitric oxide, an autocrine regulator of wound fibroblast synthetic function.  
Journal of immunology 158 (1997) 2375-2381
- Schaffer M. R., Tantry U., Ahrendt G. M., Wasserburg H. L. and Barbul A.  
Acute protein-calorie malnutrition impairs wound healing: a possible role of decreased wound nitric oxide synthesis.  
Journal of the American College of Surgeons 184 (1997) 37-43
- Schaffer M. R., Tantry U., Efron P. A., Ahrendt G. M., Thornton F. J. and Barbul A.  
Diabetes-impaired healing and reduced wound nitric oxide synthesis: a possible pathophysiologic correlation.  
Surgery 121 (1997) 513-519
- Schaffer M. R., Tantry U., Gross S. S., Wasserburg H. L. and Barbul A.  
Nitric oxide regulates wound healing.  
The Journal of surgical research 63 (1996) 237-240
- Schneider L. A., Korber A., Grabbe S. and Dissemond J.  
Influence of pH on wound-healing: a new perspective for wound-therapy?  
Archives of dermatological research 298 (2007) 413-420
- Schreml S., Szeimies R. M., Karrer S., Heinlin J., Landthaler M. and Babilas P.  
The impact of the pH value on skin integrity and cutaneous wound healing.  
Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology 24 (2010) 373-378
- Schultz G. and Mast B.  
Molecular Analysis of the Environments of Healing and Chronic Wounds: Cytokines, Proteases and Growth Factors.  
Wounds 10 (1998) 1F-9F

Sensenig R., Kalghatgi S., Cerchar E., Fridman G., Shereshevsky A., Torabi B., Arjunan K. P., Podolsky E., Fridman A., Friedman G., Azizkhan-Clifford J. and Brooks A. D.

Non-thermal plasma induces apoptosis in melanoma cells via production of intracellular reactive oxygen species.

Annals of Biomedical Engineering 39 (2011) 674-687

Shabani M., Pulfer S. K., Bulgrin J. P. and Smith D. J.

Enhancement of wound repair with a topically applied nitric oxide-releasing polymer.

Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society 4 (1996) 353-362

Shashurin A., Keidar M., Bronnikov S., Jurjus R. A. and Stepp M. A.

Living tissue under treatment of cold plasma atmospheric jet.

Applied Physics Letters 93 (2008) 181501-181503

Shekhter A. B., Serezhenkov V. A., Rudenko T. G., Pekshev A. V. and Vanin A. F.

Beneficial effect of gaseous nitric oxide on the healing of skin wounds.

Nitric Oxide 12 (2005) 210-219

Shi H. P., Efron D. T., Most D., Tantry U. S. and Barbul A.

Supplemental dietary arginine enhances wound healing in normal but not inducible nitric oxide synthase knockout mice.

Surgery 128 (2000) 374-378

Shimizu T., Sakiyama Y., Graves D. B., Zimmermann J. L. and Morfill G. E.

The dynamics of ozone generation and mode transition in air surface micro-discharge plasma at atmospheric pressure.

New Journal of Physics 14 (2012) 103028

Shimizu T., Steffes B., Pompl R., Jamitzky F., Bunk W., Ramrath K., Georgi M., Stolz W., Schmidt H.-U., Urayama T., Fujii S. and Morfill G. E.

Characterization of Microwave Plasma Torch for Decontamination.

Plasma Processes and Polymers 5 (2008) 577-582

Sies H.

Oxidative stress: from basic research to clinical application.

The American journal of medicine 91 (1991) 31S-38S

Sladek R. E. J. and Stoffels E.

Deactivation of Escherichia coli by the plasma needle.

Journal of Physics D: Applied Physics 38 (2005) 1716

Stallmeyer B., Kampfer H., Kolb N., Pfeilschifter J. and Frank S.

The function of nitric oxide in wound repair: inhibition of inducible nitric oxide-synthase severely impairs wound reepithelialization.

The Journal of investigative dermatology 113 (1999) 1090-1098

Stoffels E., Roks A. J. M. and Deelman L. E.

Delayed Effects of Cold Atmospheric Plasma on Vascular Cells.

Plasma Processes and Polymers 5 (2008) 599-605

- Tang Y. Z., Lu X. P., Laroussi M. and Dobbs F. C.  
Sublethal and Killing Effects of Atmospheric-Pressure, Nonthermal Plasma on Eukaryotic Microalgae in Aqueous Media.  
Plasma Processes and Polymers 5 (2008) 552-558
- Thomas L. V., Wimpenny J. W. and Davis J. G.  
Effect of three preservatives on the growth of *Bacillus cereus*, Vero cytotoxigenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, on plates with gradients of pH and sodium chloride concentration.  
International journal of food microbiology 17 (1993) 289-301
- Thornton F. J., Schaffer M. R., Witte M. B., Moldawer L. L., MacKay S. L., Abouhamze A., Tannahill C. L. and Barbul A.  
Enhanced collagen accumulation following direct transfection of the inducible nitric oxide synthase gene in cutaneous wounds.  
Biochemical and biophysical research communications 246 (1998) 654-659
- Trengove N. J., Stacey M. C., MacAuley S., Bennett N., Gibson J., Burslem F., Murphy G. and Schultz G.  
Analysis of the acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors.  
Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society 7 (1999) 442-452
- Venezia R. A., Orrico M., Houston E., Yin S. M. and Naumova Y. Y.  
Lethal activity of nonthermal plasma sterilization against microorganisms.  
Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America 29 (2008) 430-436
- Yamasaki K., Edington H. D., McClosky C., Tzeng E., Lizonova A., Kovessi I., Steed D. L. and Billiar T. R.  
Reversal of impaired wound repair in iNOS-deficient mice by topical adenoviral-mediated iNOS gene transfer.  
The Journal of clinical investigation 101 (1998) 967-971
- Ye R. C.  
The relationship of pH of the granulation tissue and the take of the skin graft.  
Plastic and reconstructive surgery 19 (1957) 213-217
- Zhang X., Li M., Zhou R., Feng K. and Yang S.  
Ablation of liver cancer cells in vitro by a plasma needle.  
Applied Physics Letters 93 (2008) 021502-021503
- Zimmermann J. L., Dumler K., Shimizu T., Morfill G. E., Wolf A., Boxhammer V., Schlegel J., Gansbacher B. and Anton M.  
Effects of cold atmospheric plasmas on adenoviruses in solution.  
Journal of Physics D: Applied Physics 44 (2011) 505201

## 9. Danksagung

Allen voran möchte ich zunächst Herrn Prof. Dr. Jürgen Schlegel für die Bereitstellung des Themas und die umfassende Betreuung danken. Auch in schwierigen Lagen stand er mir mit Rat und Tat zur Seite und trug dadurch maßgeblich zu dem Gelingen dieser Dissertation bei ohne mich in meinen kreativen Freiräumen zu beschränken.

Mein besonderer Dank gilt ebenso Herrn Dr. Georg Isbary von der Abteilung für Dermatologie, Allergologie und Umweltmedizin des Klinikums Schwabing für sein Engagement und seine kompetente fachliche Unterstützung. Seine Expertise auf dem Gebiet der Plasmamedizin war mir stets eine große Stütze. Seine wertvollen Vorschläge zur Korrektur der Rohfassung der Arbeit waren immer äußerst hilfreich.

Weiterhin möchte ich Frau Julia Köritzer aus der Abteilung für Neuropathologie des Instituts für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München meinen herzlichsten Dank aussprechen. Sie machte mich mit der spannenden Arbeit im Labor vertraut, hatte stets ein offenes Ohr für meine Nöte und half mir mit äußerst nützlichen Tipps zur Korrektur der Dissertation.

Meinen aufrichtigen Dank für die Unterstützung von der physikalischen Seite aus möchte ich auch Dr. Julia Zimmermann und dem Rest des Teams der „Plasma Health Care“ vom Max-Planck-Institut für extraterrestrische Physik München aussprechen.

Nicht zuletzt bekunde ich natürlich auch meinen inständigen Dank meiner Familie, meinen Freunden und ganz besonders meiner Freundin Theresa gegenüber. Ihre Geduld, das mir entgegengebrachte Verständnis und die stets aufmunternden Worte waren mir ein unerlässlicher Begleiter und halfen mir ungemein auf dem Weg zur Vollendung dieser Arbeit.

## 10. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

**„Untersuchung der Wirkung von Plasmabehandlungen auf Wundflüssigkeiten und Fibroblasten bezüglich pH-Wert, NOx-Konzentration und oxidativem Stress“**

in der Fachabteilung Neuropathologie des Instituts für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie des Klinikums Rechts der Isar unter der Anleitung und Betreuung durch Univ.-Prof. Dr. med. J. Schlegel ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 6 und 7 Satz 2 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht, oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.

Ich habe die Dissertation in dieser oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.

Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.

Die öffentlich zugängliche Promotionsordnung der TUM ist mir bekannt, insbesondere habe ich die Bedeutung von § 28 (Nichtigkeit der Promotion) und § 29 (Entzug des Doktorgrades) zur Kenntnis genommen. Ich bin mir der Konsequenzen einer falschen Eidesstattlichen Erklärung bewusst.

Mit der Aufnahme meiner personenbezogenen Daten in die Alumni-Datei bei der TUM bin ich nicht einverstanden.

....., den .....

.....

Unterschrift

## 11. Curriculum vitae

### Persönliche Daten:

Name, Vorname: Henemann, Erwin  
 Geburtsdatum und -ort: 25.03.1988, Moskau (Russland)  
 Staatsangehörigkeit: Deutsch  
 Familienstand: ledig

### Schulische Ausbildung:

1994 - 1997 Grundschole, Marktredwitz  
 1997 - 1998 Grundschole, Waldershof  
 1998 - 2007 Otto-Hahn-Gymnasium, Marktredwitz  
 Juni 2007 Erlangung der allgemeinen Hochschulreife

### Universitäre Ausbildung:

Studium der Humanmedizin in München

WS 2007/08 – SS 2009 Vorklinischer Studienabschnitt LMU/TU München  
 09/2009 1. Staatsexamen  
 WS 2009/10 – SS 2013 Klinischer Studienabschnitt an der TU München  
 10/2013 2. Staatsexamen

Praktisches Jahr

08/2012 – 12/2012 PJ Innere Medizin – Rotkreuzklinikum, München  
 12/2012 – 04/2013 PJ Orthopädie – Rotkreuzklinikum, München  
 04/2013 – 08/2013 PJ Chirurgie – Klinikum Rechts der Isar, München

### Beruflicher Werdegang:

07/2007 Beginn der Laufbahn als Sanitätsoffizier der deutschen Bundeswehr

07/2010 – 09/2010 Allgemeine Grundausbildung in Feldkirchen  
 10/2013 – 04/2014 Sanitätsakademie der Bundeswehr, München  
 Ab 04/2014 Assistenzarzt der Chirurgie am BWK Ulm

....., den .....

.....

Unterschrift